

Die Funktion von KCNQ Kanälen bei Schmerz- und Tastempfinden

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sebastian Schütze

aus Leonberg

März 2016

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch
am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) und
Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin angefertigt.

1.11.2010 – 3.3.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist

Tag der Disputation: 29.06.2016

Die Zelle, 1990

von meinem Großvater Heinz-Adolf Schmitthenner

Die Körperzelle gibt und nimmt,
ist wandelbar und vorbestimmt
und außerdem, wem's nicht genügt:
in and're Zellen eingefügt

als wie ein Stein in eine Mauer,
trägt biochemisch Lust und Trauer
gleich einem Wesen mit Verstand
und ist doch nur im Zellenverband

das kleinste Glied im großen Netz.
Im biologischen Gesetz
Ein Wandelndes, das gibt und nimmt,
als wäre das so vorbestimmt;
ein Puzzle ist's an rechter Stelle,
vom Seienden das Ich: Die Zelle.

Diese Arbeit widme ich hiermit meiner Familie!

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABSTRACT	XI
ZUSAMMENFASSUNG.....	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Struktur und Funktion von KCNQ Kanälen.....	2
1.1.1 Homomere und heteromere KCNQ Kanäle.....	2
1.1.2 Der M-Strom.....	4
1.1.3 Regulatorische Mechanismen des M-Stroms	6
1.1.4 KCNQ Kanal assoziierte Krankheiten.....	8
1.2 KCNQ2 und KCNQ3	11
1.2.1 Gewebe Expressionsmuster von KCNQ2 und KCNQ3	11
1.2.2 KCNQ2 und KCNQ3 Maus Modelle	11
1.3 KCNQ4.....	13
1.3.1 Gewebe Expressionsmuster von KCNQ4.....	13
1.3.2 KCNQ4 Mausmodelle	14
1.4 KCNQ5.....	14
1.4.1 Gewebe Expressionsmuster von KCNQ5.....	14
1.4.2 KCNQ5 Maus Modelle.....	15
1.5 Das somatosensorische System	16
1.5.1 Eigenschaften und Klassifizierung somatosensorischer Neurone	17
1.5.1.1 A β -Fasern.....	20
1.5.1.2 A δ -Fasern.....	21
1.5.1.3 C-Fasern.....	22
1.5.2 Anatomische und physiologische Eigenschaften sensorischer Endorgane und freier Nervenendigungen	23
1.5.2.1 Merkel Zell-Neurit Komplexe	23

1.5.2.2	Ruffini-Körperchen.....	25
1.5.2.3	Meissner-Körperchen.....	26
1.5.2.4	Pacini-Körperchen	26
1.5.2.5	Haarfollikel	27
1.5.2.6	HTMRs und akuter Schmerz	29
1.5.3	Molekulare Identifizierung somatosensorischer Neurone in Spinalganglien	31
1.5.4	Mechanotransduktion	33
2	ZIELSETZUNG	38
2.1	Erlernen, Aufbau und Etablierung eines Messplatzes zur elektrophysiologischen Ableitung von Haut-Nerv Präparationen.....	38
2.2	Generierung eines KCNQ5 KO Mausmodells	38
2.3	Untersuchung der Bedeutung von KCNQ Kanälen für Tastempfinden und Schmerz.....	39
3	MATERIAL & METHODEN.....	40
3.1	Material	40
3.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	40
3.1.2	Lösungen, Puffer und Medien	40
3.1.3	Bakterienstämme	42
3.1.4	Vektoren	42
3.1.5	Oligonukleotide	42
3.1.5.1	Genotypisierung.....	43
3.1.5.2	Sequenzierung.....	43
3.1.5.3	Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierungen	45
3.1.5.4	Proben für Southern Blot	48
3.1.6	ES-Zellen.....	49
3.1.7	Antikörper.....	49
3.1.8	Mauslinien	49
3.1.9	Bilddokumentation	50
3.1.10	Messplatz zur elektrophysiologischen Ableitung von Haut-Nerv Präparationen.....	50
3.2	Methoden.....	51
3.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	51

3.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	52
3.2.1.2	Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	52
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	52
3.2.2.1	Isolierung von DNA	52
3.2.2.1.1	Präparation von Plasmid DNA aus 2 ml Kulturen (Miniprep)	53
3.2.2.1.2	Präparation von Plasmid DNA aus 100 ml Kulturen (Midiprep)	53
3.2.2.1.3	Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	53
3.2.2.1.4	Präparation genomischer DNA aus Zellen	53
3.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
3.2.2.3	Isolierung von RNA	54
3.2.2.4	cDNA Synthese	55
3.2.2.5	Sequenzierung von DNA	55
3.2.2.6	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	55
3.2.2.7	Restriktionsverdau von DNA	55
3.2.2.8	DNA-Gelelektrophorese	56
3.2.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
3.2.2.10	Ligation von DNA-Fragmenten	56
3.2.2.11	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA	56
3.2.2.12	<i>In vitro</i> Transkription der Digoxigenin / Fluorescein markierten RNA Sonden	57
3.2.2.13	Aufreinigung von RNA Sonden	57
3.2.2.14	Klonierung des Targetingvektors zur Erzeugung von KCNQ5 KO Mäusen	57
3.2.2.15	Southern Blot	57
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	58
3.2.3.1	Membranpräparation	58
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	58
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse	59
3.2.3.4	Aufreinigung polyklonaler Antikörper	59
3.2.4	Zellbiologische Methoden und Erzeugung transgener Tiere	60
3.2.4.1	Kultivierung von Feederzellen für die ES-Zell Kultur	60
3.2.4.2	Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen	60
3.2.4.3	Targeting embryonaler Stammzellen	60

3.2.4.4	Selektion und Auswahl rekombinierter Klone.....	61
3.2.4.5	Chimäre Tiere	61
3.2.5	Histologische Methoden.....	61
3.2.5.1	Perfusion von Mäusen	61
3.2.5.2	Kryotomschnitte.....	62
3.2.5.3	Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten.....	62
3.2.5.4	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Spinalganglien Schnitten	62
3.2.6	Elektrophysiologische Methoden	65
3.2.6.1	Präparation des Haut-Nerv Gewebe Präparats.....	65
3.2.6.2	Charakterisierung von Nervenfasern durch Bestimmung der Leitungsgeschwindigkeit und des von Frey Haar Schwellenwerts	65
3.2.6.3	Messung der Feueraktivität nach mechanischer und pharmakologischer Stimulation	67
3.2.7	Verhalten	67
3.2.7.1	Aesthesiometer Test.....	67
3.2.7.2	Hargreaves Test	67
3.2.8	Statistik.....	67
4	ERGEBNISSE	68
4.1	KCNQ2 und KCNQ3 Expression in D-Haar A δ -Fasern.....	68
4.1.1	KCNQ2 und KCNQ3 Expression in einer Unterpopulation bestimmter Spinalganglien Neurone.....	68
4.1.2	KCNQ3 Lokalisation in lanzettförmigen A δ -Nervenendigungen um Haarfollikel.....	73
4.1.3	Elektrophysiologische Untersuchungen an D-Haar Fasern von <i>Kcnq3</i> ^{-/-} und <i>Kcnq2</i> ^{+/-} / <i>Kcnq3</i> ^{-/-} Mäusen.....	75
4.2	KCNQ5.....	79
4.2.1	Generierung des KCNQ5 KO Mausmodells	79
4.2.2	Charakterisierung von KCNQ5 Antikörpern mit Hilfe des KO Maus Modells.....	82
4.2.3	Expressionsmuster von KCNQ5 in Maus Spinalganglien.....	83
4.3	KCNQ Kanäle und Schmerz	85
4.3.1	Vergleichende Expressionsanalyse von KCNQ Kanälen in Nozizeptoren.....	86
4.3.2	Elektrophysiologische Haut-Nerv Messungen an A δ -Mechanonozizeptoren (AMs) in verschiedenen KCNQ Mausmodellen ...	88

4.3.3	Elektrophysiologische Haut-Nerv Messungen an C-Fasern in verschiedenen KCNQ Mausmodellen	91
4.3.4	Schmerz-spezifische Verhaltensversuche an <i>Kcnq5^{dn/dn}</i> Mäusen.....	92
5	DISKUSSION	94
5.1	Das Expressionsmuster von KCNQ2 und KCNQ3 in Spinalganglien.....	94
5.2	KCNQ2 und KCNQ3 werden für die normale Funktion des D-Haar Mechanorezeptors in behaarter Haut benötigt.....	97
5.3	KCNQ Kanäle und Mechanotransduktion.....	103
5.4	Das KCNQ5 KO Mausmodell als nützliches Hilfsmittel zur Aufklärung der Lokalisation und physiologischen Funktion von KCNQ5	107
5.5	KCNQ Kanäle und Schmerz: KCNQ2/3 vs. KCNQ5	108
6	LITERATURVERZEICHNIS	112
7	DANKSAGUNG	139
8	PUBLIKATIONEN	140

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Gewebeexpressionsverteilung von KCNQ Untereinheiten	3
Abbildung 2	Bildung von homomeren und heteromeren KCNQ Kanälen.....	4
Abbildung 3	Der M-Strom.....	6
Abbildung 4	Regulatorische Mechanismen des M-Stroms	7
Abbildung 5	Krankheitsverursachende Mutationen in <i>KCNQ2</i> und <i>KCNQ3</i>	10
Abbildung 6	Anatomie und funktionelle Organisation somatosensorischer Neurone.....	17
Abbildung 7	Die Verbindungen primär afferenter Fasern mit dem Rückenmark	19
Abbildung 8	Organisation mechanosensorischer Fasern in unbehaarter und behaarter Haut von Säugetieren.....	24
Abbildung 9	Schematische Darstellung eines proximalen Maus Haarfollikels	27
Abbildung 10	Aktivierung von LTMR-Fasern in behaarter Haut	28
Abbildung 11	Modell zur Aktivierung von Mechano-transduktionskanälen	34
Abbildung 12	Schematische Ansicht der Mechanotransduktion.....	36
Abbildung 13	Lokalisation des Saphenus Nervs innerhalb des Maus Hinterbeins.....	66
Abbildung 14	Präparation des Haut-Nerv Gewebepräparats für elektrophysiologische Haut-Nerv Ableitungen.....	66
Abbildung 15	Durch Doppel <i>in situ</i> Hybridisierung gezeigte Expression von KCNQ2 und -3 in TrkB positiven DRG Zellen	68
Abbildung 16	Keine detektier-bare Expression von KCNQ4 und -5 in TrkB-positiven DRG Zellen	69
Abbildung 17	Expression von KCNQ3 aber nicht KCNQ5 in TrkB positiven DRG Zellen	70
Abbildung 18	Immunhistochemischer Nachweis der Expression von KCNQ4 in TrkB-negativen DRG Neuronen	71
Abbildung 19	Expression von KCNQ3 in Ca _v 3.2-positiven DRG Zellen.....	71
Abbildung 20	KCNQ3 Expression in mittelgroßen DRG Neuronen.....	72
Abbildung 21	Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 in myelinisierten DRG Neuronen.....	73
Abbildung 22	Lokalisation von KCNQ3 in lanzettförmigen Nervenendigungen um Haar-follikel behaarter Haut	74
Abbildung 23	Typisches Feuerverhalten verschiedener Tast- und Schmerzfasern des Saphenus Nervs als Reaktion auf mechanische Stimulation des rezeptiven Feldes der Haut	75
Abbildung 24	Erhöhte Mechanosensitivität von D-Haar Fasern in <i>Kcnq3^{-/-}</i> und <i>Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}</i> Mäusen	77
Abbildung 25	Geschwindigkeitsabhängige mechanische Latenz von WT D-Haar Fasern im Vergleich zu <i>Kcnq3^{-/-}</i> und <i>Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}</i>	79
Abbildung 26	Unveränderte Leitungs-geschwindigkeit von WT, <i>Kcnq3^{-/-}</i> und <i>Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}</i> D-Haar Fasern	79

Abbildung 27	Knock-out Strategie zur Generierung des <i>Kcnq5</i> ^{-/-} Mausmodells	80
Abbildung 28	Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchung des <i>Kcnq5</i> ^{-/-} Mausmodells	81
Abbildung 29	Immunhistochemische Untersuchung des <i>Kcnq5</i> ^{-/-} Mausmodells	82
Abbildung 30	Spezifität der KCNQ5 <i>in situ</i> Hybridisierungssonde auf DRG Schnitten	83
Abbildung 31	Expressionsanalyse von KCNQ5 in DRG Zellen	84
Abbildung 32	Ko-Expressions-studie von KCNQ5 in DRG Zellen	85
Abbildung 33	Expression von KCNQ3 aber nicht KCNQ5 in nozizeptiven DRG Zellen	86
Abbildung 34	Expressionslevel von KCNQ3 in Ranvierschen Schnürringen von DRG und Gehirnschnitten in verschiedenen KCNQ3 Mausmodellen	87
Abbildung 35	Feuerverhalten von A δ -Mechanorezeptor (AM) Fasern in WT, <i>Kcnq3</i> ^{-/-} und <i>Kcnq5</i> ^{dn/dn} Mäusen	89
Abbildung 36	Mechanische Latenz von AM-Fasern	90
Abbildung 37	Unveränderte Leitungsgeschwindigkeit von WT, <i>Kcnq3</i> ^{-/-} und <i>Kcnq5</i> ^{dn/dn} AM-Fasern	90
Abbildung 38	C-Faser Feuerverhalten von WT, <i>Kcnq3</i> ^{-/-} und <i>Kcnq5</i> ^{dn/dn} Mäusen	91
Abbildung 39	Unveränderte C-Faser Leitungsgeschwindigkeit von WT, <i>Kcnq3</i> ^{-/-} und <i>Kcnq5</i> ^{dn/dn} Mäusen	92
Abbildung 40	Unveränderte Hitzeempfindlichkeit von <i>Kcnq5</i> ^{dn/dn} Mäusen	93
Abbildung 41	Mechanosensitivität von <i>Kcnq5</i> ^{dn/dn} Mäusen	93
Abbildung 42	Schematisches Modell zur KCNQ3-abhängigen Verminderung der D-Haar Erregbarkeit	105

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	KCNQ Kanäle: Expression, Krankheiten und Heteromerisierung.....	2
Tabelle 2	Vergleich kutaner Mechanorezeptoren (modifiziert nach Abaira and Ginty, 2013) ..	18
Tabelle 3	Somatosensorische Zelltyp Marker.....	32
Tabelle 4	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien	40
Tabelle 5	Primer zum Genotypisieren der verwendeten Mauslinien	43
Tabelle 6	Primer zum Sequenzieren von DNA-Fragmenten im pGEM®-T Easy Vektor und Primer zum Sequenzieren des KCNQ5 KO Vektors	44
Tabelle 7	Primer zum Amplifizieren der DNA-Vorlagen für <i>in situ</i> Hybridisierungssonden	46
Tabelle 8	Primer zur Synthese der Southern Blot Probe	48
Tabelle 9	Liste der verwendeten Primärantikörper	49
Tabelle 10	Verwendete Mauslinien	50
Tabelle 11	Komponenten des Messplatzes zur Ableitung elektrophysiologischer Haut-Nerv Präparationen.....	51
Tabelle 12	Standard PCR Programm	54
Tabelle 13	Getestete KCNQ5 Antikörper	83

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
A-H	A δ -Faser Hitze-nozizeptor
AHP	Nach-Hyperpolarisation
AIS	Axon Initial Segment
AM	A δ -Faser Mechanonozizeptor
A-MH	A δ -Faser Mechanohitze-nozizeptor
AP	Alkalische Phosphatase
AKAP	A-Kinase Verankerndes Protein
ASIC	Säure-wahrnehmender Ionen Kanal
ATP	Adenosintriphosphat
BCECTS	Gutartige Epilepsie im Kindesalter mit zentrotemporalen Spikes
bp	Basenpaare
BFNS	Benigne familiäre neonatale Krampfanfälle
CA	Ammonshorn
Ca ²⁺	Calciumion(en)
CaM	Calmodulin
CGRP	Calcitonin Gen-Verwandtes Peptid
C-H	Mechanoinsensitive, hitzesensitive C-Faser
Cl ⁻	Chloridion(en)
C-MC	Mechanokältesensitive C-Faser
C-MH	Mechanohitzesensitive C-Faser
C-MHC	Mechanohitzekältesensitive C-Faser
C-M ₁ H ₁	Mechanoinsensitive, hitzeinsensitive C-Faser
Cre	Cre-Rekombinase
°C	Grad Celsius
DAG	Diacylglycerine
D-Haar	Down Haar
DFNA2	Autosomal dominante Taubheit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN/dn	Dominant Negativ
DRG	Spinalganglion
EE	Epileptische Enzephalopathie
EKG	Elektrokardiogramm
FAF	Familiäres Vorhofflimmern
GnRH	Gonadoliberin
H ₂ O	Wasser
HTMR	Hoch-schwelliger Mechanorezeptor
IHC	Immunhistochemie
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP ₃)
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
JLNS	Jervell- und Lange-Nielsen-Syndrom
K ⁺	Kaliumion(en)
KCNQ	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal, KQT-Unterfamilie
kDa	Kilodalton
KI	Knock-in
KO	Knock-out
K _v Kanal	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
K _v 7	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal Familie 7
LTMR	Niedrig-schwelliger Mechanorezeptor
μ	Micro
μm	Micrometer
m	Milli
M	Molar
mAChR	Muskarinischer Acetylcholin Rezeptor

MDC	Max-Delbrück-Centrum
mGluR	Metabotroper Glutamat Rezeptor
min	Minute
MscL	Mechanosensitiver Kanal mit großer Leitfähigkeit
MscS	Mechanosensitiver Kanal mit geringer Leitfähigkeit
Na ⁺	Natriumion(en)
OD	Optische Dichte
PAX3	Paired-box-Gen 3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PNH	Periphere Nerv Übererregbarkeit / Neuromyotonie
PNS	Peripheres Nervensystem
RA	Schnell-adaptierend
RAM	Schnell-adaptierender Mechanorezeptor
RWS	Romano-Ward-Syndrom
SA	Langsam-adaptierend
SAM	Langsam-adaptierender Mechanorezeptor
Trk	Tyrosin kinase rezeptor
TRPV	Transienter Rezeptor Potential Kationen Kanal
TTX	Tetrodotoxin
V	Volt
VGCC	Spannungsgesteuerte Calcium Kanäle
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABSTRACT

M-current mediating KCNQ (K_v7) potassium channels play an important role for electrical properties of neuronal cells. They serve as an intrinsic voltage clamp mechanism by stabilizing the neuron's membrane resting potential and preventing overexcitability, as highlighted by human mutations in genes for *KCNQ2* and *KCNQ3* that underlie certain forms of epilepsy. Besides their expression in the brain, neuronal KCNQ subunits 2 – 5 are also found in the somatosensory system. Here, KCNQ2, -3 and -5 have previously been associated with nociception, while KCNQ4 expression was identified in a subset of dorsal root ganglia (DRG) neurons that correspond to rapidly-adapting low-threshold A β -fibers. Thus, KCNQ4 was shown to be required for tuning the coding of vibrotactile stimuli. In addition, expression of KCNQ channels has been pharmacologically described in A δ low-threshold D-hair fibers; however the KCNQ subunit has not been identified so far. In order to find out about the KCNQ subunit(s) in D-hair fibers, the electrophysiological skin-nerve preparation method was established in our lab. A constitutive KCNQ5 knock-out mouse model was generated and investigated together with several other KCNQ mouse models for a detailed analysis of KCNQ subunit expression in the somatosensory system.

I detected and localized both KCNQ2 and -3 in DRG cells positive for D-hair marker, and demonstrated KCNQ3 expression in peripheral lanceolate nerve endings of cutaneous D-hair fibers around hair follicles, where it may modulate mechanotransduction. Indeed, skin-nerve recordings from single D-hair afferents from *Kcnq3*^{-/-} mice revealed increased firing frequencies in response to mechanical ramp-and-hold stimuli of the receptive field, particularly pronounced at slow indentation velocities. Additional reduction of KCNQ2 protein in *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} mice further enhanced D-hair firing. Thus, we conclude that mechanosensitivity of D-hair fibers is directly modulated at their peripheral nerve endings by both KCNQ3 and KCNQ2.

ZUSAMMENFASSUNG

Der durch KCNQ (K_v7) Kanäle vermittelte M-Strom spielt eine wichtige Rolle für elektrische Eigenschaften von Zellen. Als intrinsische Spannungsklemme stabilisieren KCNQ Kanäle demnach das Ruhemembranpotential und verhindern Übererregbarkeit, wie Epilepsieverursachende Mutationen in den humanen Genen für *KCNQ2* und *KCNQ3* verdeutlichen. Neben der Expression im Gehirn konnten die neuronalen KCNQ Ionenkanäle 2 – 5 auch im somatosensorischen System nachgewiesen werden. Hier wurden in vorangegangenen Arbeiten *KCNQ2*, -3 und -5 bereits mit Schmerzempfindung assoziiert, während *KCNQ4* Expression in einer bestimmten Unterpopulation von Spinalganglien Neuronen identifiziert werden konnte. In diesen sogenannten schnell-adaptierenden niedrig-schweligen A β -Fasern ist *KCNQ4* an der Perzeption taktiler Vibrationsstimuli beteiligt. Darüber hinaus wurde durch pharmakologische Versuche die Expression von KCNQ Kanälen in A δ niedrig-schweligen D-Haar Fasern gezeigt. Nichtsdestotrotz konnte die in diesen Fasern exprimierte KCNQ Untereinheit bisher noch nicht identifiziert werden. Die Identifikation der exprimierten KCNQ Untereinheit(en) in D-Haar Fasern erfolgte hier mit Hilfe der elektrophysiologischen Haut-Nerv Präparation, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in unserem Labor etabliert wurde. Die Generierung eines konstitutiven *KCNQ5* knock-out Mausmodells diente zusammen mit weiteren KCNQ Mausmodellen der eingehenden Erforschung der KCNQ Expression im somatosensorischen System.

Ich konnte die Lokalisation sowohl von *KCNQ2* als auch -3 in D-Haar A δ -Fasern von Spinalganglien zeigen. Ferner konnte ich die Expression von *KCNQ3* in der Haut in peripheren lanzettförmigen Nervenendigungen kutaner D-Haar Rezeptorfasern um Haarfollikel beschreiben, wo *KCNQ3* an der Modulierung der Mechanotransduktion beteiligt sein könnte. In der Tat wiesen D-Haar Fasern von *Kcnq3*^{-/-} Mäusen in der Haut-Nerv Präparation eine erhöhte Feuerfrequenz als Reaktion auf mechanische Stimulation des rezeptiven Feldes auf. Dieser Effekt trat insbesondere bei langsamen Stimulationsgeschwindigkeiten hervor. Die zusätzliche Verminderung der *KCNQ2* Protein Menge in *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Mäusen führte zu einer weiteren Verstärkung des D-Haar Feuerns. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse ein Bild entstehen, in dem *KCNQ3* und *KCNQ2* die Mechanosensitivität von D-Haar Fasern direkt an ihren jeweiligen peripheren Nervenendigungen zu modulieren vermag.

1 EINLEITUNG

Bereits 1843 wurde der Begriff Membranpore das erste Mal von Ernst Brücke in Zusammenhang mit osmotischen Prozessen erwähnt (Brücke, 1843; Hille, 1988). Julius Bernstein legte dann Anfang des 20. Jahrhunderts durch die Aufstellung der Membrantheorie (Bernstein, 1902) das Fundament für die weitere Erforschung der Informationsübermittlung im Nervensystem. Hierin beschrieb er die Existenz einer semipermeablen Membran um Nerven- und Muskelzellen, und postulierte als Ursache des Membranpotentials eine Ungleichverteilung von Kalium-Ionen. Die Beschreibung von Aktionspotentialen im Riesenaxon des Tintenfisches durch Hodgkin und Huxley stellte die fundamentale Bedeutung spannungsgesteuerter Ionenkanäle heraus (Hodgkin and Huxley, 1952). Mittlerweile wurden über 140 spannungsgesteuerte Ionenkanäle beschrieben, die sich auf spannungsgesteuerte Calcium (Ca^{2+}), Natrium (Na^+), Kalium (K^+) und Chlorid (Cl^-) Kanäle verteilen (Harmar et al., 2009). Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (K_v -Kanäle) bestehen aus 12 Unterfamilien, die im Menschen von 40 Genen exprimiert werden (Tian et al., 2014). Die Spezifität dieser Kanäle für Kalium Ionen wird durch eine hoch konservierte Aminosäure Sequenz (die sogenannte GYG Signalsequenz) sichergestellt. Durch den Austausch der sechs das Kalium Ion umgebenden Wassermoleküle ermöglicht diese Sequenz die selektive Transmission von K^+ .

Zu den spannungsgesteuerten K_v Kanälen zählen unter anderem KCNQ (K_v7) Kanäle, die aus den fünf Untereinheiten $\text{K}_{v7.1} - \text{K}_{v7.5}$, bzw. KCNQ1 – KCNQ5 bestehen. KCNQ2 – KCNQ5 werden aufgrund ihrer Expression im Nervensystem auch als neuronale KCNQ Kanäle bezeichnet (Jentsch, 2000; Brown and Passmore, 2009), während sich der KCNQ1 Kanal vornehmlich in Herzzellen befindet (Soldovieri et al., 2011) (Abbildung 1). Die große physiologische Bedeutung der KCNQ Kanäle wird dadurch verdeutlicht, dass Mutationen in vier der fünf KCNQ Kanälen (KCNQ1 – KCNQ4) humanen Erkrankungen wie Herzrhythmusstörungen, Taubheit und Epilepsie zugrunde liegen (Jentsch, 2000) (Tabelle 1).

In den folgenden Abschnitten dieser Einleitung werden im ersten Kapitel 1.1 zunächst allgemein strukturelle und funktionelle Eigenschaften von KCNQ Kanälen vorgestellt, bevor dieses Kapitel durch KCNQ Kanal assoziierte Krankheiten abgerundet wird. Eine detaillierte Abhandlung der KCNQ Kanäle 2, 3, 4 und 5 ist Inhalt der drei darauf folgenden Kapitel 1.2, 1.3 und 1.4. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Erforschung der KCNQ Untereinheiten im somatosensorischen System liegt, wird dieses abschließend im fünften und gleichzeitig letzten Kapitel der Einleitung 1.5 vorgestellt.

1.1 Struktur und Funktion von KCNQ Kanälen

1.1.1 Homomere und heteromere KCNQ Kanäle

Wie spannungsgesteuerte Kaliumkanäle allgemein (MacKinnon, 1991), sind auch KCNQ Kanäle strukturell aus vier α -Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembran-Domänen (S1-S6) aufgebaut, die eine gemeinsame Pore bilden (Abbildung 2A,B) (Gutman et al., 2005). Aufgrund des Fehlens der Kristallstruktur von KCNQ Kanälen beruht das bisherige Wissen über die Struktur und den Aufbau der jeweiligen KCNQ Untereinheiten auf Hydrophobizitäts-Vorhersagen und Homologie-Modellen bekannter Kaliumkanäle (Doyle et al., 1998; Long et al., 2005). Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Der lange C-Terminus ist involviert im Transport, in der Anordnung, sowie im Öffnungsverhalten der KCNQ Untereinheiten (Haitin and Attali, 2008). Das Arginin-reiche S4 Segment stellt den Spannungssensor dar, und die zwischen dem S5 und S6 Segment befindliche P-Schleife bildet den Selektivitätsfilter der Pore aus.

Tabelle 1 | KCNQ Kanäle: Expression, Krankheiten und Heteromerisierung

Untereinheit	Expression	Assoziierte Krankheiten	Heteromerisierung mit
KCNQ1	Herz, Cochlea, Eingeweide, glatte Muskulatur, Epithelgewebe	Long QT-Syndrom (Romano-Ward-Syndrom (RWS); Jervell-und Lange-Nielsen-Syndrom (JLNS))	KCNE Untereinheiten
KCNQ2	ZNS, PNS	Benigne familiäre neonatale Krampfanfälle (BFNS)	KCNQ3
KCNQ3	ZNS, PNS	Benigne familiäre neonatale Krampfanfälle (BFNS)	KCNQ2, KCNQ4, KCNQ5
KCNQ4	Hirnstamm, PNS, Innenohr, glatte Muskulatur	Autosomal dominante Taubheit (DFNA2)	KCNQ3, KCNQ5
KCNQ5	ZNS, PNS, Skelettmuskulatur, glatte Muskulatur	-	KCNQ3, KCNQ4

Alle fünf KCNQ Untereinheiten können homomere Kanäle bilden. Die Bildung heteromerer Kanäle beschränkt sich hingegen lediglich auf bestimmte Kombinationen (Schroeder et al., 1998, 2000a; Kubisch et al., 1999; Lerche et al., 2000; Bal et al., 2008) (Tabelle 1). KCNQ1 ist demnach nicht in der Lage, Heteromere mit den vier neuronalen KCNQ Untereinheiten 2 bis 5 einzugehen. Stattdessen interagiert KCNQ1 mit Mitgliedern der KCNE Genfamilie, welches β -Untereinheiten mit einer Transmembran Domäne darstellen (Barhanin et al., 1996; Sanguinetti et al., 1996; Schroeder et al., 2000b). KCNQ3 bildet dagegen heteromere KCNQ Kanäle mit allen anderen neuronalen KCNQ Untereinheiten (Schroeder et al., 1998, 2000a; Kubisch et al., 1999; Yus-Nájera et al., 2003; Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Cooper, 2010). Auch für KCNQ4 und -5 konnte Heteromerbildung gezeigt werden (Bal et al., 2008). Interessanterweise führt die Ko-Expression von KCNQ2 und -3 in *Xenopus* Oocyten zu einer größeren Stromamplitude verglichen mit der alleinigen Expression einer der beiden Untereinheiten (Schroeder et al., 1998; Wang et al., 1998; Yang et al., 1998) (Abbildung 2C,D).

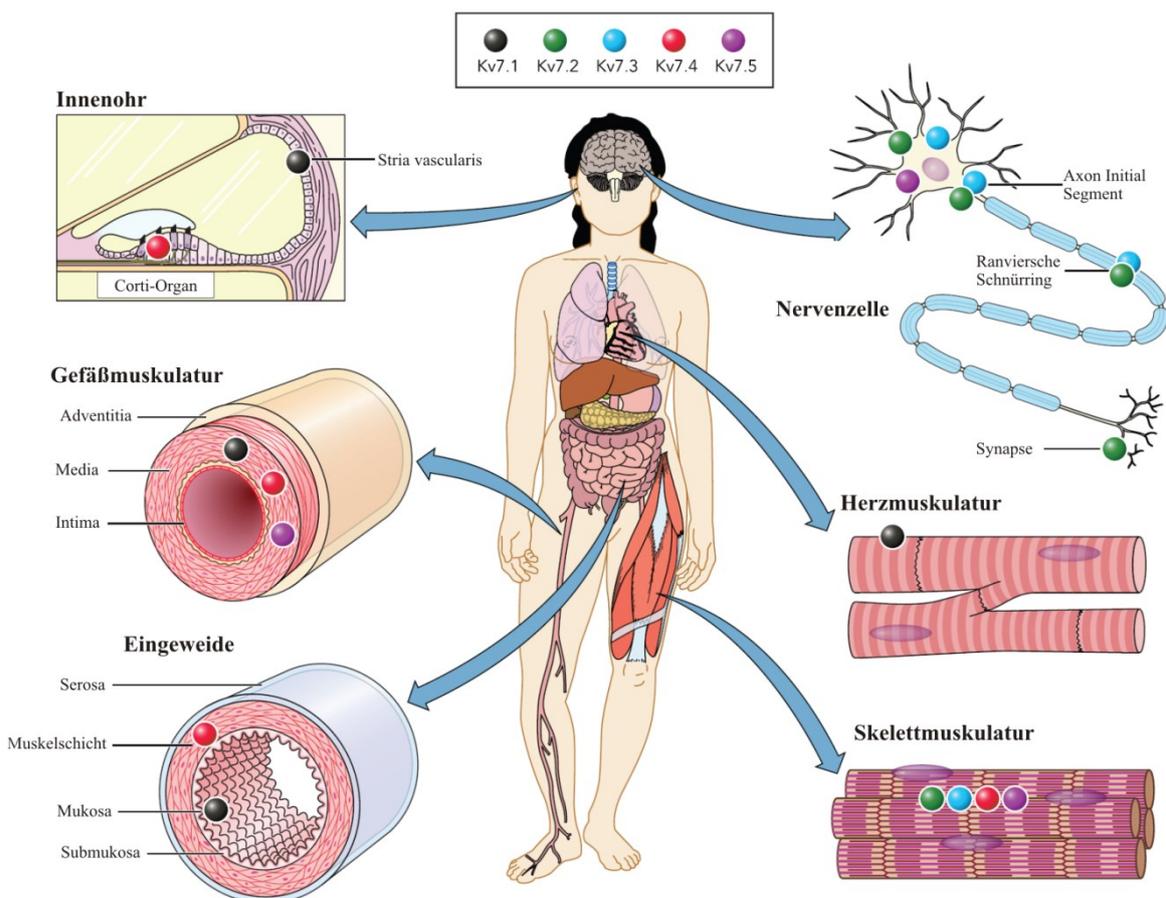


Abbildung 1 | Gewebeerexpressionsverteilung von KCNQ Untereinheiten

Schematische Darstellung der Expression der verschiedenen KCNQ Untereinheiten. KCNQ Lokalisation konnte nachgewiesen werden für das ZNS, PNS, Innenohr und Eingeweide, sowie für Herz-, Skelett- und glatte Muskulatur (modifiziert nach Soldovieri et al., 2011).

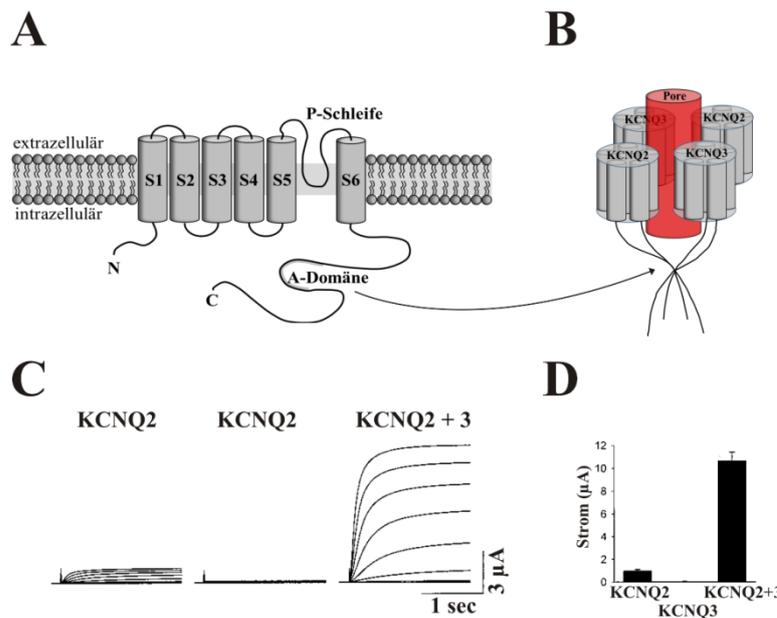


Abbildung 2 | Bildung von homomeren und heteromeren KCNQ Kanälen

(A) Struktur einer KCNQ Untereinheit bestehend aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) (modifiziert nach Jentsch, 2000 & Delmas and Brown, 2005). Zwischen S5 und S6 befindet sich die P-Schleife, die den Selektivitätsfilter der Pore bildet. Das Segment S4 dient als Spannungssensor. Innerhalb des langen C-Terminus befindet sich die hoch konservierte A-Domäne, die die Untereinheiten Zusammensetzung des Kanals bestimmt (Schwake et al., 2000, 2003; Maljevic et al.,

2003). (B) Vier KCNQ Untereinheiten ordnen sich zu einem Tetramer. Nur bestimmte Untereinheiten sind in der Lage miteinander Heteromere zu bilden (modifiziert nach Delmas and Brown, 2005). (C) Zwei-Elektroden Spannungsklemme an homomeren und heteromeren KCNQ2 und -3 Kanälen in *Xenopus* Oocyten. Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV werden Ströme durch 10 mV Spannungsschritte von -60 bis 0 mV aktiviert. Die heteromere Expression von KCNQ2 und -3 führt zu größeren Strömen als die alleinige homomere Expression einer der beiden Untereinheiten. (D) Histogramm der Stromantwort von mit KCNQ2 und/oder KCNQ3 mRNA injizierten Oocyten bei einer Spannungsklemme von 0 mV, ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV (C,D modifiziert nach Wang et al., 1998).

1.1.2 Der M-Strom

Der M-Strom I_M ist charakterisiert als ein nicht-inaktivierender, durch Depolarisation langsam aktivierender auswärts rektifizierender Kaliumstrom. Er wurde erstmals 1980 von Brown und Adams in sympathischen Neuronen des Ochsenfroschs beschrieben (Brown and Adams, 1980). Ein Jahr später gelang dies auch in sympathischen Neuronen von Ratten (Constanti and Brown, 1981). Während eines Aktionspotentials lässt sich der M-Strom vom sogenannten A-Strom unterscheiden, der von Kaliumkanälen der Unterfamilien K_v1 - K_v4 generiert wird (Abbildung 3A) (Shieh et al., 2000; Maljevic and Lerche, 2014). Die zuletzt genannten spannungsabhängigen Kaliumkanäle produzieren einen der direkten Repolarisation dienenden, schnellen Kaliumstrom im Anschluss der Depolarisationsphase der spannungsabhängigen Natriumkanäle. Der M-Strom dagegen aktiviert bei unter-schweligen Spannungen um -60 mV und dient der Stabilisierung des Membranpotentials. Der Name M-Strom beruht auf der inhibitorischen Eigenschaft muskarinischer Stimulation (Abbildung 3B). 1998 wurden KCNQ2 und -3 als ein molekulares Korrelat des M-Stroms identifiziert (Wang et al., 1998).

Anschließend konnten auch KCNQ4 und -5 Eigenschaften des M-Stroms nachgewiesen werden (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000a; Shah et al., 2002; Hansen et al., 2008).

Mittlerweile konnte der M-Strom in vielen verschiedenen neuronalen Zelltypen identifiziert werden (Jentsch, 2000). Neben sympathischen Neuronen, in denen die Anwesenheit des M-Stroms entscheidend dafür ist, ob Neuronen tonisch oder phasisch feuern (Wang and McKinnon, 1995), wurde der M-Strom auch in sensorischen Neuronen (Passmore et al., 2003) und in Pyramidenneuronen des Hippocampus (Halliwell and Adams, 1982) beschrieben. M-Strömen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Es konnte demnach gezeigt werden, dass M-Ströme repetitives Feuern kontrollieren, indem Aktionspotentiale durch die Aktivierung von M-Strömen unterdrückt werden (Brown and Passmore, 2009). Die Inhibierung von M-Strömen, entweder pharmakologisch durch Linopirdine (Aiken et al., 1995), oder durch die Expression eines dominant negativen KCNQ2 Konstrukts (Peters et al., 2005), verstärkt dagegen repetitives Feuern. Eine weitere Funktion wird M-Strömen bei der Kontrolle endogenen Feuerns zugeschrieben (Brown and Passmore, 2009). Hierbei wirken auswärts gerichtete M-Ströme dämpfend auf die nach Aktionspotentialen folgenden Nach-Depolarisationen. Die pharmakologische Blockade von M-Strömen durch Linopirdine oder XE991 verstärkt dagegen Nach-Depolarisationen und führt letztendlich zu höher frequentem Feuern (Yue and Yaari, 2004). Die dem M-Strom zugrunde liegenden KCNQ2 und -3 wurden in großem Ausmaß an Axon Initial Segmenten (AIS) lokalisiert (Chung et al., 2006; Pan et al., 2006; Rasmussen et al., 2007), Bereiche, die der Generierung von Aktionspotentialen dienen. Die dortige Lokalisation dient der Kontrolle der Aktionspotential-Schwelle und der Unterdrückung spontanen Feuerns (Brown and Passmore, 2009). Die besondere Bedeutung von M-Kanälen für neuronale Erregbarkeit wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass eine 25%ige Reduktion heteromerer KCNQ2/3 Kanäle bereits ausreichend für die Übererregbarkeit der benignen familiären neonatalen Krampfanfälle (BFNS) ist (Schroeder et al., 1998).

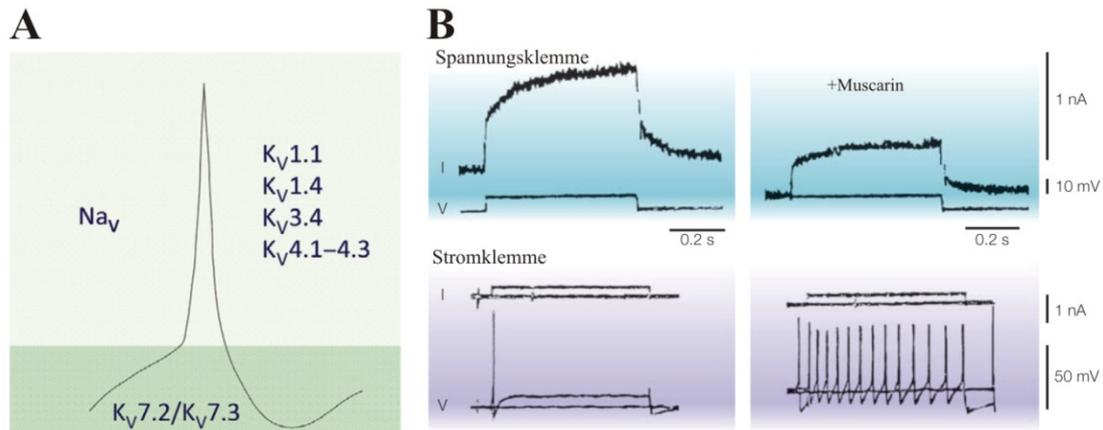


Abbildung 3 | Der M-Strom

(A) Viele Kaliumkanäle der Unterfamilien K_V1-K_V4 sind an der Repolarisationsphase eines Aktionspotentials beteiligt. Die den M-Strom generierenden neuronalen KCNQ Kanäle sind dagegen im Anschluss während der unterschwelligen Membranpotentials aktiv, und dienen der Stabilisierung des Membranpotentials (aus Maljevic and Lerche, 2014). (B) Eine Depolarisation von -50 mV auf -40 mV löst unter Spannungsklemme den typisch auswärts gerichteten M-Strom aus. Die Injektion eines depolarisierenden Stroms führt unter Stromklemme zu einem einzelnen Spike. Muscarin-Applikation verdeutlicht die inhibitorische Wirkung auf den M-Strom. Nach der Injektion eines depolarisierenden Stroms kommt es in der Folge zu hochfrequentem Spiking (modifiziert nach Delmas and Brown, 2005).

1.1.3 Regulatorische Mechanismen des M-Stroms

M-Ströme können auf diversen extra- und intrazellulären Ebenen regulatorisch beeinflusst werden. G-Proteine sowie viele sekundäre Botenstoffe wie intrazelluläres Calcium, Arachidonsäure, Tyrosinkinase und zyklische ADP-Ribose sind an der Regulation der M-Ströme beteiligt (Jentsch, 2000; Delmas and Brown, 2005; Soldovieri et al., 2011). M-Kanäle können nicht nur durch die Aktivierung G-Protein gekoppelter, muskarinischer Acetylcholin Rezeptoren (mAChR) gehemmt werden (Brown and Adams, 1980), sondern auch durch eine Vielzahl weiterer G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Hierzu zählen unter anderem die metabotropen Glutamatrezeptoren mGluR1 und mGluR5, der Histaminrezeptor H1, der Serotoninrezeptor 5-HT_{2C}, die Nukleotidrezeptoren P2Y_{1,2,4,6}, sowie Peptidrezeptoren für Gonadoliberin (GnRH), Substanz P, Bradykinin und Angiotensin (Marrion, 1997; Brown and Passmore, 2009). Die G-Protein vermittelte Inhibierung des M-Stroms stellt eine indirekte Antwort dar, die über die Aktivierung der Phospholipase C zu einer Verringerung der Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) Konzentration führt (Abbildung 4) (Suh and Hille, 2002; Zhang et al., 2003; Winks et al., 2005). Eine niedrige PIP₂ Konzentration verursacht hierbei eine Herabsetzung der Einzelkanal-Offenwahrscheinlichkeit bei KCNQ2-5 (Li et al., 2005). Eine hohe PIP₂ Konzentration stabilisiert dagegen den offenen Zustand.

Das PIP₂ Hydrolyse Produkt Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) verursacht des Weiteren die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern (Abbildung 4). Dieses bindet den regulatorischen Ca²⁺-Sensor Calmodulin (CaM), welcher konstitutiv am C-Terminus von KCNQ2 und -3 befestigt ist (Wen and Levitan, 2002; Yus-Najera et al., 2002). Letztlich führt dieser Mechanismus zur Inhibierung der KCNQ Kanäle (Selyanko and Brown, 1996; Cruzblanca et al., 1998; Bofill-Cardona et al., 2000; Gamper and Shapiro, 2003; Shahidullah et al., 2005). Auch das zweite PIP₂ Hydrolyse Produkt Diacylglycerine (DAG) wirkt inhibitorisch auf KCNQ Kanäle. So führt die DAG vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C über ein zwischengeschaltetes Adapterprotein, das A-Kinase Verankernde Protein (AKAP) zur Phosphorylierung und anschließenden Hemmung von KCNQ2 (Abbildung 4) (Hoshi et al., 2003).

Im Gegensatz zu diesen auf den M-Strom inhibitorisch wirkenden Signalwegen wurde für die Neurotransmitter Somatostatin, Cortistatin und Dynorphin eine M-Strom aktivierende Wirkung nachgewiesen (Moore et al., 1988; de Lecea et al., 1996; Madamba et al., 1999), die unter anderem über den Phospholipase A2 – Arachidonsäure Signalweg vermittelt wird (Schweitzer et al., 1990).

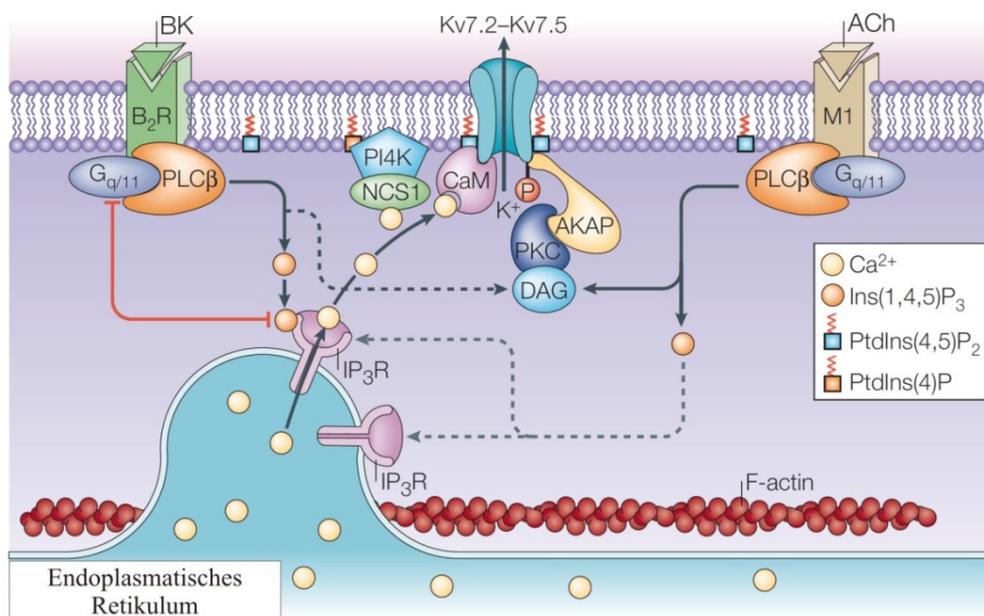


Abbildung 4 | Regulatorische Mechanismen des M-Stroms

Schematische Übersicht über Kontrollmechanismen des M-Stroms. Erläuterungen im Haupttext. Abkürzungen: ACh, Acetylcholin; AKAP, A-Kinase Verankerndes Protein; BK, Bradykinin; B₂R, Bradykinin Rezeptor B2; CaM, Calmodulin; DAG, Diacylglycerine; G_{q/11}, Unterklasse eines G-Protein gekoppelten Rezeptors; Ins(1,4,5)P₃, Inositol 1,4,5-trisphosphat; IP₃R, Inositol trisphosphat Rezeptor; M1, muskarinischer Acetylcholin Rezeptor M1; NCS1, Neuronaler Calcium Sensor-1; PI4K, Phosphoinositid 4-kinase; PKC, Proteinkinase C; PLCβ, Phospholipase Cβ; PtdIns(4)P, Phosphatidylinositol 4-phosphat; PtdIns(4,5)P₂, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (modifiziert nach Delmas and Brown, 2005).

1.1.4 KCNQ Kanal assoziierte Krankheiten

Mutationen in KCNQ Kanälen können zu einer Vielzahl verschiedener Krankheiten führen (Jentsch, 2000; Soldovieri et al., 2011). Hierzu zählt das Long QT-Syndrom, welches unter anderem durch Mutationen im *KCNQ1* Gen ausgelöst werden kann (Wang et al., 1996). Diese Krankheit wird durch eine Verlängerung der QT-Zeit im Elektrokardiogramm (EKG) mit frequenzkorrigierter QT-Zeit von über 440 ms charakterisiert. Dies macht sich bemerkbar durch anfallsweise auftretendes Herzrasen (Tachykardie), oftmals in Form der lebensbedrohlichen Torsade-de-pointes-Tachykardien. Klinisch lässt sich das angeborene Long-QT-Syndrom in die zwei Erscheinungsformen des autosomal dominanten Romano-Ward- (RWS) und des autosomal rezessiven Jervell-und Lange-Nielsen-Syndroms (JLNS) unterscheiden. Während das RWS lediglich das Herz betrifft, führt das seltenere JLNS aufgrund der zusätzlich gestörten Bildung der Endolymphe und den daraus resultierenden Beeinträchtigungen des Innenohrs auch zu Taubheit (Wang et al., 1996; Maljevic et al., 2010). Knapp 300 verschiedene *KCNQ1* Mutationen konnten bisher in Patienten mit Long QT-Syndrom identifiziert werden (Peroz et al., 2009). Diese können unterschiedlichste Auswirkungen haben, wie inkorrekte Proteinfaltung, fehlerhafte Anordnung der Untereinheiten, Transportdefekte und verfrühter Abbau des Kanalkomplexes (Schmitt et al., 2000, 2007; Krumerman et al., 2004; Boulet et al., 2006; Dahimène et al., 2006; Seebohm et al., 2008; Peroz et al., 2009). Weitere *KCNQ1* Mutationen beeinflussen durch eine verstärkte Inaktivierung oder verlangsamte Aktivierung auch die Kinetik des Kanals (Franqueza et al., 1999; Seebohm et al., 2001, 2005). Im Gegensatz zu den genannten Funktionsverlust-Mutationen des Long QT-Syndroms, konnten auch wenige Funktionsgewinn-Mutationen nachgewiesen werden. Diese werden mit Vorhofflimmern (FAF) und dem short QT-Syndrom assoziiert (Chen et al., 2003; Bellocq et al., 2004).

Mutationen in den Genen für *KCNQ2* und *KCNQ3* können zu BFNS führen (Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Singh et al., 1998). BFNS stellt eine autosomal dominant vererbte Neugeborenen Epilepsieform dar, die charakterisiert ist von ein bis drei Minuten andauernden Krampfanfällen, begleitet von Atemstillständen (Apnoen), Augenbewegungen, sowie tonischen und klonischen Äußerungen (Ronen et al., 1993). BFNS verursachende Mutationen im *KCNQ2* Gen sind dabei ungefähr zehn Mal häufiger als für *KCNQ3* (Abbildung 5) (Biervert et al., 1998; Charlier et al., 1998; Singh et al., 1998; Biervert and Steinlein, 1999; Lerche et al., 1999; Hirose et al., 2000; Jentsch, 2000; Lee et al., 2000; Soldovieri et al., 2011). Für das *KCNQ3* Gen beschriebene Mutationen stellen ausschließlich

sinnverändernde Mutationen dar, während *KCNQ2* Mutationen sowohl Deletionen und Duplikationen, als auch sinnverändernde, non-sense und zur Verschiebung des Leserasters führende Mutationen beinhalten (Soldovieri et al., 2011). Diese Mutationen führen entweder zu einem verringerten zellulären Niveau der entsprechenden KCNQ Untereinheit, oder beeinflussen den intrazellulären Transport oder die Funktion in der Plasmamembran (Dedek et al., 2001; Castaldo et al., 2002; Soldovieri et al., 2006, 2007), was letztendlich zu einer Verringerung des M-Stroms führt. Es wurde vermutet, dass bereits eine relativ geringe mutationsbedingte Reduzierung des M-Stroms von ungefähr 25% für die Entstehung von BFNS ausreichend ist (Schroeder et al., 1998).

Mutationen im *KCNQ2* Gen können neben BFNS auch epileptische Enzephalopathie (EE), das Ohtahara Syndrom und infantile Spasmen auslösen (Singh et al., 2003; Millichap and Cooper, 2012; Saitsu et al., 2012; Weckhuysen et al., 2012; Orhan et al., 2014). Ein Screen in EE Patienten konnte 2012 offen legen, dass 10% dieser Patienten Träger von Mutationen im *KCNQ2* Gen sind (Weckhuysen et al., 2012). Die Mehrheit der zu EE führenden Mutationen weist aufgrund starker dominant-negativer Effekte größere funktionelle Defekte auf als die zu BFNS führenden Mutationen. Dies äußert sich unter anderem in stärkeren epileptischen Anfällen (Maljevic and Lerche, 2014). Auch eine der häufigsten Epilepsieformen der Kindheit, die Rolando-Epilepsie, bzw. auch gutartige Epilepsie im Kindesalter mit zentrotemporalen Spikes (BCECTS) genannt, wird mit Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3* in Verbindung gebracht (Coppola et al., 2003; Neubauer et al., 2008).

Neben dem Zentralen Nervensystem (ZNS) wird *KCNQ2* auch im Peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert (Passmore et al., 2003). Zwei Mutationen im S4 Segment von *KCNQ2* sind hier ursächlich für die Periphere Nerv Übererregbarkeit (PNH) (Abbildung 5) (Dedek et al., 2001; Wuttke et al., 2007). Diese zu den Neuromyotonien zählende Krankheit wird durch eine erhöhte Erregbarkeit der Skelettmuskulatur gekennzeichnet, die klinisch zu unwillkürlichen, tonischen Muskelverkrampfungen, Faszikulationen und Myokymien führt (Hart et al., 2002).

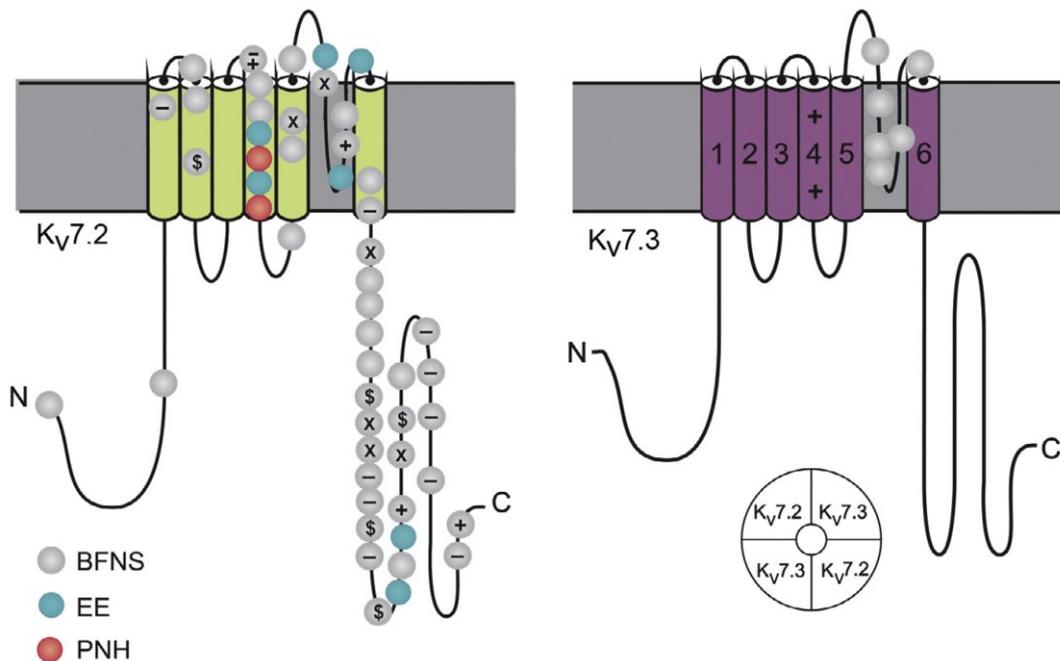


Abbildung 5 | Krankheitsverursachende Mutationen in *KCNQ2* und *KCNQ3*

Schematische Darstellung der Struktur von *KCNQ2* und *KCNQ3* mit den vorhergesagten Positionen für Mutationen für benigne familiäre neonatale Krampfanfälle (BFNS), epileptische Enzephalopathie (EE) und die Periphere Nerv Übererregbarkeit (PNH). Vor allem der cytoplasmatische C-Terminus, der Spannungssensor S4 und die S1-S2 Region von *KCNQ2*, als auch die Porenregion von *KCNQ2* und -3 sind von Mutationen betroffen. Zu beachten ist die deutlich erhöhte Anzahl von Mutationen in *KCNQ2* im Vergleich zu *KCNQ3* (aus Maljevic and Lerche, 2014).

Auch Mutationen im *KCNQ4* Gen können zu humanen Erkrankungen, wie der autosomal dominanten Taubheit DFNA2 führen (Kubisch et al., 1999). Entsprechende Mutationen verursachen aufgrund chronischer Depolarisation eine langsame Degeneration der äußeren Haarzellen der Cochlea, was sich zu einem fortschreitenden Hörverlust entwickelt (Kharkovets et al., 2006). Die DFNA2 verursachenden Mutationen im *KCNQ4* Gen stellen hauptsächlich sinnverändernde Mutationen dar, die durch dominant-negative Effekte die Anordnung und Funktion der Wildtyp Untereinheiten behindern (Coucke et al., 1999; Kubisch et al., 1999; Talebizadeh et al., 1999; Van Hauwe et al., 2000; Su et al., 2007; Hildebrand et al., 2008; Mencía et al., 2008). In geringerem Umfang treten auch Deletionen auf, die zu Haploinsuffizienz führen (Coucke et al., 1999; Kamada et al., 2006). *KCNQ5* stellt die einzige *KCNQ* Untereinheit dar, für die bisher keine krankheitserzeugende Mutation beschrieben wurde.

1.2 KCNQ2 und KCNQ3

1.2.1 Gewebe Expressionsmuster von KCNQ2 und KCNQ3

Wie bereits in Abbildung 1 und Tabelle 1 schematisch dargestellt, konnte eine prominente Expression von KCNQ2 und -3 vornehmlich in Neuronen nachgewiesen werden. Im Gehirn weisen KCNQ2 und -3 demnach ein großflächiges Expressionsmuster auf, mit Lokalisation in Hippocampus, Kortex, Putamen, Amygdala, Thalamus, Substantia nigra und Caudate nucleus (Biervert et al., 1998; Schroeder et al., 1998; Tinel et al., 1998; Yang et al., 1998). Im Hippocampus befinden sich KCNQ2 und -3 vornehmlich in Pyramidenzellen und Körnerzellen der CA1 Region (Devaux et al., 2004) und sind an der mittleren und langsamen Nach-Hyperpolarisation (AHP) beteiligt (Gu et al., 2005; Peters et al., 2005; Tzingounis and Nicoll, 2008). Neben diesen zentralnervösen Neuronen wurde die Expression von KCNQ2 und -3 auch in Neuronen des PNS gezeigt (Passmore et al., 2003). Verschiedene Studien konnten demnach den M-Strom und seine molekularen Korrelate KCNQ2 und -3 in nozizeptiven Fasern nachweisen (Passmore et al., 2003, 2012; Linley et al., 2008; Liu et al., 2010; Rose et al., 2011; Vetter et al., 2013).

Subzellulär lokalisieren KCNQ2 und -3 vornehmlich an Axon Initial Segmenten (AIS) und Ranvierschen Schnürringen (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Cooper, 2010). Dies sind Bereiche, die an der Bildung und Weiterleitung von Aktionspotentialen beteiligt sind. Das Adapterprotein Ankyrin G wird für die vollständige Organisation der AIS verantwortlich gemacht (Rasband, 2010). In der Tat besitzen KCNQ2 und -3 an ihrem C-Terminus eine kurze konservierte Peptidsequenz, die der Interaktion mit Ankyrin G dient (Pan et al., 2006). Bei den anderen, nicht an AIS und Ranvierschen Schnürringen lokalisierenden KCNQ Untereinheiten fehlt diese Sequenz.

1.2.2 KCNQ2 und KCNQ3 Maus Modelle

Mausmodelle dienen der Untersuchung verschiedenster biologischer Mechanismen und pharmakologischer Fragestellungen, sowie als Modell für humane Erkrankungen. Die Bedeutung von knock-out Mäusen für die biomedizinische Forschung wurde 2007 durch den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für Martin Evans, Mario Capecchi und Oliver Smithies hervorgehoben. Auch für KCNQ2 und -3 wurden bereits verschiedene Mausmodelle beschrieben.

Homozygote *Kcnq2*^{-/-} Mäuse sterben wenige Stunden nach Geburt aufgrund pulmonaler Atelektase (Watanabe et al., 2000). Hierbei kommt es zum Kollabieren von Lungenabschnitten mit dem Resultat, dass die Alveolarwände aneinander anliegen. Heterozygote *Kcnq2*^{+/-} Mäuse sind dagegen lebensfähig und entwickeln keine spontanen Krampfanfälle. Jedoch zeigen sie eine erhöhte Sensitivität für die Krampfauslösende Substanz Pentetrazol (Watanabe et al., 2000). Das bicyclische Tetrazol-Derivat Pentetrazol stellt einen nicht-kompetitiven GABA_A-Rezeptor Antagonisten dar (Squires et al., 1984), und fördert den Einstrom von Ca²⁺- und Na⁺-Ionen (Papp et al., 1987), was letztendlich zur Depolarisation und schließlich zur krampfauslösenden Wirkung von Pentetrazol führt. Die perinatale Letalität der *Kcnq2*^{-/-} Mäuse lässt sich mit Hilfe des Cre/loxP-Systems und der Generierung von gewebespezifisch konditionalen knock-out Mäusen umgehen. Der EMX1-Cre vermittelte homozygote Knock-out von KCNQ2 in Pyramidenzellen des Hippocampus verdeutlicht die besondere Bedeutung des KCNQ2 Proteins (Soh et al., 2014). Demnach besitzen Pyramidenzellen von *Kcnq2*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *Kcnq3*^{-/-} Mäusen und WT Kontrolltieren eine erhöhte Erregbarkeit. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der homozygote Knock-out von KCNQ2 auch zu einer erheblichen Reduzierung der KCNQ3 Proteinmengen führt. Der Knock-out von KCNQ3 hatte dagegen keinen vergleichbaren Effekt auf die Proteinmengen anderer KCNQ Kanäle. Obwohl der exakte Mechanismus, der in der Abwesenheit von KCNQ2 zum Verlust des KCNQ3 Proteins führt, bisher noch ungeklärt ist, wurde vermutet, dass KCNQ3 Kanäle ein Endoplasmatisches Retikulum (ER) Retentions-Motiv besitzen, welches durch die Anwesenheit von KCNQ2 maskiert wird (Nakajo and Kubo, 2008). Demnach führt das Fehlen von KCNQ2 zu einer Akkumulation von KCNQ3 im ER und zur Aktivierung des ER-assoziierten Abbaus (Soh et al., 2014). Im Unterschied hierzu konnte bei KCNQ2 kein vergleichbares Motiv gefunden werden. Für den Transport von KCNQ2 aus dem ER wird stattdessen Calmodulin benötigt (Gamper et al., 2005; Etxeberria et al., 2008; Alaimo et al., 2009; Kosenko et al., 2012).

Der Pax3-Cre vermittelte konditionale Knock-out von KCNQ2 ermöglichte auch im peripheren Nervensystem eine detaillierte Untersuchung von KCNQ2 (King et al., 2014). Auch hier zeigte sich, dass der Verlust des KCNQ2 Proteins zu erhöhter Erregbarkeit führt.

Die Überexpression einer KCNQ2 Untereinheit mit einer dominant-negativen Porenmutation in einem Mausmodell führte aufgrund der gemeinsamen Anordnung mit nativen KCNQ Untereinheiten zur Unterdrückung des M-Stroms (Peters et al., 2005). Mit Hilfe des Tet-Off Systems (Gossen and Bujard, 1992), einer Methode der reversiblen

Kontrolle der Genexpression, lässt sich die mutierte KCNQ2 Untereinheit mit Hilfe von Tetracyclin zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten aktivieren. Abhängig vom Zeitpunkt der Expression des Transgens entwickelten diese Mäuse spontane Krampfanfälle, Hyperaktivität und morphologische Veränderungen im Gehirn.

Auch knock-in Mausmodelle mit BFNS verursachenden KCNQ2 und -3 Mutationen wurden generiert und untersucht (Singh et al., 2008). Homozygote Tiere weisen demnach reduzierte M-Ströme auf und entwickeln spontane Krampfanfälle, während heterozygote Tiere eine verringerte Krampfschwelle besitzen. Interessanterweise konnte die Anfalls-Anfälligkeit in Zusammenhang mit dem Geschlecht, dem Mausstamm und dem entsprechenden Anfallstest gebracht werden (Otto et al., 2009).

Kommerziell erhältliche *Kcnq3*^{-/-} Mäuse (Deltagen Inc., San Mateo, CA) wurden 2008 von Tzingounis und Nicoll hinsichtlich der Nach-Hyperpolarisation untersucht (Tzingounis and Nicoll, 2008).

1.3 KCNQ4

1.3.1 Gewebe Expressionsmuster von KCNQ4

Wie in Abbildung 1 bereits dargestellt zeigt KCNQ4 eine prominente Expression im Corti'schen Organ des Innenohrs, wo KCNQ4 an der basolateralen Membran der äußeren Haarzellen lokalisiert und am Ausstrom von K⁺-Ionen beteiligt ist (Kubisch et al., 1999; Kharkovets et al., 2000). Der dortige Funktionsverlust von KCNQ4 kann zu einer chronischen Überladung der äußeren Haarzellen mit K⁺-Ionen führen, was letztendlich ursächlich für eine fortschreitende Degeneration dieser Zellen sein mag (Kharkovets et al., 2006). Kürzlich konnte ferner gezeigt werden, dass KCNQ4 im Vestibularorgan nicht präsynaptisch in Typ I Haarzellen lokalisiert, sondern sich auf der postsynaptischen Seite der Calyx-bildenden Neuronen befindet (Spitzmaul et al., 2013).

Zusätzlich konnte KCNQ4 auch im Gehirn nachgewiesen werden (Kharkovets et al., 2000). Gleichwohl weist KCNQ4 dort im Vergleich zu den anderen neuronalen KCNQ Kanälen ein nicht so breites Expressionsmuster auf. Demnach konzentriert sich die Lokalisation von KCNQ4 vornehmlich auf Kerne des Hirnstammes sowie bestimmte Teile des auditorischen Weges. Ferner konnte KCNQ4 auch in Kernen des *Nervus trigeminus* gefunden werden, welche der Vermittlung somatosensorischer Informationen dienen. In der Tat konnte KCNQ4 kürzlich in einer kleinen Population sensorischer DRG Neuronen im peripheren

Nervensystem nachgewiesen werden (Heidenreich et al., 2011). Demnach befand sich KCNQ4 sowohl in diesen schnell-adaptierenden A β -Fasern, als auch in den damit assoziierten lanzettförmigen und zirkulären Nervenendigungen um Haarfollikel und in Meissner Körperchen. Dies veranschaulicht die funktionelle Rolle von KCNQ4 bei der Modulierung von Tastempfindungen.

1.3.2 KCNQ4 Mausmodelle

Zur Untersuchung der Funktion von KCNQ4 bei Hörverlust wurden zwei Mausmodelle in unserer Arbeitsgruppe generiert (Kharkovets et al., 2006). Zum einen ist dies ein knock-in Mausmodell mit einer dominant negativen DFNA2 Mutation (G286S), die der humanen Mutation G285S entspricht (Kubisch et al., 1999), und zum anderen ein konstitutiver Knock-out von KCNQ4. Beide Mausmodelle entwickeln einen fortschreitenden Hörverlust, der mit der Degeneration der äußeren Haarzellen einhergeht (Kharkovets et al., 2006). Mit Hilfe dieser beiden Mausmodelle konnte in unserer Arbeitsgruppe die bereits oben beschriebene Funktion von KCNQ4 im peripheren Nervensystem beleuchtet werden (siehe hierzu Kapitel 1.3.1) (Heidenreich et al., 2011).

1.4 KCNQ5

1.4.1 Gewebe Expressionsmuster von KCNQ5

KCNQ5 wurde als letztes Mitglied der KCNQ Familie aufgrund von Homologie zu KCNQ3 identifiziert (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000a). Die Gewebe-Expressionsverteilung von KCNQ5 ähnelt der von KCNQ2 und -3. Während die Spleißvariante I im Gehirn nachgewiesen werden konnte, lokalisieren Varianten II und III in der Skelettmuskulatur (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000a). Wie KCNQ2 und -3, konnte auch die Expression von KCNQ5 im Hippocampus, Kortex, Putamen, Amygdala, Substantia nigra, Nucleus subthalamicus und Caudate nucleus gezeigt werden (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000a). Trotz dieses vergleichbaren Expressionsmusters unterscheidet sich KCNQ5 in seiner physiologischen Funktion von KCNQ2 und -3. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, befinden sich KCNQ2 und -3 vornehmlich in der CA1 Region des Hippocampus in Pyramiden- und Körnerzellen, wo sie subzellulär an AIS und Ranvierschen Schnürringen lokalisieren. Aufgrund dieser subzellulären Lokalisation an Regionen der Bildung von Aktionspotentialen führt die Beeinträchtigung von KCNQ2 und -3 zu Übererregbarkeit und

Epilepsie. KCNQ5 weist dagegen ein erhöhtes Expressionsmuster in Pyramidenzellen und Interneuronen der CA3 Region des Hippocampus auf (Tzingounis et al., 2010; Fidzinski et al., 2015). Im Unterschied zu KCNQ2 und -3 wurde KCNQ5 hier allerdings nicht an AIS gefunden, sondern postsynaptisch an inhibitorischen Synapsen dieser Zellen (Fidzinski et al., 2015). Dadurch dient KCNQ5 der Dämpfung der synaptischen Inhibition. Die Beeinträchtigung von KCNQ5 führt demzufolge auch zur Hemmung der Erregbarkeit des Hippocampus (Fidzinski et al., 2015). Dies erklärt auch das Fehlen eines KCNQ2/3-ähnlichen neurologischen Phänotyps in *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen.

Neben dieser zentralnervösen Lokalisation konnte auch im PNS die Expression von KCNQ5 gezeigt werden (Passmore et al., 2003). Hier wurde auch für KCNQ5, ähnlich wie bereits für KCNQ2 und -3, eine Rolle in Nozizeption postuliert (King and Scherer, 2011). Ferner wurde KCNQ5 auch in nicht-neuronalen Geweben, wie Skelettmuskulatur (Roura-Ferrer et al., 2008; Yeung et al., 2008; Iannotti et al., 2010) und glatter Muskulatur (Yeung et al., 2007) entdeckt. Die Expression von KCNQ5 in der Tunica media von Blutgefäßen wird mit der Regulation des Gefäßtonus in Verbindung gebracht (Brueggemann et al., 2007).

1.4.2 KCNQ5 Maus Modelle

Ein knock-in Mausmodell mit einer dominant negativen *Kcnq5* Mutation wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe generiert. Hierfür wurde das erste Glycin der GYG Poren Signalsequenz in ein Serin mutiert (G278S). Dies entspricht einer humanen Mutation im *KCNQ1* Gen, die zum Long QT-Syndrom führt (Russell et al., 1996), und einer Mutation im *KCNQ4* Gen, die bei DFNA2 Patienten gefunden wurde (Kubisch et al., 1999). Für diese in der Porensequenz befindliche Art der Mutation von *Kcnq* Genen konnte ein dominant negativer Effekt nachgewiesen werden (Schroeder et al., 1998, 2000a; Kubisch et al., 1999). Mit Hilfe dieses Mausmodells konnte demnach gezeigt werden, dass KCNQ5 an der langsamen und mittleren Nach-Hyperpolarisation (sAHP und mAHP) in Pyramidenzellen der CA3 Region des Hippocampus beteiligt ist (Tzingounis et al., 2010). Das dominant negative KCNQ5 knock-in Mausmodell zeichnet sich hierbei durch den beeinträchtigten Transport des KCNQ5 Proteins in die Peripherie aus, was letztlich in einer erhöhten somatischen Lokalisation des dominant negativen KCNQ5 Proteins im Vergleich zum WT resultiert (Spitzmaul et al., 2013; Fidzinski et al., 2015). Der Vorteil der dominant negativen KCNQ5 Strategie liegt schließlich auch darin begründet, dass jegliche heteromeren KCNQ Kanäle mit mindestens einer KCNQ5 Untereinheit inaktiviert werden. Letztendlich führt dies auch dazu, dass kompensatorische

KCNQ2/3 Kanäle, wie sie evtl. in *Kcnq5*^{-/-} Mäusen entstehen, ausgeschlossen werden können. Der Nachteil dieses dominant negativen knock-in Mausmodells besteht allerdings darin, dass *Kcnq5*^{dn/dn} Mäuse aufgrund der noch vorhandenen Expression des KCNQ5 Proteins nicht als Negativ-Kontrollen für zum Beispiel immunhistochemische Untersuchungen verwendet werden können. Aus diesem Grund war die Generierung eines konstitutiven KCNQ5 KO Mausmodells unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Das somatosensorische System

Bereits Aristoteles unterschied zwischen den klassischen fünf Sinnen, dem Sehen, Hören, Riechen, Schmecken und Tasten, bzw. der visuellen, auditiven, olfaktorischen, gustatorischen und taktilen Wahrnehmung (Aristoteles, n.d.). Das somatosensorische System ist demnach dem fünften Sinn zuzuordnen. Im Gegensatz zu den anderen vier Sinnen, gibt es in der Somatosensorik kein speziell ausgebildetes Sinnesorgan vergleichbar mit den Augen, den Ohren, der Nase oder der Zunge. Dahingegen dient eine Vielzahl über den ganzen Körper verteilt liegender verschiedener Rezeptor-Typen und freier Nervenendigungen der Aufnahme sensorischer Informationen aus unserer Umwelt. Die Haut stellt hierbei das größte sensorische Organ dar, und ist in der Lage, so unterschiedliche Reize wie Schmerz, Temperaturempfinden und Juckreiz, als auch Vibrationen, Druck und Tastinformationen an das zentrale Nervensystem weiterzuleiten.

Mit diesem abschließenden Kapitel der Einleitung soll ein Überblick über das somatosensorische System vermittelt werden. Zunächst werden Eigenschaften somatosensorischer Neurone vorgestellt, und es wird auf die Einteilung und Charakterisierung primär sensorischer Neuronen eingegangen (Kapitel 1.5.1). Sensorische Fasern assoziieren mit verschiedenen, spezialisierten Endorganen in der Haut, die jeweils der Perzeption unterschiedlicher Reize dienen. Die Anatomie und Physiologie dieser verschiedenen Strukturen wird in einem weiteren Kapitel behandelt (Kapitel 1.5.2). Ein eigenes Kapitel widmet sich anschließend spezifischer, molekularer Markerproteine mit Hilfe derer unterschiedliche somatosensorische Neurone identifiziert und voneinander unterschieden werden können (Kapitel 1.5.3). Mechanotransduktion beschreibt den Prozess der Umwandlung mechanischer Stimuli in elektrische Signale, und ist Inhalt des abschließenden Kapitels über das somatosensorische System (Kapitel 1.5.4).

1.5.1 Eigenschaften und Klassifizierung somatosensorischer Neurone

Somatosensorische Neurone sind pseudounipolare Nervenzellen. Diese werden dadurch charakterisiert, dass sie lediglich ein Axon und einen Dendriten besitzen, die aus einem gemeinsamen Fortsatz des Zellkörpers hervorgehen. Die Zellkörper liegen im Fall somatosensorischer Neurone entweder im *Ganglion trigeminale* (Ganglion Gasseri) oder in den im Wirbelkanal befindlichen Spinalganglien (DRG) (Abbildung 6). In den folgenden Kapiteln wird lediglich auf die Nervenzellen der DRG eingegangen. Das *Ganglion trigeminale* stellt eine Ansammlung von Nervenzellkörpern der afferenten Neurone des fünften Hirnnervs (Nervus trigeminus) dar und ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

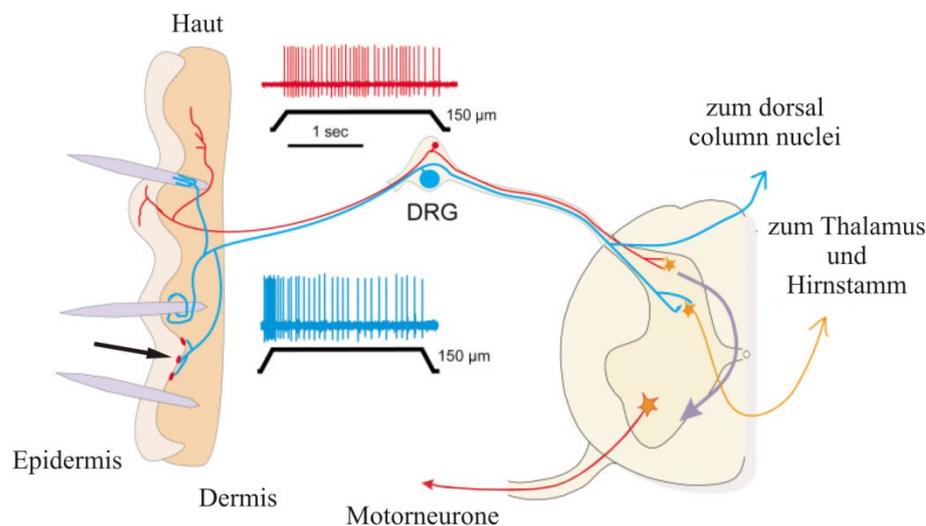
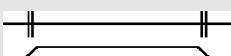
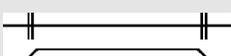
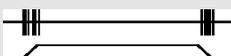
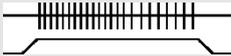


Abbildung 6 | Anatomie und funktionelle Organisation somatosensorischer Neurone

Die Zellkörper somatosensorischer, pseudounipolarer Neurone befinden sich in den Spinalganglien (DRGs). Hier wird exemplarisch das Antwortverhalten eines niedrig-schweligen Mechanorezeptors (LTMR) (blau) und eines hoch-schweligen Mechanorezeptors (HTMR) bzw. Nozizeptors (rot) zu einer „ramp and hold“ Stimulation (schwarz) abgebildet. Die Reizaufnahme dieser Fasern erfolgt in der Peripherie in der Haut. Dort innervieren LTMRs entweder Haare oder assoziieren mit unterschiedlichen Tast-Endorganen, wie mit den hier abgebildeten Merkel Zellen (Pfeil). Nozizeptoren bilden freie Nervenendigungen sowohl in der Epidermis als auch der Dermis aus. Während Nozizeptoren dadurch gekennzeichnet sind, dass sie lediglich auf statische Stimuli reagieren, feuern LTMRs auch auf Bewegungsreize. LTMRs können Kollaterale zu den dorsalen column nuclei senden, als auch direkte monosynaptische Verbindungen mit Neuronen des Hinterhorns bilden. Auch nozizeptive Fasern bilden Synapsen im Hinterhorn aus (modifiziert nach Lewin and Moshourab, 2004).

Tabelle 2 | Vergleich kutaner Mechanorezeptoren (modifiziert nach Abraira and Ginty, 2013)

Subtyp	Assoziierte Faser (Leitungsgeschwindigkeit)	Hauttyp	Endorgan	Lage	Optimaler Stimulus	Feuereigenschaften
SAI-LTMR	A β (Mensch: 16-96ms ⁻¹)	Unbehaart	Merkel Zelle	Basale Schicht der Epidermis	Druck	
	Maus: >10ms ⁻¹)	Behaart	Merkel Zelle („touch dome“)	Um Guard Haarfollikel		
SAII-LTMR	A β (Mensch: 20-100ms ⁻¹)	Unbehaart	Ruffini	Dermis	Dehnung	
	Maus: >10ms ⁻¹)	Behaart	Unklar	Unklar		
RAI-LTMR	A β (Mensch: 26-91ms ⁻¹)	Unbehaart	Meissner-Körpuskel	Hautpapillen	Hautbewegung, Vibration	
	Maus: >10ms ⁻¹)	Behaart	Longitudinal lanzettförmige Endigungen	Guard/ Awl-Auchene Haarfollikel	Auslenkung des Haarfollikels	
RAII-LTMR	A β (Mensch: 30-90ms ⁻¹) Maus: >10ms ⁻¹)	Unbehaart	Pacini-Körperchen	Dermis	Vibration	
A δ -LTMR	A δ (Mensch: 5-30ms ⁻¹) Maus: 1-10ms ⁻¹)	Behaart	Longitudinal lanzettförmige Endigungen	Awl-Auchene/ Zigzag Haarfollikel	Auslenkung des Haarfollikels	
C-LTMR	C (Mensch: 0.2-2ms ⁻¹) Maus: <1ms ⁻¹)	Behaart	Longitudinal lanzettförmige Endigungen	Awl-Auchene/ Zigzag Haarfollikel	Auslenkung des Haarfollikels	
AM	A δ (Mensch: 5-30ms ⁻¹) Maus: 1-10ms ⁻¹)	Unbehaart, Behaart	Freie Nervenendigungen	Epidermis/ Dermis	Schmerz	
C-Faser Nozizeptor	C (Mensch: 0.2-2ms ⁻¹) Maus: <1ms ⁻¹)	Unbehaart, Behaart	Freie Nervenendigungen	Epidermis/ Dermis	Schmerz	

Somatosensorische DRG Neurone können anhand verschiedener Kriterien voneinander unterschieden werden (Lewin and Moshourab, 2004; Bautista and Lumpkin, 2011; Abraira and Ginty, 2013). Ein wichtiges Merkmal stellt hierbei die Leitungsgeschwindigkeit der Nervenfasern dar. Diese hängt wiederum vom Grad der Myelinisierung, dem Axon Durchmesser und der Zellkörpergröße ab. Es lassen sich demnach A β -, A δ - und C-Fasern voneinander unterscheiden (Tabelle 2) (Brown and Iggo, 1967; Rice and Albrecht, 2008). A β -Fasern stellen aufgrund ihrer Fasern mit großem Durchmesser und dicker Myelinschicht

schnell leitende Nerven dar. Eine im Vergleich zu A β -Fasern etwas geringere Leitungsgeschwindigkeit weisen A δ -Fasern auf. Dieser Fasertyp besitzt dünne Axone mit einer dünnen Myelin-Ummantelung. C-Fasern fehlt im Gegensatz zu A β - und A δ -Fasern eine Myelinschicht, weshalb C-Fasern im Vergleich mit diesen beiden Fasertypen eine sehr langsame Leitungsgeschwindigkeit aufweisen. Alle drei Fasertypen projizieren ins Hinterhorn des Rückenmarks. Hier lässt sich eine weitere Unterscheidung vornehmen. So finden sich die Endigungen der A β -Fasern in Lamina II, III, IV und V, die der A δ -Fasern in Lamina I und V, während C-Faser Endigungen in Lamina I und II projizieren (Abbildung 7) (Basbaum et al., 2009). In den folgenden Kapiteln werden die drei Fasertypen A β -, A δ - und C-Faser eingehender beschrieben. Zusätzlich wird auf die weitere Unterteilung dieser Fasern aufgrund verschiedener Kriterien eingegangen.

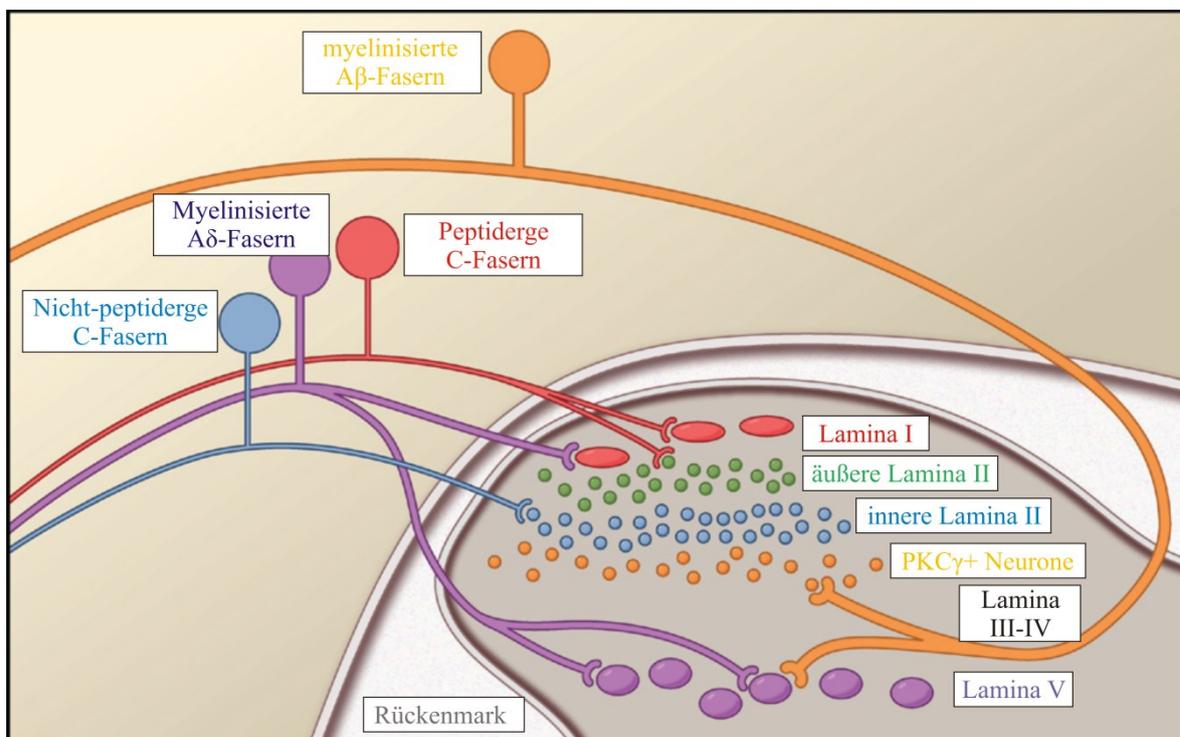


Abbildung 7 | Die Verbindungen primär afferenter Fasern mit dem Rückenmark

Das dorsale Horn des Rückenmarkes weist eine sehr klare laminaire Organisation auf, in der unterschiedliche primär afferente Fasern mit Neuronen klar definierter Lamina assoziieren. Demnach bilden unmyelinisierte, peptiderge C-Fasern (rot) und myelinisierte A δ -Fasern Nozizeptoren (lila) Synapsen mit Neuronen der Lamina I (rot) und der äußeren Lamina II (grün). Die myelinisierten A δ -Fasern enden zusätzlich auch an Neuronen der Lamina V (lila). Unmyelinisierte, nicht-peptiderge Nozizeptoren (blau) assoziieren mit Interneuronen (blau) der inneren Lamina II, während myelinisierte A β -Fasern (orange) sowohl an PKC γ -positiven Interneuronen der Lamina II (orange) und Neuronen der Lamina V (lila) enden (modifiziert nach Basbaum et al., 2009).

1.5.1.1 A β -Fasern

Wie oben bereits beschrieben, sind A β -Fasern durch ihre dicke Myelin-Ummantelung, große Zelldurchmesser und eine schnelle Leitungsgeschwindigkeit charakterisiert. A β -Fasern, die lediglich während der Bewegungsphase eines mechanischen Stimulus feuern, nicht aber bei dem statischen Stimulus, werden als schnell-adaptierende (RA) A β -Faser bezeichnet. Diese werden abgegrenzt von den langsam-adaptierenden (SA) A β -Fasern, die durch ein Feuerverhalten sowohl während des Bewegungsreizes, als auch des statischen Stimulus charakterisiert sind (Tabelle 2). Sowohl RA als auch SA A β -Fasern können weiter aufgegliedert werden. SAI und SAII A β -Fasern können aufgrund der Regelmäßigkeit des Feuerverhaltens während der statischen Phase voneinander unterschieden werden (Wellnitz et al., 2010). Somit wurde gezeigt, dass SAI Fasern sehr unregelmäßige Interspike Intervalle aufweisen, während SAII Fasern durch ein regelmäßiges Feuerverhalten gekennzeichnet sind. Die rezeptiven Felder von SAII A β -Fasern sind des Weiteren ungefähr fünfmal so groß wie die von SAI Fasern. Auch wird die Haut von SAII A β -Fasern weniger dicht innerviert, verglichen mit SAI Fasern. SAI und SAII A β -Fasern sind ferner auch für unterschiedliche Reizaufnahmen verantwortlich. Dies zeigt sich daran, dass SAI A β -Fasern im Vergleich zu SAII A β -Fasern sechsmal so sensitiv sind für Druck, während SAII A β -Fasern eine bis zu viermal höhere Sensitivität für Haut-Dehnungen aufweisen (Edin, 1992; Johnson et al., 2000). Illustriert wird dies auch dadurch, dass die beiden unterschiedlichen Fasertypen mit verschiedenen, für unterschiedliche Reize verantwortlichen Endorganen in der Haut assoziieren. SAI A β -Fasern bilden mit Merkel Zellen die sogenannten Merkel Zell-Neurit Komplexe aus (Merkel, 1875; Iggo and Muir, 1969; Munger et al., 1971; Halata et al., 2003; Woodbury and Koerber, 2007). Für SAII A β -Fasern wurde dagegen die Innervation von Ruffini-Körperchen (Ruffini, 1894) postuliert (Chambers et al., 1972). Die Details der unterschiedlichen Endorgane sensorischer afferenter Fasern werden in Kapitel 1.5.2 dargestellt. Wie SA A β -Fasern werden auch RA A β -Fasern weiter aufgegliedert in RAI und RAII A β -Fasern. RAI A β -Fasern bilden kleine rezeptive Felder und reagieren auf niedrig frequente Stimuli (1-10 Hz), während RAII Antworten mit größeren rezeptiven Feldern und höher frequenten Vibrationen (80-300 Hz) assoziiert werden (Talbot et al., 1968; Knibestöl, 1973; Johansson et al., 1982; Bolanowski and Zwislocki, 1984; Vallbo and Johansson, 1984; Leem et al., 1993). In unbehaarter Haut sind beide RA-Fasertypen anatomisch mit Korpuskeln verknüpft. Bei RAI A β -Fasern stellen dies die Meissner-Korpuskel dar, bei RAII A β -Fasern die Pacini-Korpuskel. Auch diese beiden Endorgane werden in Kapitel 1.5.2 näher beschrieben. In behaarter Haut bilden RAI A β -Fasern

des Weiteren auch sogenannte longitudinale lanzettförmige Endigungen um Haarfollikel von Guard und Awl/Auchene Haaren aus (Millard and Woolf, 1988; Woodbury et al., 2001; Li et al., 2011). Diese dienen der Perzeption von Vibrationen im Frequenzbereich von 10 bis 50 Hz (Konietzny and Hensel, 1977; Heidenreich et al., 2011) und entsprechen von der Reizaufnahme her demnach den Meissner-Korpuskeln der unbehaarten Haut.

1.5.1.2 A δ -Fasern

Im Vergleich zu A β -Fasern zeichnen sich A δ -Fasern durch eine dünnere Myelinschicht, kleinere Zelldurchmesser und eine geringere Leitungsgeschwindigkeit aus. Wie A β -Fasern können auch A δ -Fasern weiter unterteilt werden, zum einen in die sogenannten D-Haar niedrig-schwelligen Mechanorezeptoren (LTMRs), zum anderen in die hoch-schwelligen Mechanorezeptoren (HTMRs), auch A Mechanorezeptoren (AM) genannt. Die erstgenannten, als D-Haar Fasern bezeichneten Neurone stellen die sensitivsten Mechanorezeptoren der Haut dar (Brown and Iggo, 1967; Koltzenburg et al., 1997). Sie wurden erstmals 1967 in der Katze beschrieben (Brown and Iggo, 1967). Der Name D-Haar bzw. ‚Down-hair‘ rührt daher, dass die selektive Bewegung von Sinus bzw. Unter-Haaren (engl. Down-hair) der Katze zur Aktivierung dieses Rezeptors führt. Vom Feuerverhalten her sind D-Haar Neurone zu den schnell-adaptierenden Fasern zu zählen. Vergleichbar den RA A β -Fasern ist auch für D-Haar Fasern die Sensitivität auf Bewegungsreize mechanischer Stimuli charakteristisch (Tabelle 2). Wie RA A β -Fasern formen auch D-Haar Fasern longitudinale lanzettförmige Endigungen um Haarfollikel. Im Gegensatz zu RA A β -Fasern assoziieren sie hingegen mit Haarfollikeln von Awl/Auchene und Zigzag Haaren (Li et al., 2011). Der direkte Nachweis für D-Haar Fasern im Menschen konnte noch nicht erbracht werden (Lechner and Lewin, 2013). Mikroneurographische Untersuchungen lassen die Existenz von niedrig-schwelligen A δ -Fasern im Menschen zwar vermuten (Adriaensen et al., 1983). Allerdings fehlt hier noch der direkte Nachweis der Identität als D-Haar Faser Rezeptor.

Neben diesen niedrig schwelligen D-Haar Tastrezeptoren repräsentieren ungefähr zwei Drittel der A δ -Fasern hoch-schwellige A δ -Mechanorezeptoren (A δ -HTMRs) (Adriaensen et al., 1983; Koltzenburg et al., 1997). Diese werden auch als A δ -Faser Mechanorezeptor (AM) bezeichnet, und stellen Schmerzrezeptoren mit freien Nervenendigungen in der Epidermis behaarter und unbehaarter Haut dar. Im Gegensatz zu D-Haar A δ -Fasern feuern AM A δ -Fasern lediglich als Reaktion auf statische Reize und nicht auf Bewegungsreize (Tabelle 2)

(Garell et al., 1996). Neben den rein mechanonozizeptiven AMs besitzen ungefähr 20% der AM-Fasern eine zusätzliche Sensitivität für Hitzereize (Caterina et al., 2000; Cain et al., 2001; Milenkovic et al., 2014).

1.5.1.3 C-Fasern

C-Fasern bilden mit 60-70% die größte Gruppe an somatosensorischen Neuronen (Lewin and Moshourab, 2004). Ähnlich wie A δ -Fasern sind auch manche C-Fasern mit Haarfollikeln von Awl/Auchene und Zigzag Haaren assoziiert. Dort bilden sie die sogenannten C-Faser niedrig-schweligen Mechanorezeptoren (C-LTMRs) (Douglas and Ritchie, 1957; Iggo, 1960; Iggo and Kornhuber, 1977). Mit Haarfollikeln assoziierte C-Fasern wurden erstmals in der Katze beschrieben und sind bereits seit längerer Zeit bekannt (Zotterman, 1939); trotzdem wurde diesen Fasern in den darauf folgenden Jahren zunächst wenig Beachtung geschenkt (Lechner and Lewin, 2013). Erst mikroneurographische Messungen konnten darlegen, dass diese Fasern tatsächlich ziemlich häufig in menschlicher Haut vorkommen (Johansson et al., 1988). Daraufhin konnten C-LTMRs auch in der Haut der Maus (Seal et al., 2009), der Ratte (Leem et al., 1993) und von Affen (Kumazawa and Perl, 1977) beschrieben werden. Funktionell wird diesen Fasern eine Rolle bei wohltuenden Empfindungen zugeschrieben (Löken et al., 2009; Olausson et al., 2010; Vrontou et al., 2013; McGlone et al., 2014).

Der Großteil der C-Fasern ist allerdings den HTMRs zuzuordnen, und zählt neben AMs zu den Schmerzfasern. Basierend auf der Expression von Neuropeptiden können Nozizeptoren in zwei große neurochemische Gruppen unterteilt werden. Zum einen sind dies die peptidergen Nozizeptoren, die Neuropeptide wie Substanz P oder Calcitonin Gen-Verwandtes Peptid (CGRP) enthalten. Zum anderen stellen dies die nicht-peptidergen Nozizeptoren dar, die größtenteils durch Bindung an Isolectin-B4 charakterisiert sind (Ribeiro-da-Silva et al., 1989; Perry and Lawson, 1998). C-Faser Nozizeptoren werden aufgrund der Sensitivität für mechanische, chemische und Temperatur-Reize größtenteils als polymodal betrachtet (Bessou and Perl, 1969). In Kapitel 1.5.2.6 wird eingehender auf die Eigenschaften und Unterscheidung verschiedener Nozizeptoren eingegangen.

1.5.2 Anatomische und physiologische Eigenschaften sensorischer Endorgane und freier Nervenendigungen

Wie im vorherigen Kapitel bereits angerissen, assoziieren unterschiedliche Fasertypen mit verschiedenen taktilen Endorganen oder bilden freie Nervenendigungen in der Epidermis. Spezialisierte Endorgane helfen dabei, aus der Vielzahl sensorischer Reize die auf unseren Körper bzw. unsere Haut treffen, zu unterscheiden. Zum einen ist es von elementarer Bedeutung, harmlose von schädigenden Reizen unterscheiden zu können, um dem Körper eine darauf angemessene Reaktion zu ermöglichen. Zum anderen gilt es auch aus der Fülle der verschiedenen Taststimuli zu differenzieren. Somit müssen Druck, Hautdehnungen, Vibrationen und das sanfte Streichen über die Haut voneinander unterschieden werden. Hierzu haben sich unterschiedliche Strukturen herausgebildet, die die selektive Perzeption spezifischer Reize ermöglichen (Abbildung 8). Diese sensorischen Endorgane und freien Nervenendigungen der Nozizeptoren sollen in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden. Aufgrund der größeren Relevanz für die vorliegende Arbeit wird der Schwerpunkt hier auf die Betrachtung der mit Haarfollikeln assoziierten Nervenendigungen sowie der freien Nervenendigungen der Nozizeptoren gelegt.

1.5.2.1 Merkel Zell-Neurit Komplexe

Merkel Zellen wurden 1875 das erste Mal durch Friedrich Sigmund Merkel aufgrund der engen Assoziation mit Nervenfasern als ‚Tastzellen‘ beschrieben und infolgedessen dem Tastempfinden zugeordnet (Merkel, 1875). In der Tat sind Merkel Zellen vermehrt in tastsensitiven Bereichen der Haut zu finden. Hierzu zählen die Fingerspitzen und Lippen, sowie die Schnurrhaare von Säugetieren, als auch die sogenannten ‚touch domes‘, welche spezialisierte Areale in behaarter Haut darstellen (Merkel, 1875; Iggo and Muir, 1969; Lacour et al., 1991; Boot et al., 1992; Halata et al., 2003). Merkel Zellen stellen epitheliale Zellen dar, die in engem räumlichem Kontakt mit A β sensorischen Fasern stehen, und in der basalen Schicht der Epidermis sogenannte Merkel Zell-Neurit Komplexe ausbilden (Abbildung 8). Anatomisch sind diese Kontakte mit Synapsen zu vergleichen (Hartschuh and Weihe, 1980; Gu et al., 1981; Hartschuh et al., 1990; Fagan and Cahusac, 2001; Hitchcock et al., 2004). Die Identifikation von synaptischen Proteinen wie Piccolo, SNARE-Komplex Proteinen und

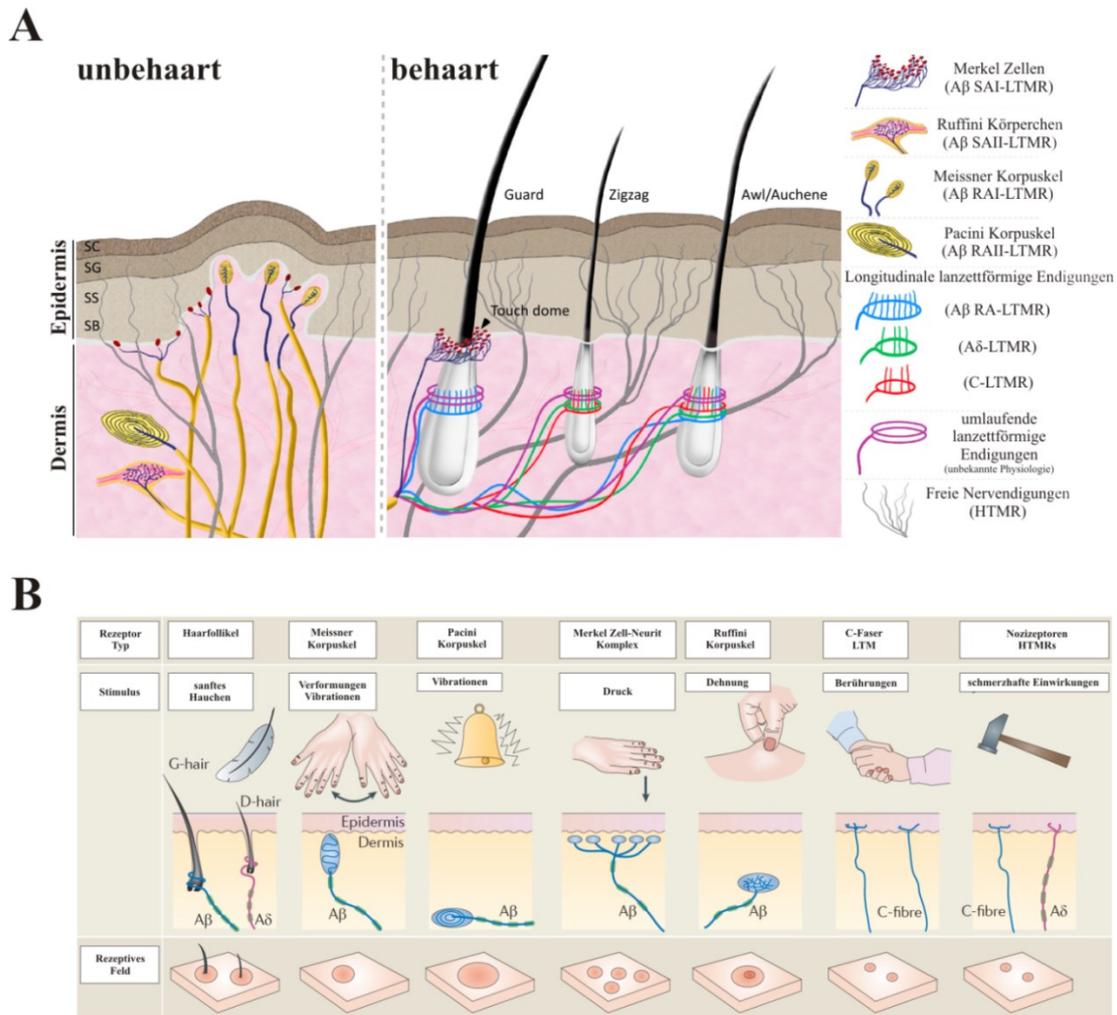


Abbildung 8 | Organisation mechanosensorischer Fasern in unbehaarter und behaarter Haut von Säugetieren

(A) Die Mechanorezeption unterscheidet sich in unbehaarter und behaarter Haut. In unbehaarter Haut befinden sich vier verschiedene, mit A β -Fasern assoziierte Mechanorezeptoren. In der basalen Schicht der Epidermis liegen die Merkel Zell-Neurit Komplexe. Meissner-Körpuskel lokalisieren in Haut Papillen, während Ruffini-Körperchen und Pacini-Körpuskel sich in tiefen Schichten der Dermis befinden. In behaarter Haut werden taktile Stimuli größtenteils durch drei mit unterschiedlichen Nervenfasern verbundenen Haar Typen vermittelt. Guard Haare sind mit A β -Fasern assoziiert, Awl/Auchene Haare werden dreifach innerviert von A β -, A δ - und C-Fasern, während Zigzag Haare mit A δ - und C-Fasern verbunden sind. Hinzu kommt bei allen drei Haar-Typen die Innervation durch zirkuläre Endigungen, deren genauen physiologischen Eigenschaften noch ungeklärt sind. Zur Perzeption von Schmerz werden in der Epidermis unbehaarter sowie behaarter Haut durch AM A δ - und C-HTMR Fasern freie Nervenendigungen gebildet (verändert nach Abaira and Ginty, 2013). (B) Jede dieser sensorischen Nervenendigungen dient der spezifischen Aufnahme bestimmter Reize. Mit Guard Haar und D-Haar Follikel assoziierte Nervenendigungen dienen der Wahrnehmung von Haar-Auslenkungen. Sowohl Meissner- als auch Pacini-Körpuskel dienen der Perzeption von Vibrationen (Pacini-K.: höher-frequent; Meissner-K.: niedrig-frequent). Merkel Zell-Neurit Komplexe nehmen die Oberflächenstruktur von Gegenständen und mechanischen Druck wahr. Ruffini-Körpuskel erkennen Hautdehnungen. Niedrig-schwellige C-Fasern sind für die Wahrnehmung angenehmer Körperberührungen zuständig, während hoch-schwellige C-Faser und A δ -Faser Endigungen für die Aufnahme von Schmerzempfindungen verantwortlich sind. Auch die Größe der rezeptiven Felder variiert zwischen den unterschiedlichen Rezeptortypen. Pacini-Körpuskel besitzen demnach sehr große rezeptive Felder, während diese bei Nozizeptoren sehr viel kleiner sind (modifiziert nach Delmas et al., 2011). Abkürzungen: SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; SB, stratum basalis.

Synaptotagminen konnte die präsynaptischen Eigenschaften von Merkel Zellen bestätigen (Haeberle et al., 2004). Untersuchungen der Ultrastruktur von Merkel Zellen konnten weiterhin zeigen, dass diese 1-2 μm lange Mikrovilli besitzen, die in die darüber liegenden Keratinozyten projizieren, mit denen Merkel Zellen über Desmosomen verbunden sind (Munger, 1965; Brown and Iggo, 1967; Iggo and Muir, 1969).

Der adäquate Stimulus zur Aktivierung von Merkel Zell-Neurit Komplexen stellt Druck dar. Die daraus resultierende Antwort der assoziierten SAI A β -Fasern zeichnet sich durch anhaltendes, langsam-adaptierendes Feuerverhalten aus, welches durch eine große Streuung der Interspike Intervalle gekennzeichnet ist. Charakteristisch für Merkel Zell-Neurit Komplexe ist die hohe räumliche Auflösung (bis zu 0.5 mm für einzelne SAI A β -Fasern) und Sensitivität für Objekteigenschaften wie Kanten und Rundungen (Johnson, 2001).

1.5.2.2 Ruffini-Körperchen

Neben Merkel Zellen stellen Ruffini-Körperchen die zweiten Endorgane dar, die vermutlich mit SA A β -Fasern assoziieren. Im Gegensatz zu den bereits relativ gut erforschten Merkel Zell-Neurit Komplexen, fehlt für Ruffini-Körperchen allerdings noch der direkte Nachweis der Assoziation mit SA A β -Fasern. Hinzu kommt, dass in Nagern bisher noch keine Ruffini-Körperchen oder Ruffini-ähnlichen Strukturen nachgewiesen werden konnten (Abraira and Ginty, 2013). Ruffini-Körperchen wurden erstmals 1894 durch Angelo Ruffini als kleine, eingekapselte Nervenendigungen in der Dermis beschrieben (Ruffini, 1894). Morphologisch sind Ruffini-Körperchen mit Golgi-Sehnenorganen zu vergleichen. Sie sind 100-200 μm große, dünne, spindelförmige Zylinder, die aus mehreren Schichten perineuralen Gewebes mit Schwann-Zellen und Kollagen-Fasern aufgebaut sind. Im Inneren befinden sich die Nervenendigungen, die von einer mit Flüssigkeit gefüllten Kapsel umhüllt sind (Chambers et al., 1972; Halata, 1977). Es wird vermutet, dass SAII A β -Fasern mechanische Hautdehnungen über Kollagen Fasern der Ruffini-Körperchen wahrnehmen (Maeda et al., 1999; Rahman et al., 2011).

1.5.2.3 Meissner-Körperchen

Meissner-Körperchen wurden erstmals 1852 durch Wagner und Meissner beschrieben (Wagner and Meissner, 1852). Sie befinden sich in Papillen unbehaarter Haut und bestehen aus abgeflachten, lamellenförmigen Zellen, die ellipsoide Strukturen senkrecht der Hautoberfläche ausbilden (Cauna, 1956; Idé, 1976). Jede scheibenförmige Einheit besteht aus unmyelinisierten Axonendigungen, die von abgeflachten Schwann-Zell abgeleiteten, lamellenförmigen Zellen umgeben sind (Cauna, 1956; Knibestöl, 1973). Diese Strukturen sind mit Hilfe von Kollagen-Fasern an der Fibroblasten Kapsel befestigt. Die Kraft mechanischer Stimulation wird über Kollagen-Fasern auf die Ränder der lamellenförmigen Zellen übertragen. Dies führt zur Krümmung der Axonendigungen und Komprimierung der innenliegenden lamellenförmigen Zellen. Diese Komprimierung verursacht letztendlich das für RA A β -Fasern typische Feuern während des Stimulus-Beginns (Tabelle 2) (Cauna and Ross, 1960; Takahashi-Iwanaga and Shimoda, 2003; Zimmerman et al., 2014). Der adäquate Reiz für Meissner-Körperchen stellen niedrig-frequente Vibrationen dar.

1.5.2.4 Pacini-Körperchen

Neben Meissner-Körperchen stellen Pacini-Körperchen die zweiten sensorischen Endorgane dar, die selektiv Vibrationsstimuli wahrnehmen; im Gegensatz zu Meissner-Körperchen allerdings im hoch-frequenten Bereich. Die mit Pacini-Körperchen assoziierten RAII A β -Fasern sind sensitiver als die mit Meissner-Körperchen assoziierten RAI A β -Fasern (Jänig et al., 1968; Lynn, 1971). Aufgrund ihrer Lokalisation in tieferen Schichten der Dermis sind die rezeptiven Felder von Pacini-Körperchen sehr groß, und umfassen teilweise sogar die komplette Hand. Zusammen mit der hohen Sensitivität bedeutet dies eine sehr geringe räumliche Auflösungskraft von Pacini-Körperchen (Abraira and Ginty, 2013). Mit bis zu 4 mm Länge sind die oval geformten Pacini-Körperchen größer als Meissner-Körperchen (Cauna and Mannan, 1958; Benvivoglio and Pacini, 1995). Sie bestehen aus schalenartig aufgebauten lamellenförmigen Zellen und Kollagen-Fasern. Über die miteinander verbundenen Kollagen-Fasern werden lediglich hoch-frequente Vibrationen zum Axon weitergeleitet, während niedrig-frequente Stimulationen abgedämpft werden (Loewenstein and Skalak, 1966).

1.5.2.5 Haarfollikel

Behaarter Haut wurde lange Zeit lediglich eine untergeordnete Rolle bei Prozessen des Tastempfindens beigemessen. Erst seit Kurzem hat sich ein Bild etabliert, in dem behaarte Haut als ein komplexes und spezialisiertes sensorisches Organ betrachtet wird (Abraira and Ginty, 2013; Lechner and Lewin, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass jeder einzelne Haarfollikel eine eigene mechanosensorische Einheit bildet. In der Maus können verschiedene Haarfollikel-Typen voneinander unterschieden werden (Dry, 1926). Diese können anhand der Länge, Dicke und Anzahl der Medulla-Zellen sowie der Anwesenheit von Haarkrümmungen differenziert werden (Schlake, 2007). Der schematische Aufbau eines Haarfollikels ist in Abbildung 9 dargestellt und beschrieben. Guard Haare stellen die längsten Haare dar, machen jedoch lediglich 1-2% aller Haare aus. Sie werden dadurch ausgezeichnet, dass sie keinerlei Krümmungen aufweisen und aus zwei Reihen von Medulla-Zellen bestehen. Im Gegensatz dazu sind Awl Haare kürzer und haben mindestens zwei Reihen von Medulla-Zellen. Auchene Haare werden den Awl Haaren zugeordnet und unterscheiden sich von diesen lediglich durch eine zusätzliche scharfe Krümmung. Im Folgenden werden Awl und Auchene Haare, die zusammengenommen ungefähr 25% aller Haare ausmachen, deshalb immer gemeinsam

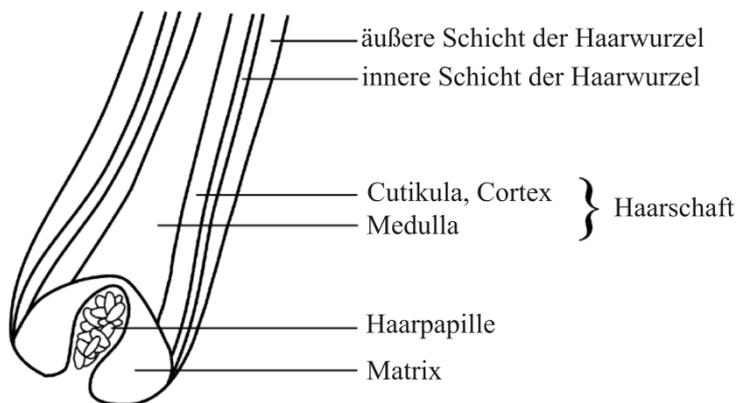


Abbildung 9 | Schematische Darstellung eines proximalen Maus Haarfollikels

Der Haarschaft besteht aus den drei Schichten Cuticula, Cortex und Medulla. Die außen liegende Cuticula bzw. auch Schuppenschicht genannt, ist aus flachen, übereinandergreifenden, verhornten, abgestorbenen Zellen aufgebaut. Der 80% des Haaranteils ausmachende Cortex (Faserschicht) besteht aus vielen feinen Keratinfasern,

den Fibrillen, die sich zu Faserbündeln anordnen. Die Medulla im Zentrum des Haares (auch Markkanal genannt) ist durch eine Auflockerung der Faserstruktur mit luftgefüllten Hohlräumen charakterisiert. Während des Haarwachstums schiebt sich der Haarschaft innerhalb des Follikels zur Hautoberfläche. Für die Entwicklung des Haarfollikels ist hierbei die Haarpapille von essentieller Bedeutung. Die Haar-Matrix bildet ferner alle epithelialen Kompartimente des Haares aus (abgesehen von der äußeren Schicht der Haarwurzel). Nach außen ist der Haarfollikel von der inneren und äußeren Schicht der Haarwurzel umgeben (modifiziert nach Schlake, 2007).

betrachtet, und als Awl/Auchene Haare bezeichnet. Haare mit einer einzigen Reihe von Medulla-Zellen lassen sich als Zigzag Haare identifizieren. Sie zeichnen sich durch drei bis vier Krümmungen in gegensätzliche Richtungen aus, und stellen mit über 70% die häufigsten Haare dar.

Auch im Menschen gibt es verschiedene Typen von Haaren. Diese unterscheiden sich von der Maus allerdings darin, dass sie nicht miteinander vermischt auftreten, wie dies der Fall bei Guard, Awl/Auchene und Zigzag Haaren ist, sondern in bestimmten Gebieten des Körpers lokalisieren. Neben Haaren der Kopfhaut sind dies die Schamhaare und das Flaumhaar (bzw. Zwischenhaar oder Intermediärhaar).

Jeder Haarfollikel wird in der Maus von einer bestimmten, ihm eigenen Kombination an niedrig-schwelligen Mechanorezeptoren innerviert (Li et al., 2011). Dies können RAI A β -, A δ D-Haar- und/oder C-LTMR Fasern sein (Abbildung 8A). Guard Haare werden demnach von RAI A β -Fasern innerviert, assoziieren aber zusätzlich mit SAI A β -Fasern der Merkel Zell-Neurit Komplexe. Awl/Auchene Haare werden von allen drei oben genannten LTMR-Fasern innerviert und Zigzag Haare assoziieren mit A δ - und C-LTMRs (Li et al., 2011).

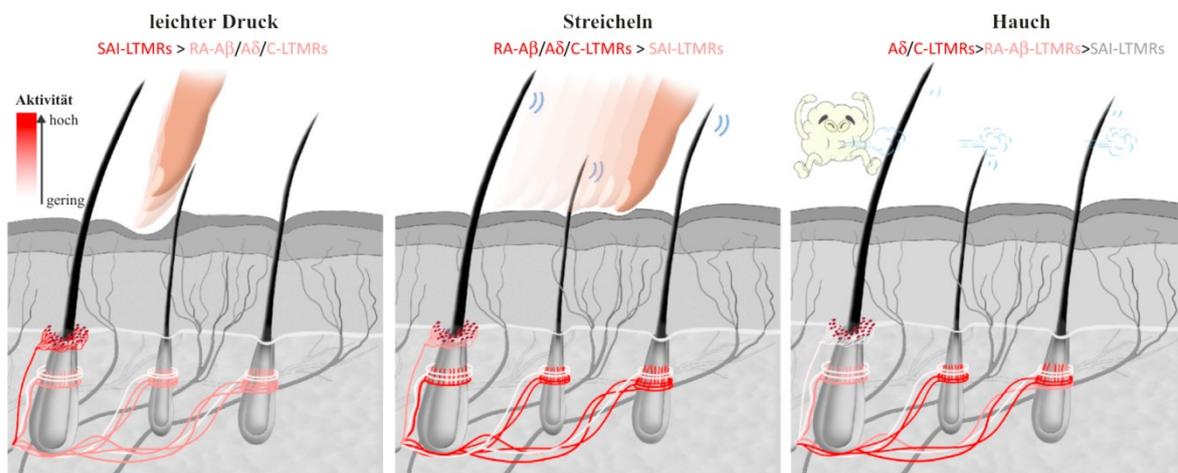


Abbildung 10 | Aktivierung von LTMR-Fasern in behaarter Haut

Leichter Druck aktiviert vornehmlich die in ‚touch domes‘ mit Guard Haaren assoziierten SAI A β LTMRs (Merkel Zell-Neurit Komplexe). Die lanzettförmigen Nervenendigungen um Haarfollikel werden lediglich in geringerem Ausmaß stimuliert. Dagegen führt das Streicheln über behaarte Haut größtenteils zur Aktivierung von RAI A β LTMRs, A δ D-Haaren und C-LTMRs, während SAI A β LTMRs nur schwach angeregt werden. Ein unterschiedliches Aktivierungsmuster ergibt sich für das sanfte Hauchen über die Haut. Hier werden vornehmlich A δ D-Haare und C-LTMRs aktiviert. In geringerem Ausmaß trifft dies auch noch für RAI A β LTMRs zu, während SAI A β LTMRs keinerlei Aktivierung durch diese Art Stimulus erfahren. Die zirkulären Nervenendigungen der Haarfollikel sind in weiß dargestellt, da die Art ihrer Aktivierung noch ungeklärt ist (modifiziert nach Abraira and Ginty, 2013).

Trotz der unterschiedlichen Fasertypen besitzen allerdings sowohl RAI A β -, A δ D-Haar- und C-LTMR Fasern identische Endstrukturen aus abgeflachten, zylindrischen, lanzettförmigen Nervenendigungen (Li et al., 2011; Li and Ginty, 2014; Zimmerman et al., 2014). Diese befinden sich jeweils zwischen zwei oder drei Schwann-Zell-Fortsätzen. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Hemi-desmosomen die epithelialen Zellen der Haarfollikel mit den Nervenendigungen verbinden (Li and Ginty, 2014). Eine Theorie vermutet einen Mechanismus vergleichbar der über Tip-Links verbundenen Stereovilli in Haarzellen der Cochlea im auditorischen System (LeMasurier and Gillespie, 2005). Entsprechend vermag während der Stimulation eines Haares der physische Kontakt zwischen epithelialen Zellen der Haarfollikel und lanzettförmigen Nervenendigungen für die Erregung der LTMRs verantwortlich sein (Zimmerman et al., 2014). Hierbei aktivieren unterschiedliche Stimulationsreize selektiv bestimmte Nervenendigungen behaarter Haut (Abbildung 10).

1.5.2.6 HTMRs und akuter Schmerz

HTMRs sind eine sehr umfangreiche und heterogene Gruppe von nozizeptiven Neuronen. Zu ihnen zählen AMs, C-Faser Nozizeptoren, sowie eine spezialisierte Gruppe von A β -Fasern (Djouhri and Lawson, 2004; Abaira and Ginty, 2013). Ihnen gemein ist, dass sie lediglich dann erregt werden, wenn Stimulus-Intensitäten einen bestimmten schädlichen Bereich erreichen. Dies kann schließlich dazu führen, dass die Schmerzschwelle erheblich gesenkt wird. Normalerweise harmlose Reize werden dann als schmerzhaft empfunden (Allodynie), und schädliche Reize werden nochmals drastisch verstärkt (Hyperalgesie). Trotz ihrer schädigenden Wirkung stellen Schmerzreize allerdings elementar wichtige Warnsignale für den Körper dar. Dies zeigt sich zum Beispiel daran, dass sich Patienten mit angeborener Schmerzunempfindlichkeit aufgrund von Mutationen im *Nav1.7* Gen häufig selbst schwere Schäden zufügen (Cox et al., 2006; Ahmad et al., 2007; Drenth and Waxman, 2007; Goldberg et al., 2007).

Akuter Schmerz kann durch viele verschiedene schädigende Reize aus der Umwelt ausgelöst werden (Basbaum et al., 2009; Dubin and Patapoutian, 2010). Hierzu zählen sowohl Reize rein mechanischer Natur, als auch Hitze (>43°C) und Kälte (<25°C), sowie chemische Reize zu denen inflammatorische Substanzen, wie z.B. Bradykinin, Substanz P, ATP, Prostaglandine, Wachstumsfaktoren, Proteasen, Protonen, Zytokine und Chemokine zu zählen sind (Basbaum et al., 2009; Linley et al., 2010). Hiervon abzugrenzen ist der chronische

Schmerz, der als ein länger andauernder schmerzhafter Zustand definiert ist, der oftmals bei Krankheiten wie Diabetes, Arthritis oder Krebs auftreten kann (Basbaum et al., 2009). Darüber hinaus lassen sich akute Schmerzempfindungen anhand unterschiedlicher Nervenfasern weiter unterscheiden. Somit wird AM Nozizeptoren der gut lokalisierte erste Schmerz bzw. „schnelle“ Schmerz zugeordnet. Demgegenüber übermitteln C-Faser Nozizeptoren den schlecht lokalisierten „zweiten“ Schmerz, der auch langsamer Schmerz bezeichnet wird (Basbaum et al., 2009).

AM und C-Faser Nozizeptoren können jeweils entsprechend umweltbedingter schmerzverursachender Stimuli differenziert werden. Aufgrund der Sensitivität sowohl für mechanische (M), chemische, Hitze (H) als auch Kältereize (C) wird der Großteil der C-Fasern als polymodal bezeichnet (entsprechend C-MH, C-MC, C-MHC) (Fleischer et al., 1983; Kress et al., 1992; Lewin and Mendell, 1994). Eine weitere Population von C-Fasern wird als insensitiv für mechanische und Hitze-Stimulation beschrieben (C-M_iH_i). Erst nach der Sensibilisierung durch inflammatorische Substanzen gewinnt dieser Fasertyp seine Sensitivität für schädliche mechanische oder Temperatur Reize (Meyer et al., 1991; Schmidt et al., 1995). Weitere 10% der C-Fasern werden auch als unempfindlich für mechanische Stimulation beschrieben, spielen allerdings eine große Rolle bei der Perzeption von durch Hitze verursachtem Schmerz (C-H) (Dubin and Patapoutian, 2010).

AM-Nozizeptoren sind größtenteils Hitze (H) - und/oder Mechano (M) - sensitiv (entsprechend A-MH, A-H, A-M) (Cain et al., 2001; Lewin and Moshourab, 2004). Teilweise wird auch Kältesensitivität beobachtet (Darian-Smith et al., 1973; Koltzenburg et al., 1997; Cain et al., 2001; Milenkovic et al., 2014). A-MH Fasern können in zwei Klassen untergliedert werden. A-MH Typ I Nozizeptoren zeichnen sich durch Sensitivität sowohl für Hitze als auch mechanische Reize aus. Allerdings liegt der Schwellenwert zur Hitzeaktivierung mit >50°C relativ hoch. Im Gegensatz hierzu haben A-MH Typ II Nozizeptoren einen geringeren Hitze-Schwellenwert (43 – 47°C), allerdings einen höheren Schwellenwert für mechanische Aktivierung (Basbaum et al., 2009; Dubin and Patapoutian, 2010).

Sowohl C-Faser Nozizeptoren als auch AM-Faser Nozizeptoren formen unmyelinisierte, von Schwann-Zellen umgebene, freie Nervenendigungen in der Dermis und der Epidermis (Abbildung 8A). AMs verlieren hierbei ihre Myelin-Ummantelung und bilden Cluster in relativ kleinen und separierten Bereichen. C-Faser Endigungen weisen dagegen im Vergleich eine ausgedehntere Verbreitung in der Haut auf, was eine präzise Lokalisation des Stimulus ausschließt (Mense, 2008).

Zusätzlich zu AM- und C-Faser Nozizeptoren wurden sogenannte „myelinisierte Nozizeptoren“ beschrieben, die den A β -Fasern zugeordnet werden (Djouhri and Lawson, 2004). Aufgrund der Sensitivität für niedrig-schwellige als auch hoch-schwellige Reize wird diesen Fasern sowohl eine Funktion als LTMR als auch Nozizeptor zugeschrieben (Abraira and Ginty, 2013). Für diese A β -Nozizeptoren wird eine Rolle beim Prozess der Allodynie nach der Beschädigung peripherer Nerven postuliert (Campbell et al., 1988; Woolf et al., 1992; LaMotte and Kapadia, 1993).

1.5.3 Molekulare Identifizierung somatosensorischer Neurone in Spinalganglien

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, können somatosensorische Neurone generell anhand der Zellgröße, Grad der Myelinisierung, Leitungsgeschwindigkeit und den assoziierten sensorischen Endorganen unterschieden werden. Jedem Fasertypus ist hierbei eine spezifische sensorische Funktion zugeordnet. Dies spiegelt sich auch auf molekularer Ebene wider. Unterschiedliche Fasertypen können demnach aufgrund ihrer ihnen eigenen molekularen Ausstattung an spezifischen Ionenkanälen und sensorischen Rezeptoren klassifiziert und charakterisiert werden (Le Pichon and Chesler, 2014). So lassen sich C-Fasern zum Beispiel durch eine Vielzahl verschiedener Marker weiter in peptiderge und nicht-peptiderge Fasern, sowie in Fasern für spezifische Empfindungen (Kälte, Hitze, Juckreiz, angenehme Berührungen) differenzieren. In Tabelle 3 sind exemplarisch wichtige Marker für verschiedene somatosensorische Populationen dargestellt.

Tabelle 3 | Somatosensorische Zelltyp Marker

Markerprotein	Sensorischer Zelltypus	Referenz
Calbindin	Propriozeptoren	(Copray et al., 1994; Ernfors et al., 1994; Honda, 1995)
Ca _v 3.2	A δ -Fasern (harmlose mechanische Reize)	(Shin et al., 2003; Wang and Lewin, 2011)
CGRP	Peptiderge C-Faser; Subpopulation von A δ -Fasern	(Averill et al., 1995; McCarthy and Lawson, 1997)
Chondrolectin	RA A β Fasern	(Sakurai et al., 2013)
c-Ret	LTMRs	(Bourane et al., 2009; Luo et al., 2009)
DOR	Subpopulation von nicht-peptidergen C-Fasern und myelinisierten NF200-positiven Zellen	(Scherrer et al., 2009)
IB4	Nicht-peptiderge C-Fasern	(Averill et al., 1995; Dirajlal et al., 2003)
KCNQ4	RAI A β -Fasern	(Heidenreich et al., 2011)
MafA	LTMRs	(Bourane et al., 2009; Luo et al., 2009)
MrgprA3	C-Fasern (Juckreiz)	(Liu et al., 2009)
MrgprB4	C-Fasern (harmlose mechanische Reize)	(Liu et al., 2007)
MrgprD	C-Fasern (schädliche mechanische Schmerzreize)	(Zylka et al., 2005)
NF200	Myelinisierte A β - und A δ -Fasern, sowie Propriozeptoren	(Lawson and Waddell, 1991)
Npy2r	A β -Fasern (harmlose mechanische Reize)	(Li et al., 2011)
Parvalbumin	Propriozeptoren und A β -Fasern	(Copray et al., 1994; Ernfors et al., 1994; Honda, 1995; Sakurai et al., 2013)
Substanz P	Peptiderge C-Fasern	(McCarthy and Lawson, 1989, 1997; Wang et al., 1994; Averill et al., 1995)
TH	Nicht-peptiderge C-Fasern (harmlose mechanische Reize, Kälte)	(Li et al., 2011)
TrkA	Nozizeptoren, Thermozeptoren, Pruriceptoren, C-Mechanorezeptoren	(Mu et al., 1993; Averill et al., 1995; Fundin et al., 1997; Patel et al., 2000)
TrkB	A δ -Fasern (harmlose mechanische Reize, Kälte)	(Mu et al., 1993; Stucky et al., 1998, 2002)
TrkC	Propriozeptoren und SAI A β -Fasern	(Mu et al., 1993; Cronk et al., 2002; Szeder et al., 2003)
Trpm8	C-Fasern (Kälte und Schmerz)	(Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007)
Trpv1	C-Fasern (Hitze und Schmerz)	(Caterina et al., 1997, 2000; Tominaga et al., 1998; Caterina and Julius, 2001)
VGlut3	Nicht-peptiderge C-Fasern (harmlose mechanische Reize, Kälte)	(Seal et al., 2009)

Abkürzungen: CGRP, Calcitonin Gene-Related Peptide; DOR, Delta Opioid Rezeptor; IB4, Isolectin B4; MafA, Avian Musculoapneurotische Fibrosarcoma Onkogen Homolog A; MrgprA3, Mas-verwandter G-Protein gekoppelter Rezeptor A3; MrgprB4, Mas-verwandter G-Protein gekoppelter Rezeptor B4; MrgprD, Mas-verwandter G-Protein gekoppelter Rezeptor D; NF200, Neurofilament 200; Npy2r, Neuropeptid Y Rezeptor Typ 2; TH, Tyrosin Hydroxylase; TrkA, Tyrosin Rezeptor Kinase A; TrkB, Tyrosin Rezeptor Kinase B; TrkC, Tyrosin Rezeptor Kinase C; TRPM8, Transienter Rezeptor Potential Kationen Kanal Unterfamilie M Mitglied 8; TRPV1, Transienter Rezeptor Potential Kationen Kanal Unterfamilie V Mitglied 1; VGlut3, Vesikulärer Glutamat Transporter Typ 3;

1.5.4 Mechanotransduktion

Mechanotransduktion beschreibt den Prozess der Umwandlung mechanischer Energie in elektrische Signale. Der Prozess der sensorischen Transduktion kann hierbei entweder in primär sensorischen Neuronen oder Epithel-abgeleiteten sekundär sensorischen Zellen stattfinden (Woo et al., 2015). Olfaktorische Neurone (Lancet, 1986) und kutane LTMRs (Abraira and Ginty, 2013) stellen primär sensorische Neurone dar, die sowohl die sensorische Transduktion als auch die Weiterleitung der Impulse an das ZNS vermitteln. In Geschmackszellen (Chandrashekar et al., 2006) und mechanosensorischen Haarzellen des Innenohrs (Crawford and Fettkiplace, 1985; Fuchs et al., 2003) erfolgt die Transduktion dagegen durch Epithel-abgeleitete Zellen, die über Neurotransmitter afferente Neurone aktivieren.

Eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanorezeptoren (siehe hierzu Kapitel 1.5.2) dienen der Wahrnehmung externer Stimuli aus der Umwelt. Obwohl alle Mechanorezeptoren durch mechanische Stimulation der Haut aktiviert werden, kann zwischen unterschiedlichen Arten von Information, wie sanftem Druck, Vibrationen, Dehnung und schmerzhafter Belastung differenziert werden. Während Nozizeptoren aus freien Nervenendigungen bestehen, besitzen beinahe alle Mechanorezeptoren spezialisierte Endigungen, die aus einer die Nervenendigung umgebenden nicht-neuronalen Hülle aufgebaut sind und in manchen Fällen sogar Synapsen-ähnliche Strukturen ausbilden (Roudaut et al., 2012; Fleming and Luo, 2013). Diese Strukturen können als mechanische Filter, sowie über die Freisetzung von Neurotransmittern als chemische Modulatoren fungieren, und dadurch an der Modulierung des Rezeptorpotentials mitwirken.

Zur Umwandlung eines bestimmten mechanischen Stimulus in ein elektrisches Signal exprimieren Mechanorezeptoren verschiedene Ionenkanäle. Mechanosensitive Ströme in DRG Neuronen konnten erstmals 1999 beschrieben werden (McCarter et al., 1999). Sie zeichnen sich durch eine relativ kurze Latenz von 0.4 – 0.8 ms aus (Hu and Lewin, 2006), was letztlich gegen eine Theorie der indirekten Aktivierung durch sekundäre Botenstoffe und für eine direkte Aktivierung mechanosensitiver Kanäle spricht (Delmas et al., 2011; Hao et al., 2015). Verschiedene Modelle versuchen diesen Vorgang der direkten Aktivierung mechanosensitiver Kanäle zu beschreiben (Lumpkin and Caterina, 2007; Brierley, 2010; Bautista and Lumpkin, 2011; Ranade et al., 2015). Demnach können Transduktionskanäle entweder durch Kraftereinwirkung direkt aktiviert werden (Abbildung 11A), wie dies zum Beispiel bei den osmosensitiven Bakterienkanälen MscS und MscL der Fall ist (Kung, 2005). Andererseits

vermögen bestimmte Verbindungsmoleküle Transduktionskanäle an das Zytoskelett oder die Extrazellulärmatrix zu befestigen, was der Kontrolle des Kanalöffnungsverhaltens dient (Abbildung 11B) (Hu et al., 2010). Diese Theorie konnte kürzlich bei den zur TRP Familie zählenden NOMPC Kanälen bestätigt werden (Zhang et al., 2015). N-terminale Ankyrin-Wiederholungen bilden hier zytoplasmatische Verbindungsmoleküle, die den Ionenkanal mit Mikrotubuli assoziieren lassen und dadurch Mechanosensitivität vermitteln. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Verknüpfung dieser Ankyrin-Wiederholungen an die mechanisch größtenteils unempfindlichen, spannungsgesteuerten Kaliumkanäle $K_v1.2$ und $K_v2.1$ auch diesen Kanälen mechanosensitive Eigenschaften verleihen kann (Zhang et al., 2015). Auch die Mechanosensitivität vieler somatosensorischer Neurone ist eng mit der Anwesenheit einer extrazellulären Protein-Verbindung verknüpft (Hu et al., 2010; Li and Ginty, 2014), vergleichbar den an Haarzellen der Cochlea gefundenen Tip-Links (LeMasurier and Gillespie, 2005).

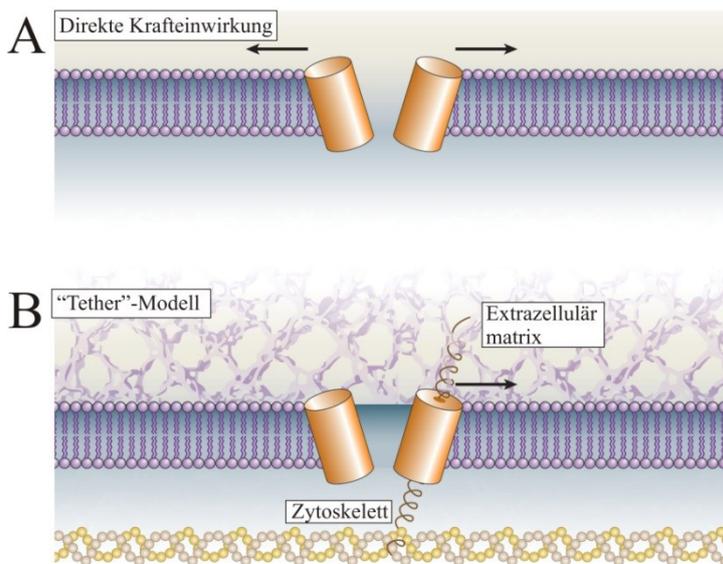


Abbildung 11 | Modell zur Aktivierung von Mechano-transduktionskanälen

(A) Direkte Krafteinwirkung auf die Zellmembran führt zur Öffnung Dehnungs-sensitiver Ionenkanäle. (B) Im „Tether“-Modell werden Ionenkanäle mit Hilfe von Verbindungsproteinen mit der Extrazellulärmatrix oder dem Zytoskelett verbunden. Die Verbindungsproteine übertragen Krafteinwirkungen auf die entsprechenden Ionenkanäle (modifiziert nach Lumpkin and Caterina, 2007).

Basierend auf unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften bei der Abnahme der mechanosensitiven Ströme kann zwischen vier verschiedenen Arten von Strömen differenziert werden: schnell adaptierenden Strömen (~3–6 ms), intermediär adaptierenden Strömen (~15–30 ms), langsam adaptierenden Strömen (~200–300 ms) und besonders langsam adaptierenden Strömen (~1000 ms) (Drew et al., 2004; Hu and Lewin, 2006; Hao and Delmas, 2010). Interessanterweise zeigte sich, dass sich die einzelnen mechanosensitiven Ströme in unterschiedlichen Populationen sensorischer Neurone befinden. Demnach weisen nozizeptive Neurone vornehmlich langsam und besonders langsam adaptierende mechanosensitive Ströme

auf, während nicht-nozizeptive Fasern vorrangig schnell-adaptierende mechanosensitive Ströme besitzen (Drew et al., 2002, 2004; Hu and Lewin, 2006; Coste et al., 2007; Drew and Wood, 2007; Hao and Delmas, 2010; Vilceanu and Stucky, 2010).

Ionen-Selektivitätsstudien konnten ferner zeigen, dass mechanosensitive Ströme nichtselektiv aus Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Ionen bestehen (McCarter and Levine, 2006). Verschiedene Mitglieder der Degenerine/epithelialen Na^+ Kanäle (DEG/ENaC) und der transienten Rezeptor Potential (TRP) Kanäle wurden als Kandidaten für Mechanotransduktionskanäle gehandelt (Gillespie and Walker, 2001; Lumpkin and Caterina, 2007; Chalfie, 2009; Arnadóttir and Chalfie, 2010; Brierley, 2010; Del Valle et al., 2012; Eijkelkamp et al., 2013). Zur DEG/ENaC Familie gehören unter anderem MEC-4 und MEC-10, die zusammen mit MEC-2 und MEC-6 einen mechanosensitiven Kanalkomplex in *C. elegans* bilden (Chalfie and Au, 1989; Driscoll and Chalfie, 1991; Goodman et al., 2002; O'Hagan et al., 2005; Arnadóttir and Chalfie, 2010). Während MEC-4 und MEC-10 hierbei an der Bildung der Pore beteiligt sind, verknüpfen MEC-2 und MEC-6 den Kanal an das Zytoskelett und die Extrazellulärmatrix (Goodman, 2006; Arnadóttir and Chalfie, 2010). Auch die TRPN orthologen Kanäle NOMPC (Walker et al., 2000; Yan et al., 2013) und TRP-4 (Li et al., 2006; Kang et al., 2010) wurden als mechanisch aktivierbare Ionenkanäle in *Drosophila* bzw. *C. elegans* identifiziert. Allerdings verbleibt die Bedeutung von Wirbeltier TRP Kanälen für Mechanotransduktion noch weitestgehend ungeklärt (Ranade et al., 2015). Die Identifikation der Piezo Proteine als mechanisch aktivierbare Ionenkanäle war deshalb von großer Bedeutung für das Verständnis der Mechanotransduktion in Säugetieren (Coste et al., 2010, 2012). So wird Piezo1 für die Mechanotransduktion endothelialer Zellen (Ranade et al., 2014a) und roter Blutkörperchen (Cahalan et al., 2015) benötigt. Piezo2 findet sich dagegen in einer Unterpopulation niedrigschwelliger Mechanorezeptoren, die lanzettförmige und zirkuläre Nervendigungen um Haarfollikel und Meissner-Korpuskel in der Haut bilden (Ranade et al., 2014b), sowie in Merkel Zell-Neurit Komplexen (Ikeda et al., 2014; Maksimovic et al., 2014; Woo et al., 2014).

Die Aktivierung der Transduktionskanäle verursacht letztendlich eine lokale Depolarisation, das Rezeptorpotential. Zusätzlich zu den genannten exzitatorischen mechanosensitiven Kanälen tragen auch inhibitorische mechanosensitive Kanäle zur Generierung des Rezeptorpotentials bei (Hao et al., 2015). Hierzu zählen K^+ Kanäle der Zwei-Poren Domänen K^+ ($\text{K}_{2\text{P}}$) Kanäle (KCNK) und K_v1 Ionenkanal Familien (Alloui et al., 2006; Honoré, 2007; Hao et al., 2013). Mechanosensitivität konnte demnach sowohl bei KCNK2 (Trek1), KCNK4 (Traak) und KCNK10 (Trek2) (Medhurst et al., 2001; Alloui et al., 2006;

Kang and Kim, 2006; Noël et al., 2009; Brohawn et al., 2014a), als auch bei $K_v1.1$ Homomeren und $K_v1.1$ - $K_v1.2$ Heteromeren gezeigt werden (Hao et al., 2013). KCNK2, KCNK4 und KCNK10 knock-out Mausmodelle entwickelten eine erhöhte Sensitivität für mechanische Stimulation (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in der Abwesenheit anderer zellulärer Komponenten sowohl KCNK2 als auch KCNK4 über Krafteinwirkung auf die Zellmembran direkt geöffnet werden können (Brohawn et al., 2014b). Dies entspricht dem Modell einer direkten Ionenkanal-Aktivierung (Abbildung 11A), welches oben bereits in Zusammenhang mit MscS und MscL beschrieben wurde. Mit Hilfe der KCNK4 Kristallstruktur wurde die Theorie aufgestellt, dass zwei mit der Zellmembran interagierende, porenformende innere Helices die direkte mechanische Sensitivität des KCNK4 Kanals vermitteln (Brohawn et al., 2012).

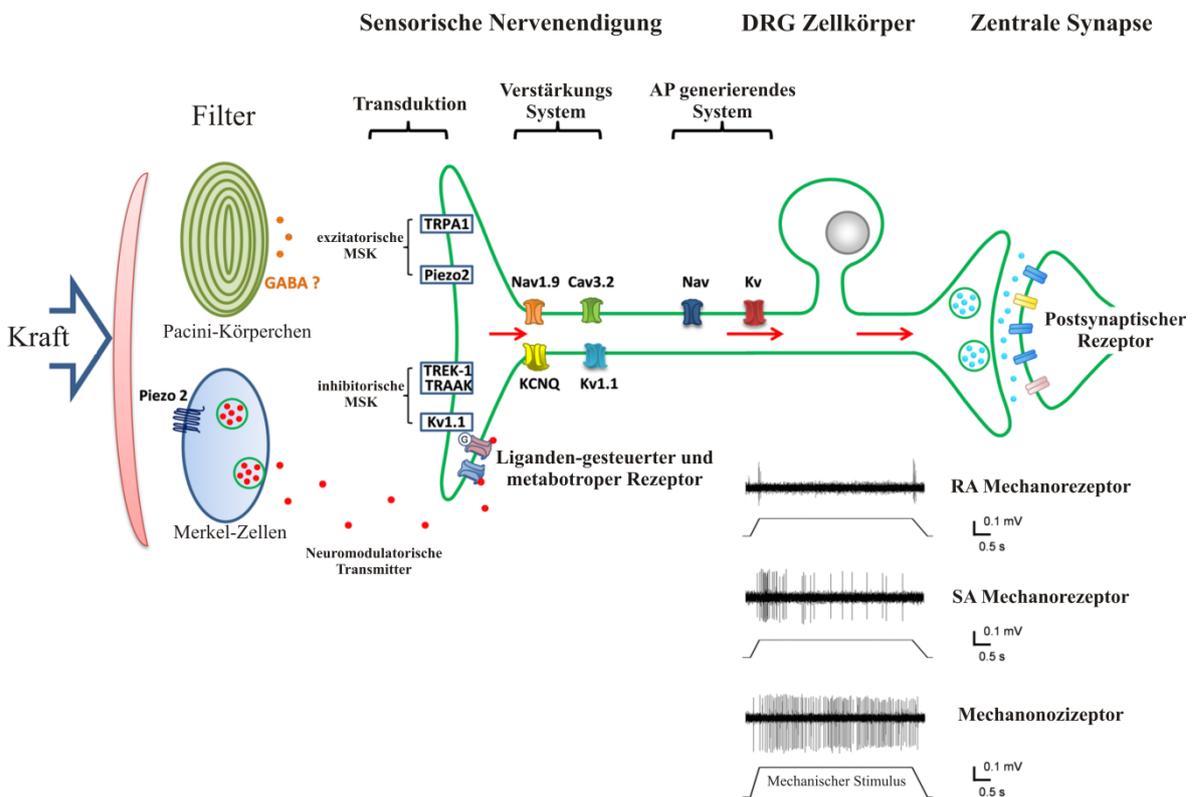


Abbildung 12 | Schematische Ansicht der Mechanotransduktion

Als Reaktion auf mechanische Stimulation der Haut öffnen sich mechanosensitive Kanäle (MSK), die das Rezeptorpotential erzeugen. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle können dieses entweder verstärken oder abschwächen. Sobald ein gewisses Membranpotential erreicht ist, kommt es zur Entstehung einer bestimmten Abfolge von Aktionspotentialen (APs), die letztlich der Amplitude des Rezeptorpotentials entsprechen. Modulierende Zelltypen können ferner über chemische und/oder physische Interaktion die sensorische Nervenendigung beeinflussen. Letztlich führt dies zur Entstehung eines klar definierten Feuerverhaltens, beispielhaft gezeigt für RA- und SA-Mechanorezeptoren sowie Mechanonozizeptoren (modifiziert nach Hao et al., 2015).

Bei Erreichen eines bestimmten Membranpotentials triggert das Rezeptorpotential anschließend die Entstehung von Aktionspotentialen, die letztlich ins ZNS wandern, wo sie verarbeitet und als entsprechende Tastempfindung interpretiert werden können. Die Amplitude des Rezeptorpotentials wird hierbei durch eine entsprechende Frequenz an Aktionspotentialen abgebildet. Eine starke Stimulation führt demnach zu einem großen Rezeptorpotential und letztlich zu einer hohen Frequenz an Aktionspotentialen. Das Rezeptorpotential führt zur Aktivierung einiger weiterer modulierender, spannungsgesteuerter Ionenkanäle. Einwärtsgerichtete Ströme dienen der Verstärkung des Rezeptorpotentials, während auswärtsgerichtete Ströme die gegenteilige Wirkung besitzen. Der spannungsgesteuerte T-Typ Calcium Kanal $Ca_v3.2$ wirkt vornehmlich in D-Haar Mechanorezeptoren als Art Verstärker und erhöht die Sensitivität dieser Zellen auf sich bewegende Stimuli (Brown and Iggo, 1967; Wang and Lewin, 2011; Hilaire et al., 2012). Diese Eigenschaft wird vornehmlich auf die depolarisierende Wirkung der $Ca_v3.2$ -Aktivierung zurückgeführt (Wang and Lewin, 2011). Auch $Na_v1.9$ Kanäle dienen der Erhöhung der Erregbarkeit, vornehmlich in nozizeptiven Neuronen (Baker et al., 2003; Coste et al., 2004; Baker, 2005; Maingret et al., 2008). Neben $Na_v1.9$ wurden auch weitere spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle in somatosensorischen Neuronen gefunden, zu denen die Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven Kanäle $Na_v1.1$, 1.6 und 1.7 , als auch der TTX-insensitive Kanal $Na_v1.8$ zählen (Basbaum et al., 2009). Ferner konnte in schnell-adaptierenden, niedrig-schweligen Mechanorezeptoren KCNQ4 detektiert werden (Heidenreich et al., 2011). Die Lokalisation an der Mechanotransduktionszone deutet auf eine Rolle von KCNQ4 bei der Modulierung des Rezeptorpotentials hin. Abbildung 12 fasst die in diesem Kapitel dargelegten Sachverhalte bezüglich Mechanotransduktion schematisch zusammen.

2 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation und Funktion der KCNQ Kanäle 2, 3 und 5 im somatosensorischen System der Maus zu untersuchen.

2.1 Erlernen, Aufbau und Etablierung eines Messplatzes zur elektrophysiologischen Ableitung von Haut-Nerv Präparationen

Mit Hilfe der elektrophysiologischen Methode der Haut-Nerv Präparation lassen sich einzelne afferent sensorische Fasern des *Nervus saphenus* voneinander differenzieren, charakterisieren und auf ihre spezifische physiologische Aktivität hin messen. Der Vergleich bestimmter Mausmodelle mit Hilfe dieser Methode erleichtert die Aufklärung der Funktion entsprechender Proteine im somatosensorischen System. Als nützliches Hilfsmittel zur Untersuchung der Rolle von KCNQ Kanälen in Nozizeptoren und Tastrezeptoren, bestand demnach ein Ziel dieser Arbeit darin, die Methode der Haut-Nerv Präparation im Labor der Arbeitsgruppe Lewin (MDC, Berlin) zu erlernen, um anschließend einen vergleichbaren Messplatz in unserem Labor zu etablieren.

2.2 Generierung eines KCNQ5 KO Mausmodells

Für elektrophysiologische Untersuchungen sowie Verhaltensversuche konnte ein in unserem Labor generiertes KCNQ5 knock-in Mausmodell benutzt werden, welches eine dominant negative Mutation (G278S) in der Porensequenz von KCNQ5 besitzt. Gleichwohl lässt sich dieses Mausmodell aufgrund zwar veränderter, aber vorhandener Expression des mutierten KCNQ5 Proteins nicht als Negativ-Kontrolle zur Untersuchung der KCNQ5 Lokalisation durch Immunhistochemie oder *in situ* Hybridisierungen verwenden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand demnach in der Generierung eines konstitutiven KCNQ5 KO Mausmodells als Gold-Standard der Negativ-Kontrolle.

2.3 Untersuchung der Bedeutung von KCNQ Kanälen für Tastempfinden und Schmerz

Vorausgegangene Studien postulierten eine Bedeutung von KCNQ Kanälen bei der Perzeption von Schmerz und D-Haar vermitteltem Tastempfinden. Gleichwohl konnte die in D-Haar Fasern exprimierte KCNQ Untereinheit bisher noch nicht identifiziert werden, und für die in nozizeptiven Fasern exprimierte KCNQ Untereinheit wurden teils widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Unter anderem mit Hilfe verschiedener KCNQ Mausmodelle, oben genannter Haut-Nerv Präparation, sowie histologischer Methoden sollte die Charakterisierung der KCNQ Kanäle 2, 3 und 5 im somatosensorischen System erfolgen.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien der Firmen Roche (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Gibco (Eggenstein), BioRad (Hercules, USA), Sigma (München) verwendet. Enzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, USA), Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Eggenstein), Promega (Madison, USA) oder Roche (Mannheim) bezogen.

3.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Für die Erstellung von Lösungen, Puffer und Medien wurde über ein Milli-Q-System (Millipore, Eschborn) aufgereinigtes H₂O verwendet. Zusätzlich wurden Lösungen zur Sterilisation 20 min bei 121°C autoklaviert.

Tabelle 4 | Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien

Puffer, Lösungen und Medien	Zusammensetzung
Denhardt's Lösung	2% (w/v) BSA, 2% (w/v) Ficoll 400, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidone
DEPC-Wasser	H ₂ O mit 0.1% (v/v) Diethylpyrocarbonat, über Nacht 37°C und durch Autoklavieren inaktiviert
ESC Einfriermedium	50% FCS, 40% ESC Medium, 10% DMSO
ESC Medium	DMEM (Gibco#42430025) mit 25 mM HEPES und 4.5 g/ml Glukose, 15% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamin, 1% (v/v) 100x NEAA, 1% (v/v) Pyruvat, 1% (v/v) Penicillin/Streptavidin (Gibco#15070-022), 1 µl/100 ml 2-Mercaptoethanol, 1000 U/ml Leukämie inhibitorischer Faktor (LIF)
Feeder Zellen Medium	DMEM (Gibco#61965-026) mit 4.5 g/l Glukose, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Pyruvat, 1% (v/v) Penicillin/Streptavidin (Gibco#15070-022)
Homogenisierungspuffer (Membranpräparation)	20 mM Tris (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 4 mM Pefabloc® (Roche), 1x Complete® Protease Inhibitor Mix (Roche)
Hot Shot Lyse Puffer	25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA; pH 12
Hot Shot Neutralisations Puffer	40 mM Tris-HCl; pH 5
Immunhistochemie Blocklösung	3% (v/v) NGS, 2% (w/v) BSA, 0.5% (v/v) NP40 in PBS
Immunhistochemie Antikörperlösung	1.5% (v/v) NGS, 1% (w/v) BSA, 0.25% (v/v) NP40 in PBS
<i>In situ</i> Blocklösung I	1% (w/v) Roche Block in TNB
<i>In situ</i> Blocklösung II	2% (w/v) BSA, 1% (w/v) Roche Block in MABT Puffer

Puffer, Lösungen und Medien	Zusammensetzung
<i>In situ</i> Hybridisierungslösung	50% (v/v) Formamide deionisiert, 5x SSC Puffer, 5x Denhardt's Lösung, 250 µg/ml Hefe tRNA, 250 µg/ml Lachs Sperma DNA
<i>In situ</i> RNase Puffer	10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 500 mM NaCl
<i>In situ</i> Waschlösung I	2x SSC Puffer, 50% Formamide, 0.1% (v/v) N-Lauroylsarcosine
<i>In situ</i> Waschlösung II	2x SSC Puffer, 0.1% (v/v) N-Lauroylsarcosine
<i>In situ</i> Waschlösung III	0.2x SSC Puffer, 0.1% (v/v) N-Lauroylsarcosine
Ketamin-Rompun-Anästhesie Lösung	120 µl Ketamin10, 80 µl 2%Rompun in 800 µl PBS
LB Medium	0.5% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 0.1% (w/v) Glukose; pH 7
LB-Amp Medium	100 µg/ml Ampicillin in LB Medium
LB-Amp Platten	15 g Agar in 1000 ml LB-Amp Medium
LB-Kana Medium	30 µg/ml Kanamycin in LB Medium
LB-Kana Platten	15 g Agar in 1000 ml LB-Kana Medium
Lysis Puffer (ES Zellen)	0.2% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 200 µg/ml Proteinase K; pH 8
Lysis Puffer (Membranpräparation)	50 mM Tris (pH 6.8), 5 mM EDTA, 2% (w/v) SDS, 4 mM Pefabloc® (Roche), 1x Complete® Protease Inhibitor Mix (Roche)
MAB 5x Puffer	58 g Maleinsäure, 40 g NaOH, 43.5 g NaCl, auf 1 l ddH ₂ O
MABT Puffer	1x MAB, 0.1% (v/v) Tween 20 in ddH ₂ O
10x Neutralisationspuffer (Antikörper Aufreinigung)	1 M Tris, 2 M NaCl; pH 8.5
NTM Puffer	100 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 9,5), 50 mM MgCl ₂
Paraformaldehyd (PFA) Fixierlösung	4% (w/v) PFA oder 1% (w/v) PFA in PBS; pH 7.4
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl, 7.4 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.4
PBS für ESC Kultur	1 Tablette (Gibco#18912-014) in 50 ml H ₂ O, autoklaviert
PBST	0.1% (v/v) Triton X-100 in PBS
Ponceau rot (10x)	2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure, auf 100 ml H ₂ O
SDS Lösung (10%)	100 g SDS in 1 l H ₂ O; pH 7.2
SDS-PAGE Proben Puffer (3x)	150 mM Tris/HCl (pH 6.8), 6% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol, 0.3% (w/v) Bromphenol Blau, 10 mM DDT
SDS-PAGE Lauf Puffer (10x)	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% (w/v) SDS
SDS-PAGE Trennungsgel-Puffer (4x)	1.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS; pH 8.8
SDS-PAGE Sammelgel-Puffer	0.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS; pH 6.8
20x SSC Puffer	3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat; pH 7
Southern Blot Neutralisierungspuffer	2x SSC

Puffer, Lösungen und Medien	Zusammensetzung
Southern Blot Transferpuffer	0.4 M NaOH
Southern Blot Depurinierungspuffer	0.25 M HCl
Southern Blot Wasch Lösung A	0.1% (w/v) SDS, 2x SSC
Southern Blot Wasch Lösung B	0.5% (w/v) SDS, 0.1x SSC
Synthetische interstitielle Flüssigkeit (SIF)	2 mM CaCl ₂ , 5.5 mM Glukose, 10 mM HEPES, 3.5 mM KCl, 0.7 mM MgSO ₄ , 123 mM NaCl, 1.5 mM NaH ₂ PO ₄ , 9.5 mM Na-gluconat, 7.5 mM Saccharose; pH 7.4
TAE Puffer (50x)	0.2 M Tris-Acetat, 10 mM EDTA; pH 7.4
TB Puffer	10 mM PIPES, 15 mM CaCl ₂ , 55 mM MnCl ₂ , pH 6.7
TBE Puffer (10x)	1 M Tris-HCl, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA; pH 8
TBS Puffer (10x)	1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 250 mM Tris; pH 7.4
TBST	0.1% (v/v) Tween20 in TBS Puffer
TE Puffer low	10 mM Tris, 0.1 mM EDTA; pH 8, steril filtriert
TN Puffer (TNB)	100 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl
Waschlösung A	2x SSC, 0.5% SDS
Waschlösung B	0.1x SSC, 0.5% SDS
Western Blot Block Lösung	5% (w/v) Milchpulver in TBST

3.1.3 Bakterienstämme

Es wurden ElectroTen-Blue (ET-10) Bakterien verwendet.

3.1.4 Vektoren

Es wurde der Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy (Promega) verwendet, der eine Ampicillinresistenz, ein LacZ-Gen, sowie T7- und Sp6-Promotoren für die RNA-Synthese enthält.

3.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Biomers (Ulm) und Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert.

3.1.5.1 Genotypisierung

Die in Tabelle 5 aufgelisteten Primer wurden zum Genotypisieren der verwendeten Mauslinien verwendet.

Tabelle 5 | Primer zum Genotypisieren der verwendeten Mauslinien

Mauslinie	Primer (Laborinterne Nummerierung)	Sequenz	Länge der PCR-Produkte [bp]
KCNQ2 KO	#9965_Q2wt_fw	ATC GTG ACT ATC GTG GTA TTC GGT G	Wildtyp: 350
	#9966_Q2neo	GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA T	KCNQ2KO: 550
	#9967_Q2neo_rv	GGT GAT AAG AAG GAA CTT CCA GAA G	
KCNQ3 KO	#6875KCNQ3_loxP3	TAC CTC CTA ATC CTT CCC AAA TA	Wildtyp: 210
	#6993_Q3_rv	GGT AGA GAT CCT GGG GCA CAT	KCNQ3KO: 280
	#6908_loxP	GCT CTG TTT TAA TGT GGT TCT TC	
KCNQ3 lox	#4706_mQ3_seq6	ATA AGT TTG GCA AAA GTC ATT CAC C	Wildtyp: 420
	#6993_Q3_rv	GGT AGA GAT CCT GGG GCA CAT	Gefloxt: 550
KCNQ4 KO	#1755_4em5h	AGC TGA TCA CCG CCT GGT ACA TCG	Wildtyp: 340
	#1756_8r-3	GAG CCC CCT TTC CAG ACC CTA C	KCNQ4KO: 460
	#4908_8h-1	AGG CTG GGC TGA GAC TGA AT	
KCNQ5 DN & KCNQ5 KO	#230_Q5wtFor	ACC CAT AAA TTC TCC CCA ACA TGA TCA CC	Wildtyp: 210
	#1648_mQ5_d_Loxp_R	ATT ACT TGT TTG TTT CTA GGG TTG ACC GTT TGG	Q5DN/KO: 265
SNS-Cre	#9153_mSNS-Seq2s	AAG AGT GTA AAT CCT TCC	Cre: 250
	#661_TB64	TCC GGT TAT TCA ACT TGC ACC ATG C	

3.1.5.2 Sequenzierung

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Primer wurden zur Sequenzierung von Plasmidkonstrukten verwendet, die als Vorlage zur Synthese von *in situ* Hybridisierungssonden dienten. Da die beiden Primer innerhalb des Plasmids binden (in den Promoterregionen für die RNA-Polymerasen SP6 und T7), sind sie optimal dafür geeignet ein dazwischen inseriertes DNA-Fragment zu amplifizieren. Des Weiteren sind die für das Sequenzieren des KCNQ5KO Vektors verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 6 | Primer zum Sequenzieren von DNA-Fragmenten im pGEM®-T Easy Vektor und Primer zum Sequenzieren des KCNQ5 KO Vektors

Primer	Ziel	Sequenz
#6215_T7	Sequenzierung der <i>in situ</i> Konstrukte	AAT ACG ACT CAC TAT AGG
#2727_sp6L	Sequenzierung der <i>in situ</i> Konstrukte	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT
#6750_mQ5seq1	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GTTTAGCATAAGCCTAGGATGGGAAGC
#6751_mQ5seq2	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GATTTGGCAGAAAAACAATGGTTGC
#6752_mQ5seq3	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TTTCTGTCCCATATTTCTCAATTTCTTGC
#6753_mQ5seq4	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GGAAGGAAGGTAGGCAGTAAGTAGCTATGG
#7358_Q5_loxPa_for	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CTCCCCAACATGATCACCTAAACA
#2542_onQ5-DN_F	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ACAGCAGATTTGGTTACCATAACTTCG
#10362	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TGACAAATGGAAGTAGCACG
#2258_NEOh	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GAACTGCAGGACGAGGCAG
#317_Neo1632F	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGG
#1651_cre_E196	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTG
#2404_loxp	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTAT
#7362_Q5_Exon6_for	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CAAAGAGAAGTGCTGTTATG
#1676_mQ5_KO_F	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TGGCCTGTGTTGGACTATATCCACTAGC
#189_mQ5_genF	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GCCTTTGAATACACATGGACAACTGG
#6949_kcnq5_ko_primer2_fw	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CATGGGCTAATGAGACAAAACACCCCTA
#6754_mQ5seq5	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GTCAGATGATTATACCAGTGTACAGCC
#6755_mQ5seq6	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ACTGCACAGACTATGTACGTACTAGGATATTATGC
#6756_mQ5seq7	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ATGTGATAATATAAATCAAGTGATTACTGTGAGG
#6757_mQ5seq8	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CAGCAGAAAAGGCACTGCACAGG
#6945_kcnq5prob3_1_fw	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	AGCGCTGCCTGATTGAAA
#6944_kcnq5prob3_2_rv	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CATTGGGGTGGACTTTGAG
#2463_pEGFP_2as	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GGACAAACCACAACCTAGAATGCAG
#4647-C3 Probe Stul R	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CCATCAACGGTTCAGTGAGAC
#6974_taqminus600r	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GGACTATAAAGATACCAGGCG
#8942_pcDNA5_FRT_to_seq7	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACC
#6598_Ampr	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TCACCAGCGTTTCTGGGTGA
#230_Q5wtFor	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ACCCATAAATTCTCCCCAACATGATCACC

Primer	Ziel	Sequenz
#444_mQ5RT4r	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GAAAGAAATGCCAAGGAGTGCG
#2833-Neo-300F	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGA
#4920_m13h-20	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GTAAAACGACGGCCAGT
#6859KCNQ3_FRT/loxP	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTA
#1138_jf_mC7gen7as	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CCGAAAAGTGCCACCTGAC
#10571_Seq1	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	AGTCAGCTTTTATGGTTGTCTCAG
#10572_Seq2	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GGCAAGGATCCTGAAATGAAAC
#10573_Seq3	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GCGTTTTGCTGGGAGAGTA
#10574_Seq4	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TGCCACCCAAACAAATC
#10575_Seq5	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	AACCAGGTCATAGTCACAATCAGA
#10576_Seq6	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	GATCCCTTCATGCCTTCAA
#10577_Seq7	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CTATTGCTTTGAAGAGACACTATG
#10578_Seq8	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CAACACAGAAAGATGAAGAGGAT
#10579_Seq9	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CAGCACAATGTTGAGGGTAA
#10580_Seq10	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TAGTGTCATTTTCTGTTGCTTAGT
#10581_Seq11	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	AATAAAGTTAGGAGAAGAATCAGC
#10582_Seq12	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TTAACAAACAAACACAACAGT
#10583_Seq13	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	TGCTCCCATTCATCAGTTCC
#10584_Seq14	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	CCCACAGTACAAGCAAGGA
#10585_Seq15	Sequenzierung KCNQ5 KO Vektor	ATTTTGGAGAATGAGCCAGCG

3.1.5.3 Sonden für *in situ* Hybridisierungen

Die folgenden Primerpaare (Tabelle 7) wurden verwendet um die DNA-Vorlage für die Synthese der *in situ* Hybridisierungs sonden zu amplifizieren. Als Vorlage zur Amplifizierung diente eine cDNA-Bibliothek aus Gehirnlisat.

Tabelle 7 | Primer zum Amplifizieren der DNA-Vorlagen für *in situ* Hybridisierungssonden

Sonde	Primer	Sequenz	Länge der Sonde [bp]
c-Ret	#12448_c-Ret_for1	ATCAGTTATTCTCCTCAGGCA	902
	#12449_c-Ret_rev1	AGCATCAGACGGTACATTCTCT	
Calbindin	#12454_Calbind_for1	GAACTATTCAGGATGTGTGGCA	580
	#12455_Calbind_rev1	GGGCTATGGTCATACTCTCTGG	
Calretinin	#12450_Calret_for1	GATGCTGACGGAAATGGG	894
	#12451_Calret_rev1	CCCTACCAGCCACCCTCT	
KCNQ2_AllenBrain	#9861_Q2fw_ISH	TCATACTGATGTGCACCCTAGC	336
	#9862_Q2rv_ISH	GTTTTACTAAGTGCCCAGGTCC	
KCNQ2_1	#7396_kcnq2_fw	AGGAAGCCGTTCTGTGTGA	234
	#7397_kcnq2_rv	GCAGAGGAAGCCAATGTACC	
KCNQ2_2	#128_Q2_1F	TGGTGCTGATTGCCTCCATT	289
	#4696_mQ2_seq3	CACCAGAGTGCATCTGCGTAGG	
KCNQ2_3	#3980-NK-34	CTGAACCAGCTGGAGCTGCTGAGG	341
	#3982-NK-36	GCACCCTTGATGCGGAAAGCCTGG	
KCNQ2_long1	#3970-NK-24	CCAGGCTTCCGCATCAAGGGTGC	1026
	#4937_MK2r	CCCTCTGCAATGTAGGGCCTGAC	
KCNQ2_long3	#3953-NK-6	CTTTGACACCTACGCGGATGC	1123
	#3984-NK-38	CATGGACAAGACCTGCTTCTCCAC	
KCNQ3_AllenBrain		AATGAACCATATGTAGCCAGGG CACTGGGGCCAAATACATAATC	664
KCNQ3_Exon2-4 short	#9326_Q3KO_fw3	GCTGCAGGATGTTGCTGTGCATAC	365
	#9327_Q3KO_rev3	CCTTCATTTCTCTCCTTGGGC	
KCNQ3_Exon2-4	#9324_Q3KO_fw2	GGAGCTGAGTTTGCTTTGAGGATC	423
	#9325_Q3KO_rev2	CCACAGAGCATCTGCATAGGTCTC	
KCNQ3_Exon3	#9322_Q3KO_fw1	CCTGTGCATGTTGGACATCTTCG	200
	#9323_Q3KO_rev1	CAGTGATGAGTTCCTTGCTGTGGGC	
KCNQ3_Exon10-12	#7398_kcnq3_fw	AAGACAGGGGCTATGGGAAT	252
	#7399_kcnq3_rv	TTTTGGAGTGGATGGAGGTC	
KCNQ3_Exon13-14	#4940_MK3a	CCAAGGAATGAACCATATGTAGCC	468
	#4939_MK3r	CAGAAGAGTCAAGATGGGCAGGAC	
KCNQ4_AllenBrain	#9865_Q4fw_ISH	AGCATTCTCCCATCTTTCAGAG	447
	#9866_Q4rv_ISH	ACACTGGTAGCTCTTCTCCTCG	

Sonde	Primer	Sequenz	Länge der Sonde [bp]
KCNQ4_Exon2-5	#2287_4em1r	ACCAGAGCGAGTCCGGCATAGGAGG	468
	#2288_4em3h	CCATCCAGGAGCACCAGGAACTTG	
KCNQ4_Exon5-7	#1755_4em5h	AGCTGATCACCGCCTGGTACATCG	281
	#5934_ReK-3	GTGCTGCTCCTGGACCTTCAGG	
KCNQ4_Exon7-8	#2270_7h	CTTTGCCCTGAAGGTCCAGGAGC	151
	#2292_4em3r	GCTGTCATAGTAATACCAGGTGGC	
KCNQ4_Exon7-8#2	#6901_FwQ4Ex7	AGGAGCAGCACAGGCAGAAGC	134
	#2292_4em3r	GCTGTCATAGTAATACCAGGTGGC	
KCNQ4_Exon7-10	#6901_FwQ4Ex7	AGGAGCAGCACAGGCAGAAGC	488
	#5931_Mu3a-SaII-rsp	ATACATGTCGACTCATGTCTCACTTGGAACTTCC	
KCNQ4_G	#1755_4em5h	AGCTGATCACCGCCTGGTACATCG	758
	#6900_RvQ4Ex10	GGTGCGGTCATTGAAGCTCCAG	
KCNQ4_long1	#2288_4em3h	CCATCCAGGAGCACCAGGAACTTG	1109
	#6900_RvQ4Ex10	GGTGCGGTCATTGAAGCTCCAG	
KCNQ4_long2	#1755_4em5h	AGCTGATCACCGCCTGGTACATCG	1028
	#8090_RvQ4_RT-PCR	CAGGCTCTTGATTCTGCCAGC	
KCNQ4_long3	#6901_FwQ4Ex7	AGGAGCAGCACAGGCAGAAGC	1097
	#7416_K4Ca_rv	GGTGCTGACTGAGCGAGAGATGCT	
KCNQ5_AllenBrain		ACGTCAGATAAGAAGAGCCGAG GCAGGTGGTGACATCAGAAATA	609
KCNQ5_1	#4946_hKCNQ5-02-h	TTGGAGTTCATCATTCGAATCTGG	498
	#444_mQ5RT4r	GAAAGAAATGCCAAGGAGTGCG	
KCNQ5_2	#67_mQ5_RT_2f	CCGCCAGAAGCATTGTTGAGA	541
	#34_mQ5_5_R	TTTAAGTGGTGGGGTGAGGTCC	
KCNQ5_long3	#4949_hKCNQ5-05_h	GCTGGGAAGATTGCTTTCTGCAGG	1098
	#34_mQ5_5_R	TTTAAGTGGTGGGGTGAGGTCC	
Nav1.8_1	#9174_Nav1.8_for1	GCAAAGAGGACAGAAGACAAGAG	863
	#9175_Nav1.8_rev1	AAGTTTTCCGGCAGACATAATCAT	
Nav1.8_2	#9176_Nav1.8_for2	AATCTGGGGAGTTGGATTCTCT	729
	#9177_Nav1.8_rev2	ATGTGTCTCTGGAAGTTCTGGTT	
Parvalbumin_1	#12486_Parv_For2	TGCTGCAGACTCCTTCGACCACAAA	736
	#12487_Parv_Rev2	GACTCAACCCCTTCCCTTCCCTTCT	
Parvalbumin_2	#12488_Parv_For3	AGATGGTGGCCTGAAGAAAAAGAAC	788
	#12489_Parv_Rev3	TTTCTTTTTCAGGTATTTATCACAGC	

Sonde	Primer	Sequenz	Länge der Sonde [bp]
Piezo2_1	#12470_Piezo2_For3	GCCCCGGTTTTTGCTGCTATTCTATGC	1098
	#12471_Piezo2_Rev3	ATCCCAAACACGAGGATGACCTGGAAGATG	
Piezo2_2	#12472_Piezo2_For4	GTGAAGTGTGTACTTTGGGCTGTCTGC	1070
	#12473_Piezo2_Rev4	TTGAAGACCACCAGTTCCAAGGCTTGG	
Piezo2_3	#12474_Piezo2_For5	GCATCATGGCCGGGGACAAT	1073
	#12475_Piezo2_Rev5	CTGCTCTTCTCTGGCCAACCTTTT	
Piezo2_4	#12476_Piezo2_For6	AGAGGAGGAAAGAGAAGAAAAAGT	1003
	#12477_Piezo2_Rev6	TCATGAGTCAGAGGTGGTAA	
Piezo2_5	#12478_Piezo2_For7	GCCCCGGTTTTTGCTGCTAT	1118
	#12479_Piezo2_Rev7	TGAAGAACATCCAGAAGTGAATC	
Piezo2_6	#12480_Piezo2_For8	CTTACCCGGTGTGACTGAGA	1068
	#12481_Piezo2_Rev8	AGAACCCACCACTCACTATT	
TRPV1_1	#9178_TRPV1_for1	GCCCCACATCTTTGCTACC	603
	#9179_TRPV1_rev1	TTGAAGAAGTCCCCGTTAGC	
TRPV1_2	#9180_TRPV1_for2	GTGATCGCTACAGTAGCAGTG	711
	#9181_TRPV1_rev2	ACATGTGGAATACAGGCTGTTG	
TrkC_1	#12440_TrkC_for1	TTGTCAAGTTCTATGGGGTGTG	278
	#12441_TrkC_rev1	TAGTAGATTGGCTCCAACCAGG	
TrkC_2	#12442_TrkC_for2	TTGTCAAGTTCTATGGGGTGTG	538
	#12443_TrkC_rev2	CTGGGTCTCTCCAAGACACG	
TrkC_3	#12444_TrkC_for3	GGGTGTCCATAGCAGTCGG	785
	#12445_TrkC_rev3	TAGTAGATTGGCTCCAACCAGG	

3.1.5.4 Proben für Southern Blot

Die folgenden Primer (Tabelle 8) wurden zur Synthese der Southern Blot Probe aus ES-Zell-DNA verwendet.

Tabelle 8 | Primer zur Synthese der Southern Blot Probe

Primer	Sequenz	Länge der Sonde [bp]
#6958_kcnq5probe5_fw	GGGGTGAACAAGCTAACTCCAT	890
#6959_kcnq5probe5_rv	TGTGAGACTTGGAGGTGCTTAGAG	

3.1.6 ES-Zellen

Für die Erzeugung der KCNQ5 KO Maus wurde die murine embryonale Stammzelllinie R1(129/SvJ) verwendet (Nagy et al., 1993).

3.1.7 Antikörper

In folgender Tabelle 9 werden die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper aufgelistet.

Tabelle 9 | Liste der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung	Anwendung	Herkunft
AnkyrinG	Maus	1:50	IHC	Zymed
β-Actin	Maus	1:1000	WB	Sigma
KCNQ2A	Meerschweinchen	1:100	IHC	Jentsch Lab
KCNQ3C	Kaninchen	1:200	IHC	Jentsch Lab
KCNQ4A	Meerschweinchen	1:200	IHC	Jentsch Lab
KCNQ5C2a	Kaninchen	1:200	IHC	Jentsch Lab
		1:500	WB	
NF200	Maus	1:1000	IHC	Sigma
TrkB	Ziege	1:1000	IHC	R & D Systems

IHC: Immunhistochemie; WB: Western Blotting

Die Sekundärantikörper für Anwendungen in der Immunfluoreszenz waren mit Alexa Fluor-Farbstoffen (1:1000; Molecular Probes, Leiden/Niederlande) gekoppelt. Zur Entwicklung von Western Blots wurden mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper (1:5000; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) verwendet. Die Detektion der Einfach *in situ* Hybridisierungen erfolgte durch mit alkalischer Phosphatase gekoppelte anti-Digoxigenin (DIG) Antikörper (1:2000; Roche); die Signale der Doppel *in situ* Hybridisierungen wurden mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörpern gegen Digoxigenin und Fluoreszein (FITC) (1:1000; Perkin Elmer) entwickelt.

3.1.8 Mauslinien

Die für die hier dargestellten Experimente benutzten Mäuse wurden in der Tierhaltung des MDC bei einem Licht/Dunkelzyklus mit Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr und Dunkelheit von 19:00 bis 7:00 Uhr gehalten. Die in Tabelle 10 aufgeführten Mauslinien wurden verwendet.

Tabelle 10 | Verwendete Mauslinien

Kurzname	Offizieller Name	Herkunft / Referenz
Cre-del/BI6	B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn	(Schwenk et al., 1995)
KCNQ2KO	B6.129P2-Kcnq2 ^{tm1Dgen} /J	Jackson laboratory, Bar Harbor, ME / (Tzingounis and Nicoll, 2008)
KCNQ3KO	B6-KCNQ3 ^{tm4TJJ}	AG Jentsch, Matthias Heidenreich (Schleifenbaum et al., 2014)
KCNQ4KO	B6-KCNQ4 ^{tm2TJJ}	AG Jentsch, Tatjana Kharkovets (Kharkovets et al., 2006)
KCNQ5DN	B6-KCNQ5 ^{tm1TJJ}	(Tzingounis et al., 2010)
KCNQ5KO	B6;129-KCNQ5 ^{tm2TJJ}	AG Jentsch, Sebastian Schütze
KCNQ2-KCNQ3KO	B6.129P2-Kcnq2 ^{tm1Dgen} /J x B6-KCNQ3 ^{tm4TJJ}	AG Jentsch
KCNQ3lox-SNS-Cre	B6.129-KCNQ3 ^{tm2TJJ} x B6.129-TG ^{Sns1-Cre}	AG Jentsch, Matthias Heidenreich

3.1.9 Bilddokumentation

Chemilumineszenz Signale wurden mit dem Kamerasystem ChemiSmart 5000/ChemiCapt (PeqLab) detektiert. Für Agarosegele kam ein Digital-Video-System (Intas, Göttingen) zum Einsatz, und Agarose Bilder wurden auf Thermopapier (Mitsubishi Thermodrucker) ausgedruckt.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Einfach *in situ* Hybridisierungen erfolgte an Hand eines Zeiss Axiophots mit 5x, 10x, 20x, 40x und 100x Vergrößerungsobjektiven. Bilder wurden mit Hilfe der Kamera Kappa DX 20 HC-FW und entsprechender Kappa Imaging Software aufgenommen.

Für immunhistochemische Untersuchungen und Doppel *in situ* Hybridisierungen mit Fluoreszenzsignalen wurde ein konfokales Mikroskop mit 10x, 40x und 63x Vergrößerungsobjektiven benutzt (Leica TCS SP2). Bilder wurden mit der dazugehörigen Software aufgenommen und wenn nötig mit Adobe Photoshop CS5 nachbearbeitet.

3.1.10 Messplatz zur elektrophysiologischen Ableitung von Haut-Nerv Präparationen

Der Messplatz zur elektrophysiologischen Ableitung von Haut-Nerv Präparationen wurde aus folgenden in Tabelle 11 dargestellten Komponenten erstellt.

Tabelle 11 | Komponenten des Messplatzes zur Ableitung elektrophysiologischer Haut-Nerv Präparationen

Bestandteil	Hersteller	Funktion
PowerLab 8/30 & LabChart Pro Software	ADInstruments	Datenanalyse und Verarbeitung, Steuerung des Nanomotors
NeuroLog NL900D Rack, NL104 AC Pre Amplifier, NL120S Audio Amplifier, NL125/126 Filters, NL301 Pulse Generator, NL510A Pulse Buffer	Digitimer Ltd	Verstärker, Filter, Audioverstärker, Pulse Generator
Nanomotor® / NanoControl Steuerung	Kleindiek Nanotechnik GmbH	Kraft Applikation
Kraftmesssystem	Kleindiek Nanotechnik GmbH	Messung der Kraft
Einhängethermostat MA	Julabo	Beheizung des Wasserbads
Minipuls® 3	Gilson	Peristaltische Pumpe
Leica M60 Stereomikroskop mit Schwenkarm	Leica	Vergrößerung der Haut-Nerv- Präparation
Schwanenhalslichtleiter, Schott KL1500 LED	Leica	Beleuchtung
MB-B-DG8C Magnethalter	Kanetec	Magnethalter
Manueller Mikromanipulator #M3301	World Precision Instruments	Mikromanipulator
Plexiglas-Kammer	Eigenbau Werkstatt MDC	Messkammer

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden *E. coli* Bakterien verwendet. Nachdem die Bakterien chemisch kompetent gemacht wurden (Kapitel 3.2.1.1), konnten sie mit Plasmid-DNA Molekülen transformiert werden (Kapitel 3.2.1.2), um anschließend die Plasmid-DNA aus den Bakterien aufzureinigen (Kapitel 3.2.2.1.1 und 3.2.2.1.2).

3.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine Übernachtskultur wurde in 250 ml frisches SOC-Medium überimpft. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0.5 – 0.6 wurden die Zellen zunächst für 10 min in vorgekühlten Zentrifugationsröhrchen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und in eiskaltem TB resuspendiert. Nach erneuter 10 minütiger Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen bei 3500 rpm und 4°C sedimentiert und in 18.5 ml eiskaltem TB resuspendiert. Nun wurde tröpfchenweise 1.5 ml DMSO zugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. 200 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.2 Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Chemisch kompetente *E. coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 – 3 µl Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurden die Bakterien in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (PegLab) überführt. Die Elektroporation wurde mit Hilfe eines Gene-Pulsers (BioRad) bei 1.8 kV Spannung, 400 Ω Widerstand und 25 µF Kapazität durchgeführt. Die elektroporierten Bakterien wurden in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 150 µl LB-Medium resuspendiert und auf mit Antibiotika versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Isolierung von DNA

Aus transformierten Bakterien-Kulturen wurde mittels Mini- und Midiprep Plasmid-DNA gewonnen (Kapitel 3.2.2.1.1 und 3.2.2.1.2). Zum Genotypisieren der gehaltenen Mauslinien wurden den Tieren Schwanzbiopsien entnommen, aus denen anschließend genomische DNA gewonnen werden konnte (Kapitel 3.2.2.1.3). Für die Southern Blot Analyse wurde aus ES-Zellen genomische DNA isoliert (Kapitel 3.2.2.1.4).

3.2.2.1.1 Präparation von Plasmid DNA aus 2 ml Kulturen (Miniprep)

Mit Antibiotika versetztes LB-Medium (2 ml) wurde mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht bei 37°C im Multitron-Schüttelinkubator (Infors HT) inkubiert. Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin®-Plasmid-QuickPure-Kits (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben. Das Prinzip der Plasmid-Aufreinigung basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien.

3.2.2.1.2 Präparation von Plasmid DNA aus 100 ml Kulturen (Midiprep)

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 100 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium mit 100 µl einer Miniprep Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Multitron-Schüttelinkubator (Infors HT) inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des PureLink™-HiPure-Plasmid-Filter-Midi-Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben isoliert.

3.2.2.1.3 Präparation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Mit Hilfe der „Hot Shot“ Methode wurde aus Schwanzbiopsien genomische DNA gewonnen. Zunächst wurde das Schwanzgewebe mit 75 µl Hot Shot Lyse Puffer versetzt und für 30 min auf 95°C erhitzt. Nachdem die Probe auf Eis abgekühlt wurde, konnten 75 µl Hot Shot Neutralisations Puffer hinzugegeben werden. Die Genotypisierungs PCR erfolgte mit 1 µl Hot Shot DNA.

3.2.2.1.4 Präparation genomischer DNA aus Zellen

ES-Zellen wurden auf 96-Lochplatten kultiviert. Nach dem Entfernen des Mediums, wurde 100 µl Lysis Puffer (ES-Zellen) hinzugegeben und über Nacht bei 55°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden 10 µl 8 M Lithiumchlorid (LiCl) und 100 µl Isopropanol hinzugefügt und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die 96-Lochplatten 30 min bei 3500 rpm abzentrifugiert und das gewonnene DNA-Pellet mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 3500rpm, wurde das DNA-Pellet anschließend getrocknet und über Nacht in 40 µl Low-TE-Puffer resuspendiert.

3.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA. Die Standard-PCR wurde mit Hilfe der OptiTaq-DNA-Polymerase (Roboclon) durchgeführt. Für Genotypisierungs-PCRs wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Primer verwendet. Die DNA Vorlagen für die Erstellung von *in situ* Hybridisierungssonden wurden durch PCR aus einer cDNA Bibliothek mit Hilfe der in Tabelle 7 aufgeführten Primer erstellt. Die Southern Blot Probe wurde durch PCR mit den in Tabelle 8 genannten Primer synthetisiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde folgender Ansatz (50 µl) verwendet: 20 pmol von beiden Primern, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 2 µl 50 mM MgCl₂, 5 µl 10x PCR Puffer, 50-100 ng DNA und 1.5 U OptiTaq-DNA Polymerase. Je nach Amplifikationsprodukt und Primerpaar wurde das in Tabelle 12 dargestellte Programm modifiziert.

Tabelle 12 | Standard PCR Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	5 Min	
Denaturierung	95	30 s	30 – 39 x
Anlagerung der Primer	54 – 65	30 s	
Elongation	72	1 Min/kb	
Finale Elongation	72	10 Min	
Kühlen	10	unbegrenzt	

3.2.2.3 Isolierung von RNA

Das Gewebe wurde entnommen, in flüssigem Stickstoff gefroren, mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert und mit 1 ml Trizol (Invitrogen) homogenisiert. Nach einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 12000 g auf 4°C wurde der Überstand mit 200 µl Chloroform versetzt und 15 s gut durchmischt. Anschließend wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zentrifugiert (12000 g, 4°C, 15 min). Die obere Phase wurde mit 500 µl Isopropanol gefällt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (12000 g, 4°C, 15 min). Das entstandene Pellet wurde zweimal mit jeweils 1 ml eiskaltem 75%igen Ethanol gewaschen, bei 7500 g, 4°C 5 min zentrifugiert, luftgetrocknet und 10 min bei 55°C in 50 – 100 µl Ribonuklease (RNase) freiem Wasser resuspendiert. Im Anschluss wurden 10 µl

Desoxyribonuklease I (DNase I) Puffer und 1 µl DNase I hinzugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert.

3.2.2.4 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit Hilfe des Superscript II-KitsTM (Invitrogen). 1 µg RNA, 1 µl 10 mM dNTPs und 100 ng Random Primer wurden für 5 min auf 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 µl First strand buffer, 2 µl 100 mM DTT und 1 µl RNaseOutTM (Invitrogen) hinzugegeben und zunächst für 10 min bei 25°C, und anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Superscript Reverser Transkriptase (SS-RT) erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 25°C, eine 50 minütige Inkubation bei 42°C und schließlich eine 15 minütige Inkubation bei 70°C. Im Anschluss kam die entstandene cDNA auf Eis und wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach dem Thermozyklusverfahren mit Taq-Polymerase und fluoreszenzmarkierten Primern bzw. Terminatoren (Applied Biosystems). Die Gelelektrophorese und Detektion wurde mit einem ABI 377 Sequenzierer durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit der DNA-Star Software (Lasergene) analysiert.

3.2.2.6 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe eines Spektrophotometers ND-1000 (NanoDrop). Eine bei 260 nm gemessene OD von 1 entspricht hierbei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder einzelsträngiger DNA, oder 33 µg/ml Oligonukleotid. Die Reinheit der Nukleinsäure Probe wurde mittels des Quotienten OD 260 nm / OD 280 nm bestimmt. Bei reinen DNA Lösungen sollte der Wert bei 1.8 liegen, bei reinen RNA Lösungen bei 2.0.

3.2.2.7 Restriktionsverdau von DNA

Enzymmenge, Puffer und Reaktionsbedingungen des Restriktionsverdau von DNA wurden entsprechend der Angaben des Herstellers gewählt.

3.2.2.8 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Proben erfolgte auf 0.7 – 2%igen (w/v) Agarosegelen. Agarose wurde hierzu durch Aufkochen mit 1x TAE-Puffer gelöst, und mit dem Farbstoff Ethidiumbromid (Roth) (Endkonzentration 0.5 µg/ml) versetzt. Die DNA Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel beladen. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresekammern mit TAE-Puffer bei einer Spannung von 60 – 150 V. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden mittels Transilluminator (PeqLab) detektiert.

3.2.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA Fragmente wurden mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben aus Agarosegelen aufgereinigt.

3.2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase gemäß Herstellerangaben 1 h bei Raumtemperatur entsprechend folgender Gleichung in den pGEM-T Easy Vektor ligiert:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

3.2.2.11 Phenol/Chloroform Extraktion von DNA

DNA wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt. Hierzu wurden 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roti) zur DNA gegeben und gründlich gemischt. Anschließend wurde die Emulsion für 10 min bei 20000 g zentrifugiert, und die daraus entstandene obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 30 µl 8 M LiCl und 300 µl kaltes Isopropanol wurden hinzugegeben, gemischt, und 5 min inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch 20 minütige Zentrifugation bei 20000 g und 4°C sedimentiert und das entstandene DNA-Pellet anschließend mit 500 µl eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Nach weiterer Zentrifugation (20000 g, 4°C, 10 min) und Lufttrocknung wurde das Pellet in 100 µl low-TE Puffer resuspendiert.

3.2.2.12 *In vitro* Transkription der Digoxigenin / Fluorescein markierten RNA Sonden

Die *in vitro* Synthese der Digoxigenin und Fluorescein markierten „sense“- und „antisense“-Sonden für *in situ* Hybridisierungen erfolgte mit Hilfe des DIG- bzw. Fluorescein-RNA labeling Mixes (Roche) nach Herstellerangaben. Lineare Plasmid-DNA wurde hierzu durch Inkubation (2 h, 37°C) mit der T7-, T3- oder Sp6-RNA-Polymerase in Gegenwart von RNase Inhibitor in RNA transkribiert. Anschließend wurde die eingesetzte DNA durch einen 15 minütigen DNase I Verdau bei 37°C entfernt.

3.2.2.13 Aufreinigung von RNA Sonden

Die DIG- bzw. Fluorescein-markierten RNA Sonden wurden über das RNeasy Mini Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt, in 40 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.2.2.14 Klonierung des Targetingvektors zur Erzeugung von KCNQ5 KO Mäusen

Der Targetingvektor zur Generierung der KCNQ5 KO Mauslinie wurde von T. Kharkovets (ZMNH Hamburg) kloniert. Er enthält zwei Stopcodons innerhalb Exon 6 und eine mit loxP Stellen flankierte Neomycin Resistenz Kasette (NEO^R). Zur Erhöhung der Rekombinationswahrscheinlichkeit wurden die homologen Arme des von T. Kharkovets klonierten KO Vektors (11500 kb) um weitere 3800 kb verlängert. Vor der Elektroporation wurde der komplette KCNQ5 KO Vektor durch Sequenzierung (Kapitel 3.2.2.5) auf seine korrekte Sequenz hin überprüft.

3.2.2.15 Southern Blot

Mit Restriktionsenzymen geschnittene genomische DNA wurde auf einem 0,7%igen Agarosegel bei 80 V aufgetrennt. Zur Depurinierung der DNA wurde das Gel 7 min in 0.25 M HCl inkubiert und 30 min in 0.4 M NaOH gewaschen. Anschließend wurde die DNA mittels Kapillarblot mit 0.4 M NaOH über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond XL Membran, Amersham Biosciences) transferiert. Mittels UV-Stratalinker 2400 (Stratagene) wurde die Membran fixiert und anschließend zweimal mit 2x SSC Puffer gewaschen. Die Membran wurde mit 6 – 11 ml vorgewärmtem Rapid-Hyb-Puffer (GE Healthcare) zwischen 30 min und 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der radioaktiv markierten Southern Blot

Probe hybridisiert. Hierzu wurde die durch Restriktionsverdau aus dem pGEM-T Easy Vektor gewonnene Sonde mittels Illustra™GFX™PCR-DNA-and-GelBand-Purification-Kit (GE Healthcare) aufgereinigt, und mit Hilfe des Prime-it II Random Primer-Labeling-Kits (Stratagene) mit ³²P radioaktiv markiert. Hierzu wurden Random Primer zu der markierten Sonde gegeben und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach der Zugabe von dCTP-Puffer, ³²P-dCTP und Klenow wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde durch QuickSpin-Columns (Roche) entsprechend Herstellerangaben. Die aufgereinigte DNA wurde durch 5 min Inkubation bei 95°C denaturiert und in den Rapid-Hyb-Puffer gegeben und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal je 5 min mit vorgewärmter Waschlösung A und zwei Mal je 15 min mit vorgewärmter Waschlösung B bei 65°C gewaschen. Nachdem die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen wurde, wurde sie über Nacht auf Phosphor-Imaging-Platten (FUJI Imaging Plate; FUJI) exponiert und mittels Bio-Image-Analyser BAS-1500 (Fuji) detektiert.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Membranpräparation

Entnommene Organe wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 3 ml eiskalten Homogenisierungspuffer überführt. Das Gewebe wurde mittels Ultra Turrax-T25 und eines Glas-Homogenisierers zerkleinert und zentrifugiert (1000 g, 4°C, 10 min). Nachdem der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde erneut zentrifugiert (1000 g, 4°C, 10 min). Anschließend wurde der Überstand in Ultrazentrifugen-Röhrchen gegeben und 30 min in einer Ultrazentrifuge bei 50000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Lysis Puffer resuspendiert.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde mit Hilfe des BCA-Protein-Assay-Kits (Pierce) entsprechend Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot Analyse

8,5%ige SDS-Polyacrylamidgele (modifiziert nach Laemmli, UK; Nature 1970) wurden mit Proben vergleichbarer Proteinmengen beladen und bei 90 – 180 V aufgetrennt. Der PageRuler-Plus-Prestained-Proteinleiter (Fermentas) diente als Größenmarker. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (Roth) erfolgte mit Hilfe des MiniTrans-Blot-Systems (BioRad) 2 h bei 85 V und wurde mittels Ponceau Färbung kontrolliert. Anschließend wurden die Membranen für 60 min in Western Blot Block Lösung inkubiert. Die Primärantikörper wurden in Western Blot Block Lösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Membranen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer, wurden die in Western Blot Block Lösung verdünnten Sekundärantikörper für 60 min auf die Membranen gegeben. Anschließend wurde drei Mal mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion des SuperSignal-West-Pico-Chemiluminescent-Substrats bzw. des SuperSignal-West-Femto Chemiluminescent-Substrats (Thermo Scientific) und wurde mittels des Kamerasystems ChemiSmart 5000/ChemiCapt (PeqLab) sichtbar gemacht.

3.2.3.4 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Die Aufreinigung polyklonaler Antikörper erfolgte mit Hilfe von SulfoLink-Säulen (Pierce), an die das zur Immunisierung verwendete Peptid nach Herstellerangaben gekoppelt wurde. Das aufzureinigende Serum wurde 1:1 mit TBS verdünnt und über Nacht bei 4°C auf der zuvor mit TBS Puffer äquilibrierten Säule inkubiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 1x PBS und einmal mit 0.1x PBS gewaschen. Die Antikörper wurden mit 450 µl 100 mM Glycin (pH 2.5) von der Säule eluiert und in 50 µl 10x Neutralisationspuffer aufgenommen. Zur Stabilisierung der aufgereinigten Antikörper erfolgte die Zugabe von 0.1% BSA und 0.01% NaN₃. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 1 M NaCl und einmal mit 1mM NaN₃ gewaschen und für weitere Aufreinigungen bei 4°C mit 1 ml 1mM NaN₃ aufbewahrt.

3.2.4 Zellbiologische Methoden und Erzeugung transgener Tiere

3.2.4.1 Kultivierung von Feederzellen für die ES-Zell Kultur

Die Feederzellen wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C erwärmt und in 10 ml warmes Zellkultur Medium überführt. Nach der Zentrifugation (1100 rpm, 5 min) wurden die Zellen in frischem Zellkultur Medium resuspendiert, auf Zellkulturplatten (Greiner Bio-One) ausplattiert und in einem Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Inaktivierung der Feederzellen für die ES-Zell Kultur wurden die Zellen mit 10 µg/ml Mitomycin C (Sigma) behandelt.

3.2.4.2 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden aufgetaut und das Einfriermedium mit DMSO durch 37°C warmes ES-Zell Medium ersetzt. Die ES-Zellen wurden auf inaktivierten Feederzellen in Zellkulturplatten (Greiner Bio-One) in einem Inkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Alle 24 h, sowie 2 h vor dem Passagieren wurde das ES-Zell Medium gewechselt. Zum Passagieren wurden die Zellen 5 min bei 37°C mit 0.25% Trypsin/EDTA (PAN Biotech) inkubiert und mit ES-Zell Medium abgestoppt. Nach der Vereinzelnung und Zentrifugation (800 rpm, 5 min) wurden die Zellen in der gewünschten Dichte auf neuen Zellkulturplatten ausgesät. Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert (800 rpm, 5 min) und in Einfriermedium in Kryogefäßen (Greiner Bio-One) auf -80°C gefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.4.3 Targeting embryonaler Stammzellen

ES-Zellen wurden mit 30 µg linearisiertem Targeting-Vektor elektroporiert. Hierzu wurde der KCNQ5 KO Vektor mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert, mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, in low-TE-Puffer resuspendiert und 5 min mit $\sim 1 \times 10^7$ ES-Zellen inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in GenePulser-Elektroporationsküvetten mit Hilfe des GenePulser II (Bio-Rad) bei 240 V und 500 µFD. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf drei 10 cm Zellkulturplatten mit inaktivierten Feederzellen ausgesät.

3.2.4.4 Selektion und Auswahl rekombinierter Klone

24 h nach der Elektroporation wurde mit der Selektion begonnen. Hierzu wurde für 7 – 9 Tage täglich frisches ES-Zell Medium mit 400 µg/ml Geneticin (Invitrogen) auf die elektroporierten Zellen gegeben. Große, runde, undifferenzierte Einzelkolonien wurden in 96-Lochplatten gepickt und für weitere 1 – 2 Tage auf inaktivierten Feederzellen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert und auf vier 96-Lochplatten verteilt. Zwei der Platten wurden lediglich mit 0.1% Gelatine beschichtet, während zwei Platten mit Feederzellen versehen waren und dem Einfrieren der ES-Zellen dienen (Kapitel 3.2.4.2). Aus den konfluenten gelatinisierten ES-Zell Platten wurde DNA zur Southern Blot Analyse (Kapitel 3.2.2.1.4 und 3.2.2.15) gewonnen. Durch Southern Blot Analyse bestätigte positive Klone wurden aufgetaut und auf 6 cm Zellkulturplatten mit inaktivierten Feederzellen kultiviert. Zwei Stunden vor der Blastocysteninjektion wurden die Zellen trypsiniert, vereinzelt, zentrifugiert (800 rpm, 3 min) und in 500 µl ES-Zell Medium resuspendiert. Um Feederzellen absinken zu lassen, wurden die Zellen anschließend für 30 min bei 37°C in nicht gelatinisierten 24 Lochplatten inkubiert. Der hieraus gewonnene, aus ES-Zellen bestehende Überstand wurde zur Blastozysteninjektion in C57Bl/6J Blastozysten verwendet (durchgeführt durch Katja Becker/ Transgene Core Facility des MDC-Berlin).

3.2.4.5 Chimäre Tiere

Um die NEO^R Kasette zu entfernen, wurden chimäre Nachkommen mit Cre-Rekombinase exprimierenden „Deleter“ Mäusen verpaart (Schwenk et al., 1995). Dies wurde durch Genotypisierungs-PCR überprüft. Der erfolgreiche Knock-out wurde mit Hilfe von Sequenzierung (Kapitel 3.2.2.5), Genotypisierungs-PCR (Kapitel 3.2.2.2; Tabelle 5) und Western Blot (Kapitel 3.2.3.3) bestätigt. Heterozygote Tiere wurden miteinander verpaart mit dem Ziel homozygote knock-out Tiere zu erhalten.

3.2.5 Histologische Methoden

3.2.5.1 Perfusion von Mäusen

Mäuse wurden mit Hilfe der Ketamin-Rompun-Anästhesie Lösung anästhesiert (100 µl/10 g Körpergewicht), und transkardial 3 min mit 0.01% Heparin in PBS perfundiert, gefolgt von 4 min 1% oder 4% PFA in PBS.

3.2.5.2 Kryotomschnitte

Zur Herstellung von Kryotomschnitten für immunhistochemische Untersuchungen wurde das perfusionsfixierte Gewebe zunächst 30 min (DRGs) bzw. 1 h (Haut) mit 1% PFA nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C in 30%iger Sucroselösung inkubiert und daraufhin in TissueTek-O.C.T.-compound (Sakura) auf Trockeneis eingebettet. Für *in situ* Hybridisierungen wurde unperfundiertes Gewebe entnommen, und direkt in TissueTek-O.C.T.-compound (Sakura) auf Trockeneis eingebettet. Die Lagerung der Gewebe erfolgte bei -80°C. Mit Hilfe eines Kryotoms (Microm) wurden Gefrierschnitte gewünschter Dicke erstellt (IHC auf DRG und Gehirn: 8 µm; IHC auf Haut: 30 µm; *in situ* Hybridisierungen: 16 µm).

3.2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten

Mäuse wurden perfundiert (Kapitel 3.2.5.1) und Kryotomschnitte wurden angefertigt (Kapitel 3.2.5.2). Das Gewebe wurde zunächst für 2 h mit Immunhistochemie Blocklösung inkubiert. Anschließend wurde der in Immunhistochemie Antikörperlösung verdünnte Primärantikörper (Kapitel 3.1.7; Antikörperverdünnungen siehe Tabelle 9) auf die Gewebeschnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei jeweils 10 minütigen Waschschritten mit PBST wurden die Schnitte für 1 h mit Sekundärantikörper (Kapitel 3.1.7) und 1 µg/ml DAPI (Sigma) bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte erneut dreimal jeweils 10 min mit PBST gewaschen und mit Kaiser's Glycerol Gelatine (Merck) eingedeckelt.

3.2.5.4 *In situ* Hybridisierung auf Spinalganglien Schnitten

Etablierte Protokolle für *in situ* Hybridisierungen wurden für Anwendungen auf DRG modifiziert (Watakabe et al., 2007; Abe et al., 2009). Kryotomschnitte (Kapitel 3.2.5.2) wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 20 min mit 4% PFA in DEPC PBS fixiert. Das Gewebe wurde dreimal für jeweils 3 min mit eiskaltem PBS (DEPC) gewaschen, für 5 min in Acetylierungspuffer (33 mM Triethanolamin in DEPC H₂O) gegeben und anschließend für 10 min in 0.25% Essigsäureanhydrid in Acetylierungspuffer inkubiert. Nach Permeabilisierung in 0.3% Triton X-100 in PBS (DEPC) wurden die Schnitte erneut dreimal jeweils 5 min mit eiskaltem PBS (DEPC) gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei 61°C bis zu zwei Stunden mit *in situ* Hybridisierungslösung prähybridisiert. Im Anschluss wurden die in *in situ* Hybridisierungslösung verdünnten *in situ*

Sonden (0.4 ng/ μ l; sense und antisense) über Nacht bei 61°C auf den Schnitten inkubiert. Hierzu wurden die Schnitte durch mit DPX versiegelte Deckgläschen vor dem Austrocknen geschützt. Für Einfach *in situ* Hybridisierungen und *in situ* Hybridisierungen kombiniert mit immunhistochemischen Färbungen wurde lediglich die DIG-markierte Sonde hinzugegeben, während für Doppel *in situ* Hybridisierungen sowohl eine DIG- als auch eine FITC-markierte Sonde verwendet wurde.

Einfach *in situ* Hybridisierungen wurden nach der Entfernung der mit DPX fixierten Deckgläschen am nächsten Tag für 30 min bei Raumtemperatur mit 2x SSC Puffer gewaschen. Anschließend wurde für eine Stunde mit 2x SSC und eine Stunde mit 0.1x SSC jeweils bei 65°C gewaschen. Nach 5 minütiger Äquilibrierung in TN Puffer wurde in *in situ* Blocklösung I verdünnter AP-konjugierter anti-DIG Antikörper (Kapitel 3.1.7) für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert und im Anschluss daran viermal jeweils 5 min mit TN Puffer gewaschen und zweimal jeweils 10 min mit NTM Puffer äquilibriert. Das Signal der alkalischen Phosphatase wurde durch über Nacht Reaktion mit NBT/BCIP (Roche; 20 μ l NBT/BCIP Mix/ ml NTM Puffer) bei Raumtemperatur detektiert. Zur Verminderung der Hintergrundfärbung und um Tris Kristalle zu entfernen wurde zunächst 15 min mit H₂O und im Anschluss maximal 2 min mit Ethanol gewaschen. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und mit Kaiser's Glycerol Gelatine (Merck) eingedeckelt.

Doppel *in situ* Hybridisierungen wurden im Anschluss an die über Nacht Hybridisierung zweimal jeweils 20 min bei 60°C mit *in situ* Waschlösung I gewaschen. Nach kurzer Äquilibrierung in *in situ* RNase Puffer, wurde durch 15 minütige Inkubation bei 37°C mit RNaseA (Sigma; 20 μ g/ml; in *in situ* RNase Puffer verdünnt) nicht gebundene RNA Sonde entfernt. Daraufhin folgten zwei jeweils 20 minütige Waschschrte in *in situ* Waschlösung II, und zwei jeweils 20 minütige Waschschrte in *in situ* Waschlösung III, jeweils bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte kurz in MABT Puffer äquilibriert und eine Stunde bei Raumtemperatur mit *in situ* Blocklösung II geblockt. POD-konjugierter anti-FITC Antikörper (Kapitel 3.1.7) wurde in *in situ* Blocklösung II verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Nach sechs jeweils 5 minütigen Waschschrten mit MABT Puffer wurde das POD Signal mit dem TSA plus Biotin System (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben amplifiziert. Im Anschluss wurde fünf Mal jeweils 5 min mit PBST gewaschen, um daraufhin die an den FITC-Antikörper gekoppelte POD durch eine zweistündige Inkubation in 4% PFA und 30 minütige Inkubation in 3% H₂O₂ zu inaktivieren. Nach weiteren drei jeweils 5 minütigen Waschschrten in PBS und dem 10 minütigen Äquilibrieren in MABT wurden die

Schnitte für eine Stunde in *in situ* Blocklösung II geblockt. Im Anschluss wurde über Nacht bei 4°C mit POD-konjugiertem anti-DIG Antikörper (Kapitel 3.1.7) inkubiert (verdünnt in *in situ* Blocklösung II). Nach sechs jeweils 5 minütigen Waschschritten mit MABT Puffer wurde das POD Signal des DIG Antikörpers mit dem TSA plus Cyanine 3 System (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben detektiert. Anschließend wurde fünf Mal jeweils 5 min mit PBST gewaschen, 10 min in MABT äquilibriert und eine Stunde in *in situ* Blocklösung II inkubiert. Das an die POD des FITC Antikörper gekoppelte Biotin wurde mit Hilfe von Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate (1:1000; Life Technologies) detektiert (2 h bei Raumtemperatur). Zusätzlich wurde 1 µg/ml DAPI (Sigma) hinzugegeben. Im Anschluss an fünf weitere jeweils 5 minütige Waschschrritte in PBST und einen kurzen Waschschrtritt in PBS wurden die Objektträger mit Kaiser's Glycerol Gelatine (Merck) eingedeckelt.

Für Anwendungen bei denen parallel zur Detektion einer markierten *in situ* Sonde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden sollte, wurde nach der Hybridisierung der DIG markierten RNA Sonde zunächst wie bei Doppel *in situ* Hybridisierungen fortgefahren (siehe oben). Im Anschluss wurde allerdings zusätzlich zu dem POD-konjugierten anti-DIG Antikörper der gewünschte Primärantikörper in die *in situ* Blocklösung II hinzugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sechs jeweils 5 minütigen Waschschrritten in MABT wurde zunächst das POD Signal mit dem TSA plus Biotin System (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben amplifiziert. Nach fünf weiteren jeweils 5 minütigen Waschschrritten in PBST, dem 10 minütigen Äquilibrieren in MABT und dem einstündigen Blocken in *in situ* Blocklösung II, wurde Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate (1:1000; Life Technologies), entsprechender Sekundärantikörper (Kapitel 3.1.7) und 1 µg/ml DAPI (Sigma) in *in situ* Blocklösung II verdünnt hinzugegeben. Anschließend wurde fünf Mal jeweils 5 min mit PBST und einmal kurz mit PBS gewaschen, um daraufhin die Objektträger mit Kaiser's Glycerol Gelatine (Merck) einzudeckeln.

3.2.6 Elektrophysiologische Methoden

Die Methode der elektrophysiologischen Ableitung von Haut-Nerv Präparationen wurde im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Gary Lewin am MDC-Berlin erlernt und in unserer Arbeitsgruppe etabliert.

3.2.6.1 Präparation des Haut-Nerv Gewebe Präparats

Die Ableitung der Haut-Nerv Präparation erfolgte am Saphenus Nerv des Maus Hinterbeins (Abbildung 13). Dieser wurde gemeinsam mit der vom Saphenus Nerv innervierten Haut der durch Genickbruch getöteten Maus entnommen. Die Präparation erfolgte wie unter Abbildung 14 beschrieben. Die fertige Haut-Nerv Präparation wurde anschließend in die Ableitkammer überführt. Die Haut wurde mit der Coriumseite nach oben mit Hilfe von 0.2 mm dicken Insektennadeln (Fine Science Tools) auf der mit Sylgard 184 Silicone Elastomer (World Precision Instruments) beschichteten Kammer befestigt, und kontinuierlich mit 32°C warmem, mit O₂ begastem SIF Puffer umspült (~250 ml/h). Der Nerv wurde mit Hilfe eines während der Präparation befestigten Fadens durch ein Loch in eine zweite mit Mineralöl (Sigma) befüllte Kammer gezogen, und mit einer dünnen Schicht SIF Puffer überschichtet. Der mit dem Faden verbundene Nerv-Bereich wurde entfernt. Das Epineurium wurde mit feinen Pinzetten (World Precision Instruments) wenige Millimeter zurückgeschoben und einzelne Nervenfasern wurden separiert sowie an der Ableitelektrode platziert.

3.2.6.2 Charakterisierung von Nervenfasern durch Bestimmung der Leitungsgeschwindigkeit und des von Frey Haar Schwellenwerts

Mit Hilfe eines kleinen Glasstabes wurde das rezeptive Feld einzelner Fasern lokalisiert. Die Faser wurde anschließend durch Berechnung der Leitungsgeschwindigkeit und des von Frey Haar Schwellenwerts charakterisiert. Mit Hilfe der Zeit, die ein elektrischer Impuls für die Entfernung vom rezeptiven Feld zur Ableitelektrode benötigt, konnte die Leitungsgeschwindigkeit errechnet werden. Entsprechend der Leitungsgeschwindigkeit wurde zwischen A β - (> 10 m/s), A δ - (1 – 10 m/s) und C-Fasern (< 1 m/s) unterschieden (Koltzenburg et al., 1997; Zimmermann et al., 2009). Von Frey Filamente (Marstock Nervtest) wurden zur Messung der mechanischen Aktivierungsschwelle benutzt (von Frey, 1896). D-Haar-, RA- und SA-Fasern werden durch von Frey Haar Werte ≤ 1 mN charakterisiert, während AM- und C-Fasern Werte ≥ 6 mN aufweisen (Koltzenburg et al., 1997).

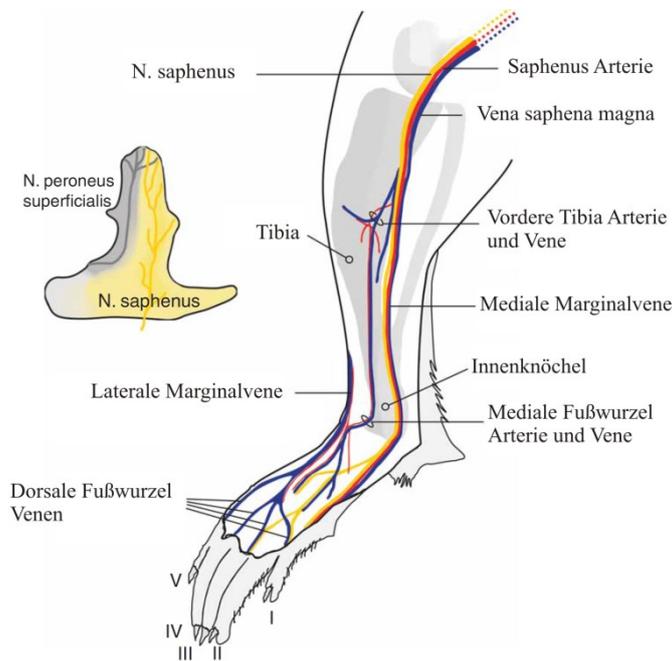
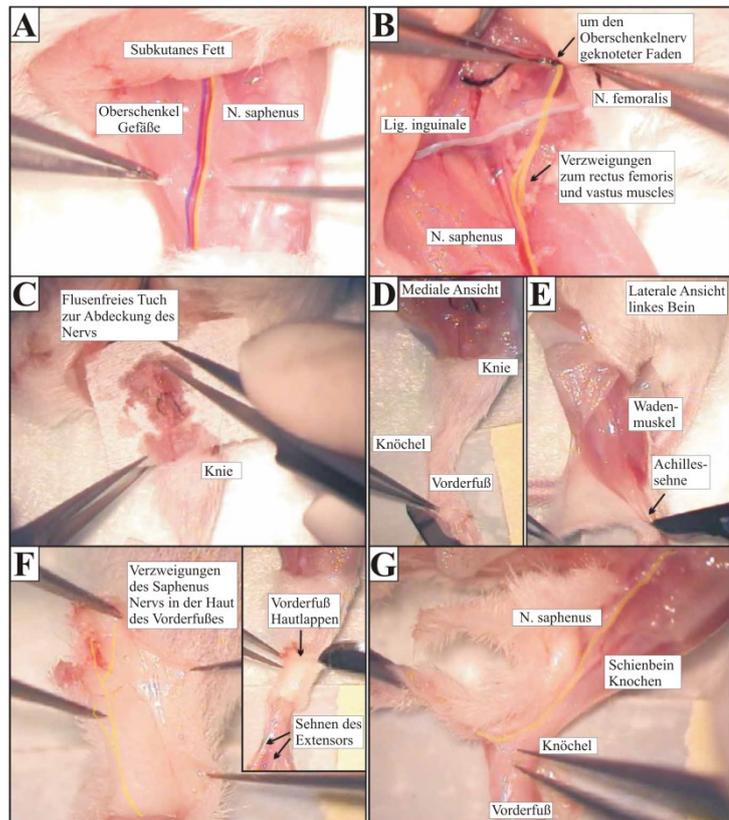


Abbildung 13 | Lokalisation des Saphenus Nervs innerhalb des Maus Hinterbeins

Der Saphenus Nerv (*Nervus saphenus*) ist ein terminaler sensorischer Zweig, der sich vom *Nervus femoralis* abspaltet und zusammen mit der Oberschenkelarterie an der Innenseite des Oberschenkels verläuft. Der Saphenus Nerv versorgt den medialen und dorsalen Bereich des Mausfußes. Farbschema: blau: venöse Blutgefäße; rot: arterielle Blutgefäße; gelb: *Nervus saphenus*; Einsatz: Skizze der Haut-Nerv Präparation des rechten Mausbeins mit der Innervationszone des Saphenus Nervs (gelb). (modifiziert nach Zimmermann et al., 2009)

Abbildung 14 | Präparation des Haut-Nerv Gewebepräparats für elektrophysiologische Haut-Nerv Ableitungen

(A) Der Saphenus Nerv verläuft gemeinsam mit den Blutgefäßen des Oberschenkels in der Mitte des Oberschenkels (rot: Arterie; blau: Vene; gelb: Nerv). Mit Hilfe scharfer Pinzetten und feiner Präparationsscheren wird das um den Nerv liegende Bindegewebe entfernt und der Nerv kann freigelegt werden. (B) Der Saphenus Nerv wird durchtrennt und ein Bindefaden wird am Nerv befestigt. (C) Der Nerv wird während der Präparation kontinuierlich mit SIF Puffer befeuchtet. (D) Mediale Ansicht des Beins. (E) Laterale Ansicht des Beins. (F) Verlauf des Saphenus Nervs (gelb) innerhalb des subkutanen Bindegewebes der Haut des Fußes. (G) Die mediale Ansicht des Beins verdeutlicht den weiteren Verlauf des Saphenus Nervs (gelb). Das Bindegewebe wird vorsichtig entfernt und die Haut-Nerv Präparation wird für elektrophysiologische Haut-Nerv Messungen in die entsprechende Ableitkammer überführt. (modifiziert nach Zimmermann et al., 2009)



3.2.6.3 Messung der Feueraktivität nach mechanischer und pharmakologischer Stimulation

Nach der Charakterisierung der Nervenfasern wurde mit Hilfe eines Nanomotors und eines daran befestigten kleinen Metallstifts mit einer Kontaktfläche von 0.8 mm^2 ein Protokoll mit standardisierten mechanischen Stimuli auf das rezeptive Feld der Haut appliziert. Die 2 oder 10 Sekunden dauernden mechanischen Stimuli unterschieden sich in der Amplitude oder der Stimulus Geschwindigkeit und wurden in einem Intervall von 30 Sekunden auf die Haut appliziert. Das Signal des Nanomotors und die elektrophysiologischen Rohdaten wurden durch das PowerLab 8/30 System und die entsprechende LabChart 7.3.5 Software (AD Instruments) aufgenommen.

3.2.7 Verhalten

3.2.7.1 Aesthesiometer Test

Der Aesthesiometer Test (Ugo Basile) wurde entsprechend Herstellerangaben verwendet. Ein mechanischer Stimulus wurde mit Hilfe eines elektronisch gesteuerten von Frey Haares auf die Unterseite der Mauspfote gerichtet. Die benötigte Kraft und Zeit bis zum Wegziehen der Pfote wurde gemessen. Von jedem Tier wurden insgesamt mindestens 18 Messungen an beiden Hinterpfoten an 3 verschiedenen Tagen erstellt (Triplikate pro Pfote und Tag).

3.2.7.2 Hargreaves Test

Der Hargreaves Test (Ugo Basile) wurde entsprechend Herstellerangaben verwendet. Ein Laserlicht wurde hierzu mit Hilfe eines Spiegels unter der Hinterpfote einer Maus platziert, und die Zeit bis zum Wegziehen der Pfote gemessen. Von jedem Tier wurden mindestens 24 Messungen an beiden Hinterpfoten an 4 verschiedenen Tagen erstellt (Triplikate pro Pfote und Tag).

3.2.8 Statistik

Datenpunkte der vorliegenden Studie repräsentieren durchgehend die Mittelwerte mit entsprechenden Standardfehlern (engl. standard error of the mean, SEM). Statistische Tests wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5.0 Software erstellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 KCNQ2 und KCNQ3 Expression in D-Haar A δ -Fasern

4.1.1 KCNQ2 und KCNQ3 Expression in einer Unterpopulation bestimmter Spinalganglien Neurone

Die Expression von KCNQ2 – 5 in DRG Zellen konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Passmore et al., 2003; Heidenreich et al., 2011). Zusätzlich lassen pharmakologische Messungen in elektrophysiologischen Haut-Nerv Präparationen vermuten, dass in einer bestimmten DRG Unterpopulation, den sogenannten D-Haar Fasern KCNQ Kanäle exprimiert werden (Heidenreich et al., 2011). Um Rückschlüsse auf die KCNQ Untereinheit in D-Haar Fasern ziehen zu können, wurden in dieser Arbeit DRG Schnitte für die dort exprimierten neuronalen KCNQ Kanäle angefärbt und auf Ko-Lokalisation mit dem in DRG spezifischen D-Haar Marker TrkB (Stucky et al., 1998, 2002) überprüft. In DRG Zellkörpern konnten immunhistochemische Färbungen für KCNQ2 und -3 allerdings keine durch Antikörper nachweisbare Färbung aufzeigen. Stattdessen befinden sich KCNQ2 und -3 an AIS und Ranvierschen Schnürringen (Devaux et al., 2004; Rasmussen et al., 2007) (siehe hierzu auch Abbildung 21).

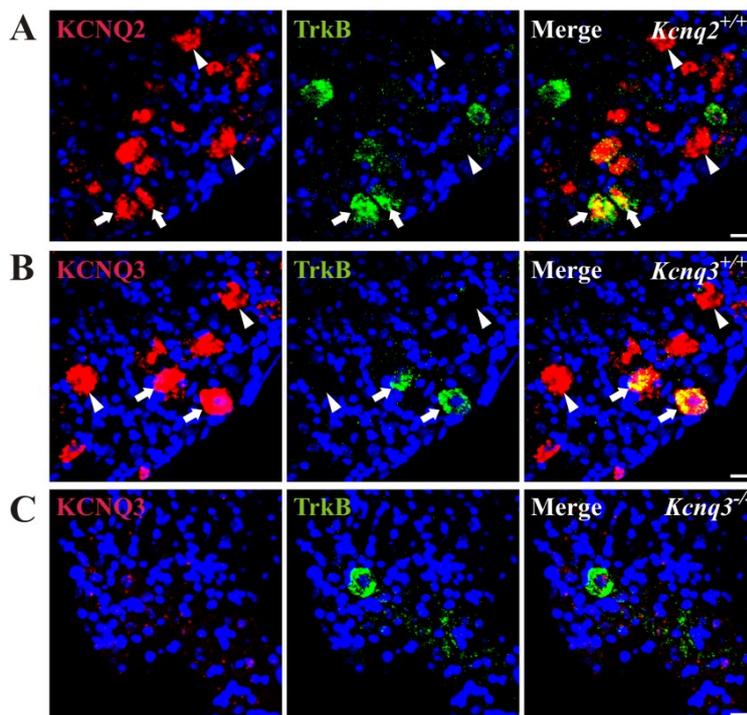


Abbildung 15 | Durch Doppel *in situ* Hybridisierung gezeigte Expression von KCNQ2 und -3 in TrkB positiven DRG Zellen

DRG Schnitte adulter WT (A,B) und *Kcnq3*^{-/-} (C) Mäuse wurden mit *in situ* Sonden für KCNQ2 (A) und KCNQ3 (B,C) markiert und mit TrkB *in situ* Sonde ko-gefärbt. (A) 29.5 ± 5.4% der KCNQ2-exprimierenden Zellen sind positiv für TrkB (Pfeile, n = 102). (B) Auch KCNQ3 ko-lokalisiert teilweise mit TrkB (Pfeile, 44.3 ± 9.4%, n = 190). (C) KCNQ3 *in situ* Färbung fehlt in Kontroll *Kcnq3*^{-/-} Gewebe. Pfeilspitzen markieren Zellen, die nicht mit TrkB ko-lokalisieren. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 µm.

Auch für KCNQ5 war eine Antikörper-basierte Untersuchung nicht möglich, da die mir zur Verfügung stehenden KCNQ5 Antikörper in entsprechenden KO DRG Schnitten eine unspezifische Färbung ergaben (siehe hierzu auch Kapitel 4.2.1 und Abbildung 29). Aus diesem Grund wurden für alle untersuchten KCNQ Kanäle *in situ* Sonden hergestellt, und jeweils zusammen mit der *in situ* Sonde für TrkB auf DRG Schnitten hybridisiert (Abbildung 15 & Abbildung 16). Sowohl KCNQ2 als auch -3 konnten in TrkB-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 15A,B). Die Spezifität der KCNQ3 *in situ* Markierung wurde mit Hilfe des entsprechenden KO Gewebes bestätigt (Abbildung 15C). Aufgrund der Letalität homozygoter KCNQ2 KO Tiere durch Atelektase (Watanabe et al., 2000) war eine entsprechende knock-out kontrollierte KCNQ2 *in situ* Hybridisierung nicht möglich. Weitere Doppel *in situ* Hybridisierungen zeigten keine Ko-Lokalisation von KCNQ4 und -5 mit dem D-Haar Marker TrkB (Abbildung 16A,C). Kontrollgewebe von *Kcnq4*^{-/-} und *Kcnq5*^{-/-} Mäusen war negativ für KCNQ4 bzw. KCNQ5 (Abbildung 16B,D).

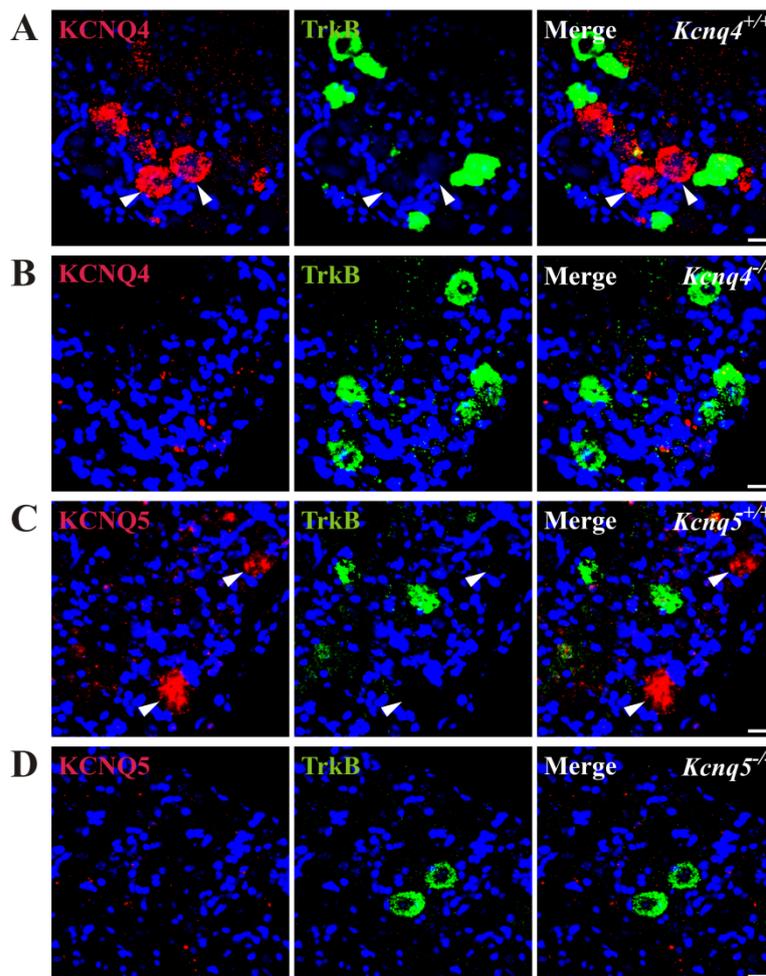


Abbildung 16 | Keine detektierbare Expression von KCNQ4 und -5 in TrkB-positiven DRG Zellen
 DRG Schnitte adulter WT (A,C), *Kcnq4*^{-/-} (B) und *Kcnq5*^{-/-} (D) Mäuse wurden mit *in situ* Sonden für KCNQ4 (A,B) und KCNQ5 (C,D) markiert und mit TrkB *in situ* Sonde ko-gefärbt. Sowohl KCNQ4 (A) (n = 89), als auch KCNQ5 (C) (n = 71) befinden sich nicht in TrkB-exprimierenden Spinalganglien Zellen (Pfeilspitzen). Das Signal der KCNQ4 (B) und KCNQ5 (D) *in situ* Sonden fehlt in entsprechendem *Kcnq4*^{-/-} und *Kcnq5*^{-/-} Kontrollgewebe. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 µm.

Die Lokalisation von KCNQ3 und KCNQ5 zusammen mit TrkB wurde mit Hilfe einer weiteren Methode untersucht, in der sowohl mit *in situ* Sonde für KCNQ3 bzw. KCNQ5 sowie mit TrkB Antikörper gefärbt wurde (Abbildung 17). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorherigen Versuche (Abbildung 15B,C und Abbildung 16C,D) zeigten auch diese Experimente die Ko-Lokalisation von KCNQ3 und TrkB, wohingegen KCNQ5 auch hier nicht in TrkB-exprimierenden Neuronen nachgewiesen werden konnte.

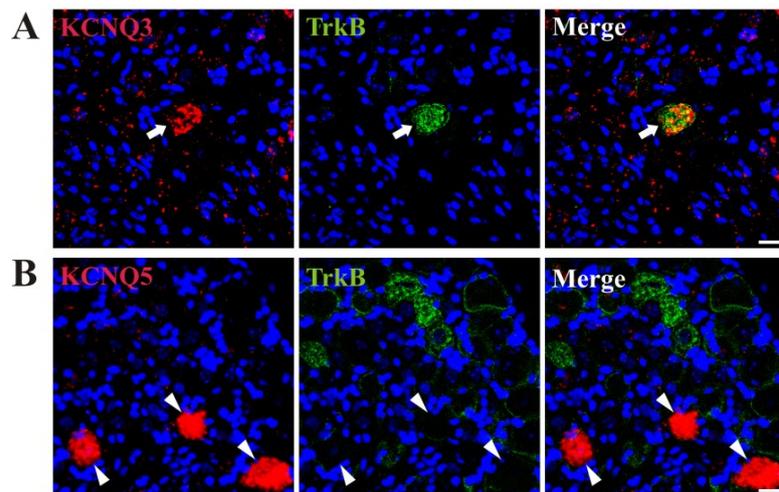


Abbildung 17 | Expression von KCNQ3 aber nicht KCNQ5 in TrkB positiven DRG Zellen
 DRG Schnitte von WT Mäusen wurden mit *in situ* Sonden für KCNQ3 (A) und KCNQ5 (B) markiert, und jeweils mit TrkB Antikörper ko-gefärbt. (A) $45.6 \pm 1.4\%$ der KCNQ3-exprimierenden Neuronen sind positiv für TrkB (Pfeil, $n = 83$). (B) KCNQ5 befindet sich dagegen nicht in TrkB-exprimierenden Zellen (Pfeilspitzen, $n = 65$). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 μm .

KCNQ4 stellt die einzige neuronale KCNQ Untereinheit dar, für die die mir zur Verfügung stehenden Antikörper in DRG Zellkörpern eine spezifische Färbung ergaben. In Ergänzung der KCNQ4 / TrkB Doppel *in situ* Hybridisierung aus Abbildung 16 wurden DRG Schnitte daher mit KCNQ4 und TrkB Antikörper ko-gefärbt (Abbildung 18). Diese Methode bestätigt die Expression von KCNQ4 in TrkB-negativen DRG Neuronen.

Ein weiterer Marker für D-Haar Neurone stellt der spannungsaktivierte Calciumkanal $\text{Ca}_v3.2$ dar (Shin et al., 2003; Wang and Lewin, 2011). Doppel *in situ* Hybridisierungen konnten eine Ko-Lokalisation dieses Markers mit KCNQ3 zeigen (Abbildung 19). Dies bestätigt die bereits in Abbildung 15B und Abbildung 17A gezeigte Expression von KCNQ3 in (mit TrkB-markierten) D-Haar Neuronen.

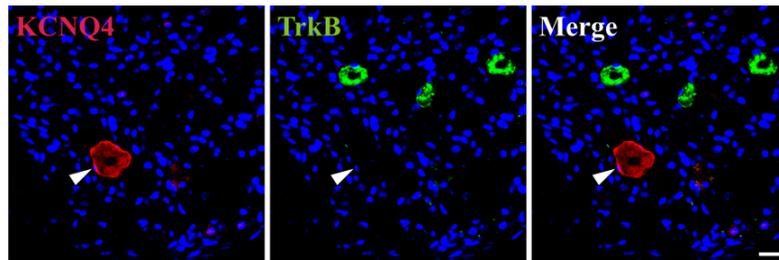


Abbildung 18 | Immunhistochemischer Nachweis der Expression von KCNQ4 in TrkB-negativen DRG Neuronen

DRG Schnitte von WT Mäusen wurden mit KCNQ4 und TrkB Antikörpern ko-gefärbt. Es konnte keine Ko-Lokalisation zwischen diesen beiden Proteinen festgestellt werden (Pfeilspitze, n = 73). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 μm .

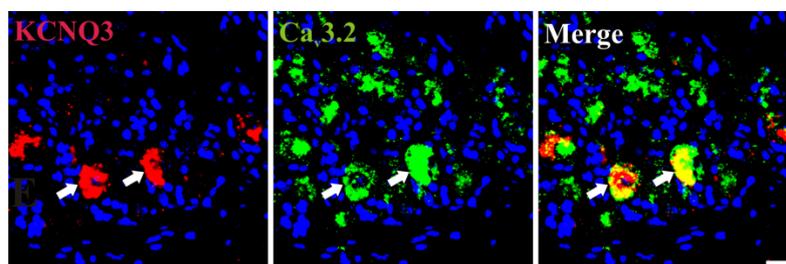


Abbildung 19 | Expression von KCNQ3 in Ca_v3.2-positiven DRG Zellen

Doppel *in situ* Hybridisierungen für KCNQ3 und Ca_v3.2 zeigen die Ko-Lokalisation von $48,1 \pm 8\%$ der KCNQ3-positiven Zellen mit Ca_v3.2 (Pfeile, n = 71). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 μm .

Die quantitative Analyse der KCNQ3 Expression in DRG Zellen zeigte mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen eine Färbung in $9,3 \pm 1,3\%$ aller DRG Neurone (Abbildung 20). Kontrollen, wie die Verwendung der spezifischen antisense Sonde auf *Kcnq3*^{-/-} Schnitten sowie der entsprechenden sense Sonde auf WT Schnitten zeigten keine spezifische KCNQ3 Färbung (Abbildung 20B,C). Mit einem Wert von $568,8 \pm 21,1 \mu\text{m}^2$ ergab die Quantifizierung der Größe der KCNQ3-positiven DRG Neurone die durchschnittliche Expression von KCNQ3 in mittelgroßen Zellen (Abbildung 20D).

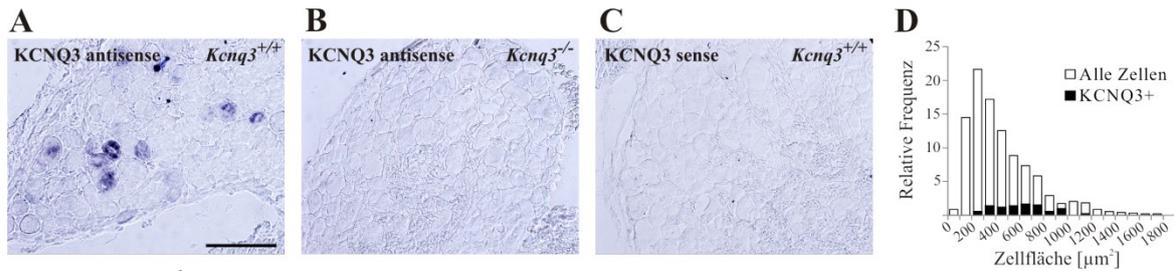


Abbildung 20 | KCNQ3 Expression in mittelgroßen DRG Neuronen

In situ Hybridisierung auf WT (A,C) und *Kcnq3*^{-/-} (B) DRG Schnitten mit antisense *in situ* Sonde für KCNQ3 (A,B), sowie mit Kontroll-sense *in situ* Sonde für KCNQ3 (C). (A) Die antisense KCNQ3 Sonde markiert $9.3 \pm 1.3\%$ der DRG Neurone ($n = 924$). (B,C) Beide Negativ-Kontrollen weisen keine spezifische KCNQ3 Färbung auf. (D) Die Quantifizierung der Expressionsverteilung zeigt KCNQ3 Lokalisation größtenteils in mittelgroßen DRG Neuronen ($568.8 \pm 21.1 \mu\text{m}^2$, $n = 84$). Maßstab: 100 μm .

In Einklang mit der in Abbildung 20 gezeigten Lokalisation von KCNQ3 in mittelgroßen DRG Zellen konnten immunhistochemische Untersuchungen die gemeinsame Expression von KCNQ2 und -3 größtenteils in myelinisierten Neuronen zeigen (Abbildung 21). In Übereinstimmung mit früheren Publikationen (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006) ließen sich in DRG sowohl KCNQ2 als auch -3 in mit Ankyrin G-markierten Ranvierschen Schnürringen lokalisieren (Abbildung 21A). In Schnitten von *Kcnq3*^{-/-} Mäusen fehlte die KCNQ3 Färbung, während das KCNQ2 Expressionsmuster dagegen unbeeinflusst blieb (Abbildung 21B). Zusätzlich zur gemeinsamen Lokalisation von KCNQ2 und -3 in Ranvierschen Schnürringen konnten Doppel *in situ* Hybridisierungen auch das große Ausmaß der gemeinsamen Lokalisation auf DRG Zellkörper Ebene bestätigen (Abbildung 21C). Die Ko-Lokalisation von mit KCNQ3 *in situ* Sonde markierten DRG Zellen mit NF200 Antikörper bekräftigte ferner die Expression von KCNQ3 in myelinisierten DRG Neuronen (Abbildung 21D).

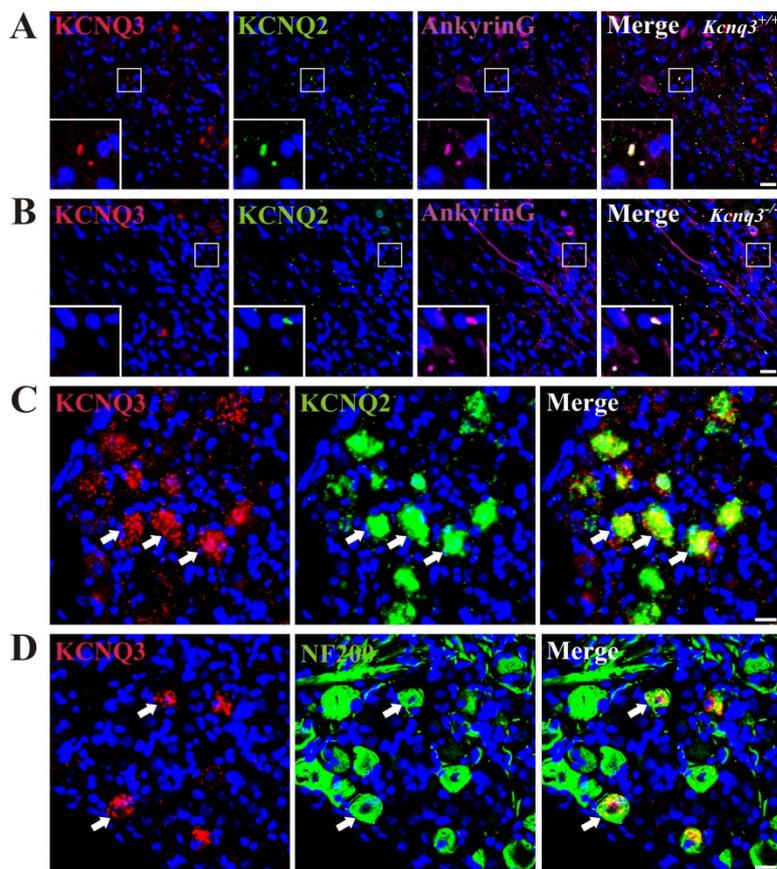


Abbildung 21 | Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 in myelinisierten DRG Neuronen (A,B) Dreifach Antikörper Färbung in DRG Schnitten von WT (A) und *Kcnq3*^{-/-} (B) Mäusen für KCNQ2, -3 und AnkyrinG, einem spezifischen Marker für Ranviersche Schnürringe. (A) 83.1 ± 2.66% der KCNQ2-positiven Schnürringe zeigen auch ein Signal für KCNQ3 (n = 848). (B) Die KCNQ3 Färbung fehlt in Kontroll-Schnitten von *Kcnq3*^{-/-} Mäusen (n = 588). Einsätze, jeweils vergrößerte Ansicht der kenntlich gemachten Fläche (weiße Box). (C) Doppel *in situ* Hybridisierungen zeigen Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 (Pfeile). 65.5 ± 5.2% der KCNQ2-exprimierenden Neuronen sind positiv für KCNQ3 (n = 107), 78.9 ± 9.6% der KCNQ3-exprimierenden Neuronen positiv für KCNQ2 (n = 89). (D) *In situ* Hybridisierung für KCNQ3 zeigt 96.9 ± 3.1%-ige Ko-Lokalisation mit NF200 Antikörper markierten Neuronen (n = 117). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 µm.

4.1.2 KCNQ3 Lokalisation in lanzettförmigen Aδ-Nervenendigungen um Haarfollikel

Axone pseudounipolarer DRG Zellen projizieren zum einen in das Rückenmark und zum anderen in die Peripherie, wie z.B. die Haut, wo unterschiedliche kutane mechanosensorische Endorgane innerviert werden. Zur Identifizierung der peripheren Lokalisation der in DRG Zellkörpern befindlichen KCNQ2 und -3 erfolgte die immunhistochemische Untersuchung von Gewebeschnitten der Haut mit KCNQ2 und -3 Antikörpern. Dies zeigte die Lokalisation von KCNQ3 in longitudinalen lanzettförmigen Nervenendigungen um Haarfollikel (Abbildung 22). Kürzlich wurde berichtet, dass unterschiedliche Populationen von longitudinalen lanzettförmigen Nervenendigungen existieren, die entweder den Aβ-, Aδ- oder C-Fasern zugeordnet werden können (Li et al., 2011). Jede dieser peripheren lanzettförmigen Nervenendigungen innerviert eine bestimmte Kombination unterschiedlicher Haare, und kann durch ein ihnen charakteristisches Muster an neurochemischen Markern unterschieden werden (Li et al., 2011; Wende et al., 2012): Aβ-Fasern: S100⁺/NF200⁺/CB⁺/TrkB^{niedrig}, Aδ-Fasern:

S100⁺/NF200⁻/CB⁻/TrkB^{hoch} und C-Fasern: S100⁺/NF200⁻/CB⁻/TrkB⁻. Die Untersuchung der KCNQ3-positiven Nervenendigungen ergab eine Ko-Lokalisation mit TrkB (Abbildung 22A,B). Dies steht in Einklang mit der in Abbildung 15 und Abbildung 17 gezeigten Expression von KCNQ3 in TrkB-positiven DRG Zellen. Zur weiteren Analyse wurden Gewebeschnitte der Haut für KCNQ3 und NF200 ko-gefärbt. Es konnte keine Ko-Lokalisation festgestellt werden zwischen den NF200-exprimierenden zirkulären Nervenendigungen und den KCNQ3-positiven lanzettförmigen Nervenendigungen um Haarfollikel behaarter Haut (Abbildung 22C,D). Entsprechend oben aufgeführter Eigenschaften peripherer Nervenendigungen lokalisiert KCNQ3 demnach in D-Haar A δ -Fasern. Die immunhistochemische Untersuchung von KCNQ2 an Gewebe-Hautschnitten ergab keine spezifische Färbung.

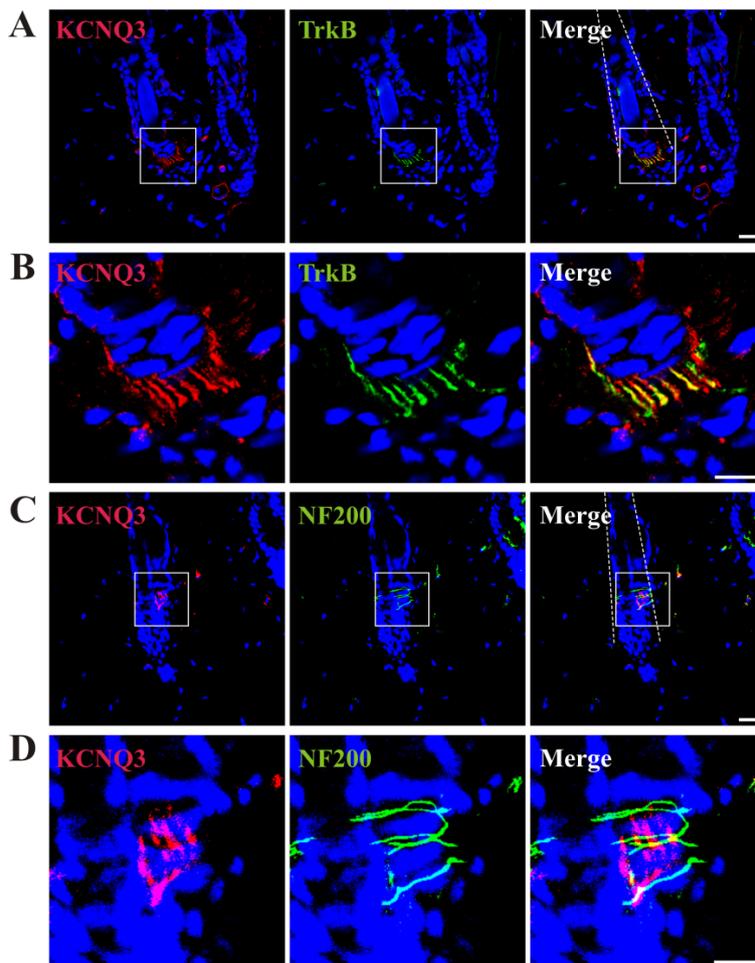


Abbildung 22 | Lokalisation von KCNQ3 in lanzettförmigen Nervenendigungen um Haarfollikel behaarter Haut

Maus Hautschnitte wurden gefärbt mit Antikörpern für KCNQ3 und TrkB (A,B), sowie für KCNQ3 und NF200 (C,D). (A) KCNQ3 ko-lokalisiert mit TrkB in lanzettförmigen Nervenendigungen um Haarfollikel. (B) Vergrößerte Ansicht der weißen Box in (A). (C) KCNQ3 befindet sich nicht in NF200-positiven Nervenendigungen. (D) Vergrößerte Ansicht der weißen Box in (C). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Die gestrichelten Linien deuten den Haarschaft an. Maßstab: 20 μ m (A,C) und 10 μ m (B,D).

4.1.3 Elektrophysiologische Untersuchungen an D-Haar Fasern von *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Mäusen

Um elektrophysiologische Eigenschaften von sensorischen Fasern der Haut in verschiedenen KCNQ Mausmodellen zu studieren, wurde die *in vitro* Haut-Nerv Präparation des Saphenus Nervs (Reeh, 1986; Airaksinen et al., 1996; Koltzenburg and Lewin, 1997; Koltzenburg et al., 1997) erlernt, in unserer Arbeitsgruppe aufgebaut, und etabliert. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich das Feuerverhalten einzelner Neurofilamente als Reaktion auf mechanische Stimulation des entsprechenden rezeptiven Feldes mittels eines piezogesteuerten Nanomotors messen.

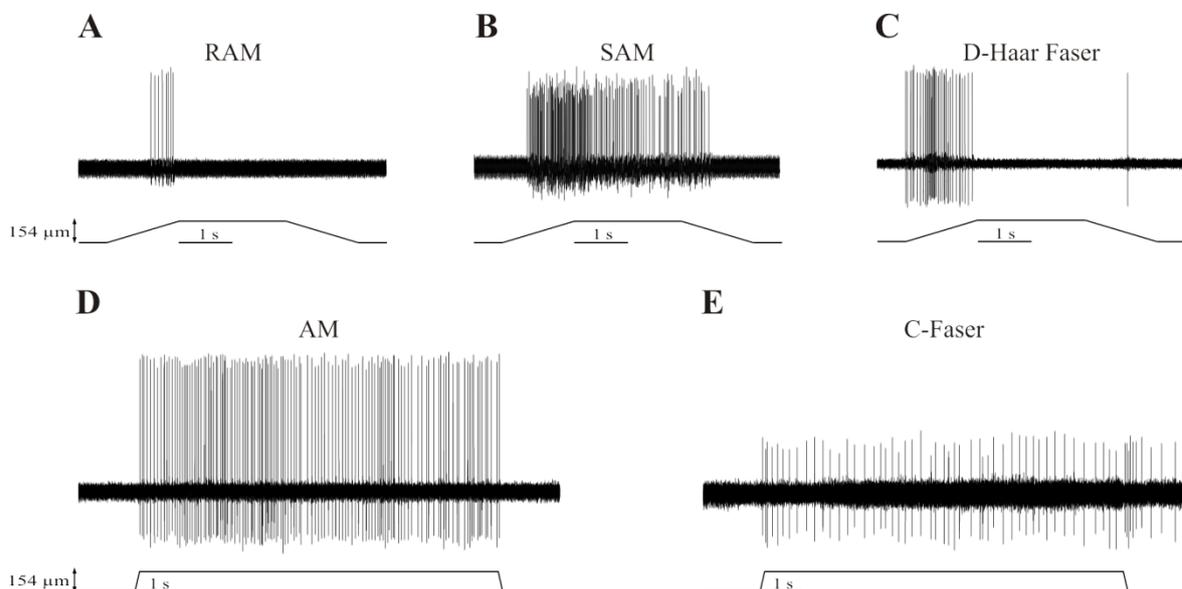


Abbildung 23 | Typisches Feuerverhalten verschiedener Tast- und Schmerzfasern des Saphenus Nervs als Reaktion auf mechanische Stimulation des rezeptiven Feldes der Haut

Mechanorezeptoren können aufgrund ihrer Sensitivität in zwei große Gruppen aufgeteilt werden: Die als Tastrezeptoren fungierenden niedrig-schweligen Mechanorezeptoren (A-C) reagieren auf Bewegungsreize der Haut, und lassen sich in der Haut-Nerv Präparation durch von Frey Haar Schwellenwerte von ≤ 1 mN charakterisieren. Die hoch-schwelligeren nozizeptiven Fasern (D,E) feuern dagegen während der statischen Phase des mechanischen Stimulus. Sowohl die schnell-adaptierenden Fasern (RAMs), die lediglich während der Bewegungsphase des Stimulus feuern (A), als auch die langsam-adaptierenden Fasern (SAMs), die zusätzlich auch während der statischen Phase des mechanischen Stimulus reagieren (B), stellen A β -Fasern dar. In der Haut-Nerv Präparation werden sie anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit von > 10 m s⁻¹ charakterisiert, und können dadurch von A δ -Fasern (C,D) abgegrenzt werden, die Leitungsgeschwindigkeiten zwischen 1 und 10 m s⁻¹ aufweisen. A δ D-Haar Fasern (C) feuern lediglich während des Bewegungsreizes, während A δ AM-Fasern (D) auf den statischen Haltestimulus reagieren. Hiervon abzugrenzen sind C-Fasern (E), die wie AM-Fasern zu den Schmerzfasern zu zählen sind, sich jedoch aufgrund der Leitungsgeschwindigkeiten von < 1 m s⁻¹ von diesen unterscheiden lassen.

Die unterschiedlichen Fasertypen können anhand verschiedener Kriterien voneinander unterschieden werden. Hierzu zählen die Leitungsgeschwindigkeit, der durch von Frey Haare gemessene mechanische Aktivierungsschwellenwert (für Einzelheiten siehe Material & Methoden Kapitel 3.2.6.2) und das charakteristische Feuerverhalten. Vor Beginn der Untersuchung der Bedeutung von KCNQ Kanälen für das Tast- und Schmerzempfinden anhand der Haut-Nerv Präparation wurden in WT Tieren Kontrollableitungen aller verschiedener Fasertypen als Reaktion auf mechanische Stimulation des rezeptiven Feldes erstellt (Abbildung 23). Diese Messungen zeigen das charakteristische Feuerverhalten von RAMs, SAMs, D-Haar Fasern, AMs und C-Fasern. Der mechanische Stimulus lässt sich unterscheiden in die bewegliche Phase während der Rampe und die statische Phase während des Haltestimulus. Jeder Fasertyp weist hierbei ein für sich charakteristisches Feuerverhalten während dieser beiden Phasen auf, welches in Abbildung 23 eingehender beschrieben wird.

Die beiden vorausgegangen Kapitel lassen die Expression von KCNQ2 und -3 in D-Haar Fasern vermuten. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der elektrophysiologischen Haut-Nerv Präparation die Wirkung von KCNQ2 und -3 für das D-Haar vermittelte Tastverhalten untersucht. D-Haar Fasern gehören neben RAMs und SAMs zu den niedrig-schwelligen Mechanorezeptoren (Koltzenburg et al., 1997). In elektrophysiologischen *in vitro* Haut-Nerv Präparationen lassen sie sich von diesen in erster Linie durch ihre A δ -Faser typische Leitungsgeschwindigkeit zwischen 1 und 10 m s⁻¹ unterscheiden. Des Weiteren werden D-Haar Fasern dadurch gekennzeichnet, dass sie sehr große und sensible rezeptive Felder besitzen, mit von Frey Haar Schwellenwerten weit unter dem des in diesen Untersuchungen benutzten schwächsten von Frey Haar Filaments (0.35 mN). Das Feuerverhalten dieser Fasern wird aufgrund der Sensitivität auf Bewegungsreize vor allem durch vermehrtes Feuern während der Rampenphasen gekennzeichnet (Abbildung 23). Für die hier durchgeführten Haut-Nerv Ableitungen wurde aus diesem Grund die Feuerfrequenz während der ersten Rampenphase gemessen und zwischen den verschiedenen Mausmodellen verglichen. Hierzu wurden mittels eines piezo-gesteuerten Nanomotors standardisierte mechanische Reize auf das rezeptive Feld der Faser appliziert. Durch die Verwendung mechanischer Stimuli mit konstanter Amplitude (154 μ m) aber unterschiedlichen Rampengeschwindigkeiten lässt sich das geschwindigkeitsabhängige Feuerverhalten von D-Haar Fasern darstellen. Es zeigte sich, dass insbesondere bei langsameren Rampengeschwindigkeiten D-Haar Fasern von *Kcnq3*^{-/-} Mäusen eine signifikant höhere Feuerfrequenz aufweisen als Kontrolltiere (Abbildung 24A,B). Aufgrund der größtenteils gemeinsamen Lokalisation von KCNQ2 und -3 in DRG (siehe

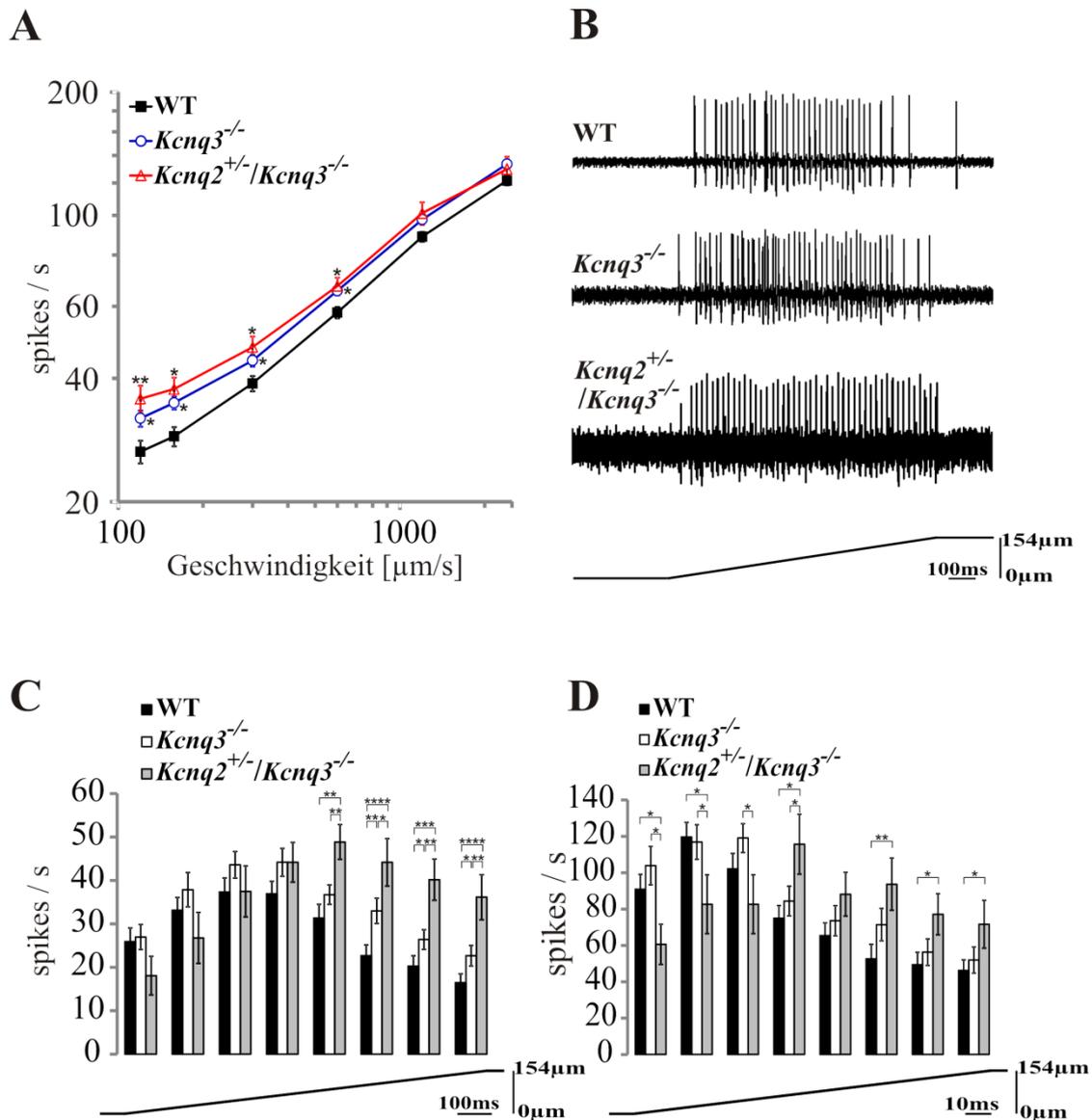


Abbildung 24 | Erhöhte Mechanosensitivität von D-Haar Fasern in $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ Mäusen

D-Haar Feuerverhalten von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ Mäusen, gemessen mit Hilfe der Saphenus Haut-Nerv Präparation. D-Haar Fasern wurden durch mechanische Stimuli mit konstanter Amplitude (154 μm) und zunehmender Rampen Geschwindigkeit (120 – 2400 $\mu\text{m s}^{-1}$) auf dem rezeptiven Feld der Haut aktiviert. Das D-Haar Faser Feuerverhalten wurde während des Bewegungsreizes der mechanischen Stimulation gemessen. **(A)** Fasern von $Kcnq3^{-/-}$ (29 Fasern) und $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ Mäusen (12 Fasern) weisen eine erhöhte Feuerfrequenz im Vergleich zu WT Tieren (40 Fasern) auf. **(B)** Exemplarisches Feuerverhalten von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ D-Haar Fasern als Reaktion auf mechanische Stimulation mit einer Rampengeschwindigkeit von 158 $\mu\text{m s}^{-1}$ und einer Amplitude von 154 μm . **(C,D)** Detaillierte Analyse des Rampen Feuerverhaltens von D-Haar Fasern von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ Mäusen bei Geschwindigkeiten von 158 $\mu\text{m s}^{-1}$ **(C)** und 1163 $\mu\text{m s}^{-1}$ **(D)** (WT(158 $\mu\text{m s}^{-1}$): 40 Fasern; WT(1163 $\mu\text{m s}^{-1}$): 38 Fasern; $Kcnq3^{-/-}$ (158 $\mu\text{m s}^{-1}$): 29 Fasern; $Kcnq3^{-/-}$ (1163 $\mu\text{m s}^{-1}$): 29 Fasern; $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ (158 $\mu\text{m s}^{-1}$): 12 Fasern; $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ (1163 $\mu\text{m s}^{-1}$): 11 Fasern). Die Rampe wurde in acht Intervalle aufgeteilt (Intervallgröße 124.5 ms für **(C)** und 16.5 ms für **(D)**), und für jedes Intervall wurde jeweils die Feuerfrequenz bestimmt. Die erhöhte Feuerfrequenz von $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}$ Mäusen beruht größtenteils auf verstärktem Feuern während des Endes der Rampe im Vergleich zu WT Tieren. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$; Student's T-Test; Fehlerbalken, s.e.m.)

Abbildung 21A,C) und der Ko-Lokalisation sowohl von KCNQ2 als auch -3 mit D-Haar Faser Markern (siehe hierzu Abbildung 15, Abbildung 17A, Abbildung 19 & Abbildung 22A,B) kann die gemeinsame Expression von KCNQ2 und -3 in diesen Neuronen vermutet werden. Da homozygote KCNQ2 KO Mäuse kurz nach der Geburt durch Atelektase sterben (Watanabe et al., 2000), war es nicht möglich entsprechende Messungen für diese Tiere zu erhalten. Heterozygote *Kcnq2*^{+/-} Mäuse sind lebensfähig und weisen verringerte KCNQ2 Proteinmengen auf (Watanabe et al., 2000), sodass entsprechende Tiere mit Mäusen der KCNQ3 Linie verpaart werden konnten, um *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Doppel KO Mäuse zu erhalten. Die Untersuchung von *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Doppel KO Mäusen sollte demnach die Frage klären, ob die zusätzliche Verringerung der KCNQ Proteinmengen in diesem Mausmodell den D-Haar Phänotyp der *Kcnq3*^{-/-} Mäuse in Haut-Nerv Ableitungen weiter vergrößern kann. Entsprechende Messungen konnten allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Doppel KO Mäusen feststellen (Abbildung 24A).

Dem in Abbildung 24A gezeigten Unterschied zwischen dem geschwindigkeitsabhängigen Feuerverhalten von WT Fasern auf der einen und *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Fasern auf der anderen Seite lag größtenteils ein unterschiedliches Feuerverhalten während des Endes der Rampe zugrunde (Abbildung 24C,D). WT Fasern erreichten ihre maximale Feuerfrequenz zu Beginn der Rampe. Bei langsamen Rampen (158 $\mu\text{m s}^{-1}$) lag dies nach ungefähr 375 ms (Abbildung 24C), bei schnellen Rampen (1163 $\mu\text{m s}^{-1}$) nach ungefähr 35 ms (Abbildung 24D). Zu Beginn der Rampe wiesen D-Haar Fasern von *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Mäusen allerdings ein ähnliches Feuerverhalten wie WT Fasern auf. Im weiteren Verlauf verblieb die Feuerfrequenz im Vergleich zu WT Fasern dann aber erhöht. Dies bedeutet, dass die Ursache für die generell erhöhte Feuerfrequenz von *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Fasern größtenteils in vermehrtem Feuern gegen Ende der Rampe zu suchen ist.

Zur Untersuchung der spezifischen Faser Sensitivität als Reaktion auf mechanische Stimulation wurde die Kraft berechnet, die geschwindigkeitsabhängig benötigt wird, um das erste Aktionspotential auszulösen. Es konnte kein Unterschied in der mechanischen Latenz von *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} im Vergleich zu WT Fasern festgestellt werden (Abbildung 25). Aufgrund der bereits generell ausgesprochen hohen Sensitivität von D-Haar Fasern ist eine weitere Erhöhung der Sensitivität dieser Fasern praktisch nicht messbar. Auch der Vergleich der Leitungsgeschwindigkeiten der gemessenen D-Haar Fasern ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Fasern (Abbildung 26).

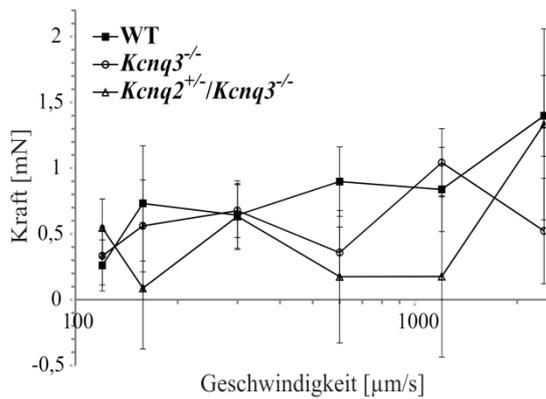


Abbildung 25 | Geschwindigkeitsabhängige mechanische Latenz von WT D-Haar Fasern im Vergleich zu *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-}
 Die geschwindigkeitsabhängige Kraft für das erste Aktionspotential als Reaktion auf mechanische Stimulation wurde gemessen, und zwischen WT (31 Fasern), *Kcnq3*^{-/-} (26 Fasern) und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} (12 Fasern) Mäusen verglichen. Es kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P > 0.05$; Student's T-Test; Fehlerbalken, s.e.m.).

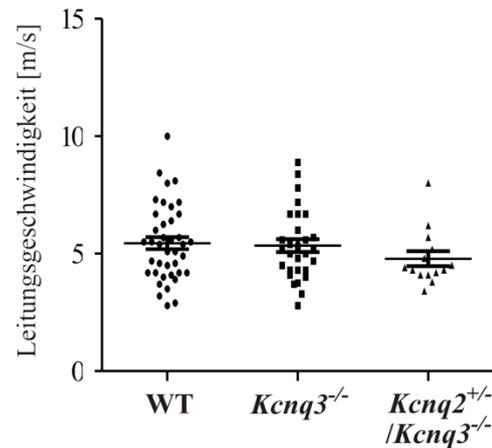


Abbildung 26 | Unveränderte Leitungsgeschwindigkeit von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} D-Haar Fasern
 Mit Hilfe elektrischer Stimulation des rezeptiven Feldes wurde die Leitungsgeschwindigkeit von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} D-Haar Fasern gemessen und verglichen. Es besteht kein signifikanter Unterschied ($P > 0.05$; One-way ANOVA).

4.2 KCNQ5

4.2.1 Generierung des KCNQ5 KO Mausmodells

Aufgrund der Tatsache, dass die immunhistochemische Untersuchung der KCNQ5 Expression in DRG Gewebeschnitten nicht die gewünschte eindeutig spezifische Färbung ergab, wurde als Gold-Standard der Negativ-Kontrolle das entsprechende KO Mausmodell generiert. Der KCNQ5 KO Vektor basiert auf dem Konstrukt zur Herstellung des KCNQ5 DN Mausmodells, das von T. Kharkovets (ZMNH Hamburg) und H. J. Jensen (The Panum Institute, Universität Kopenhagen) kloniert wurde und in Tzingounis et al., 2010 beschrieben ist. Anstatt der dominant negativen Mutation G278S enthält der KCNQ5 KO Vektor an dieser Stelle zwei Stopcodons in Exon 6 (TAA TGA) (Abbildung 27), die zum Abbruch der Protein-Biosynthese führen. Die beiden Stopcodons wurden durch einen ehemaligen Mitarbeiter, Vitya Vardanyan, mittels rekombinanter PCR mit Hilfe der Schnittstellen *AleI* und *AflIII* in den Vektor eingefügt. Des Weiteren enthält der KO Vektor eine Diphtherietoxin A-Kassette (DTA-Kassette) zur negativen Selektion und eine Neomycinkassette zur positiven Selektion (Abbildung 27). Dieser damalige erste Versuch der Generierung eines KCNQ5 KO Mausmodells scheiterte allerdings daran, dass das Konstrukt nicht in die Keimbahn gelang.

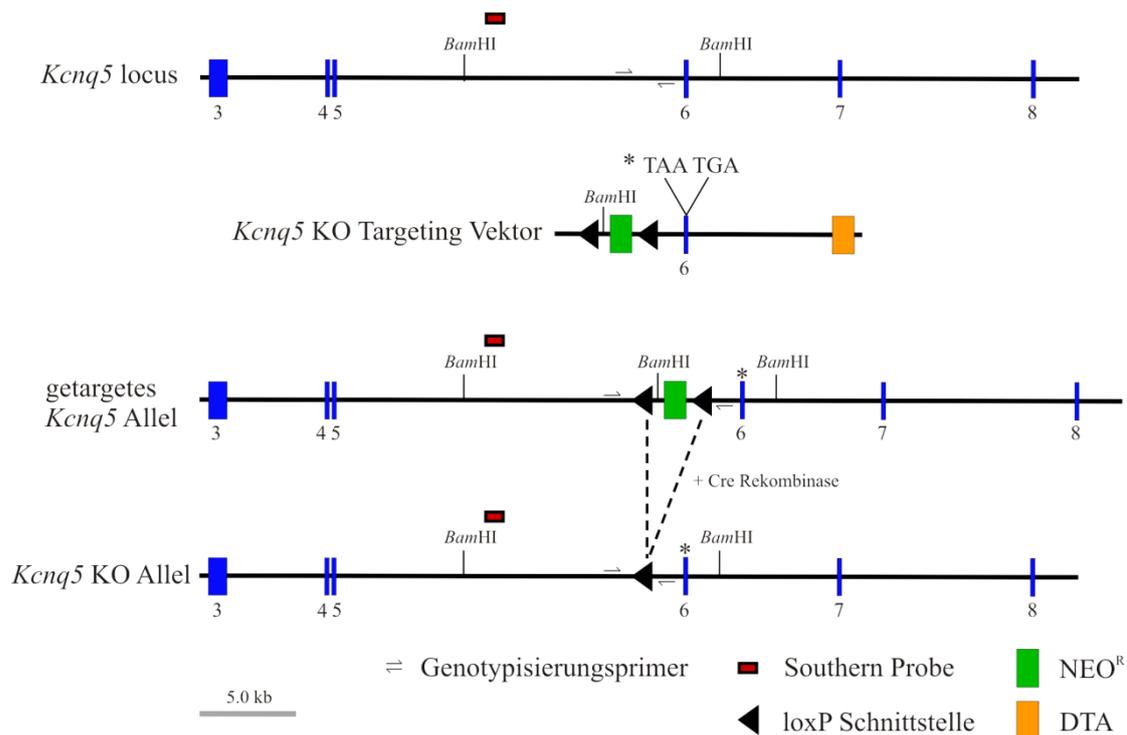


Abbildung 27 | Knock-out Strategie zur Generierung des *Kcnq5*^{-/-} Mausmodells

Targeting-Strategie für die Inaktivierung des *Kcnq5* Gens. Die genomische Sequenz von Exon 3 bis 8 ist abgebildet. Der *Kcnq5* KO Targeting-Vektor enthält eine durch loxP-Schnittstellen flankierte NEO^R Kasette, sowie zwei Stopcodons (TAA TGA) innerhalb Exon 6. Die Sequenz für die Southern Blot Analyse von mit *Bam*HI verdauter DNA befindet sich extern dieser Region (rotes Rechteck). Nach dem Targeting des WT *Kcnq5* Locus wurde die NEO^R Kasette durch die Verpaarung mit Cre-Deleter Mäusen entfernt.

Der erneute Versuch der Generierung von KCNQ5 KO Mäusen führte in der ersten Targeting-Runde zu keinen positiven Klonen, sodass der ursprünglich 11.540 kb große KO Vektor auf 15.362 kb vergrößert wurde. Die Verlängerung der beiden an die DNA-Veränderung angrenzenden Vektor-Arme erhöht die Wahrscheinlichkeit homologer Rekombination des DNA-Konstrukts in die genomische DNA. Die erfolgreiche Rekombination konnte über Southern Blot nachgewiesen werden (Abbildung 28A). Die zusätzlich eingefügte *Bam*HI Schnittstelle im getargeten *Kcnq5* Allel (Abbildung 27) führte bei der Southern Blot Analyse zu einem Produkt von 9.5 kb, wohingegen im WT eine Länge von 13.1 kb detektiert wurde (Abbildung 28A). Zwei über Southern Blot bestätigte Stammzellklone wurden daraufhin in Blastocysten von Wildtypmäusen (C57BL/6) injiziert. Zur Deletion der mit loxP-Schnittstellen flankierten Neomycinkasette wurden die hieraus entstandenen chimären Nachkommen mit Cre-Deleter Mäusen (Schwenk et al., 1995) verpaart (Abbildung 27). Diese Nachkommen wurden durch Sequenzierung auf die Anwesenheit der beiden Stopcodons hin

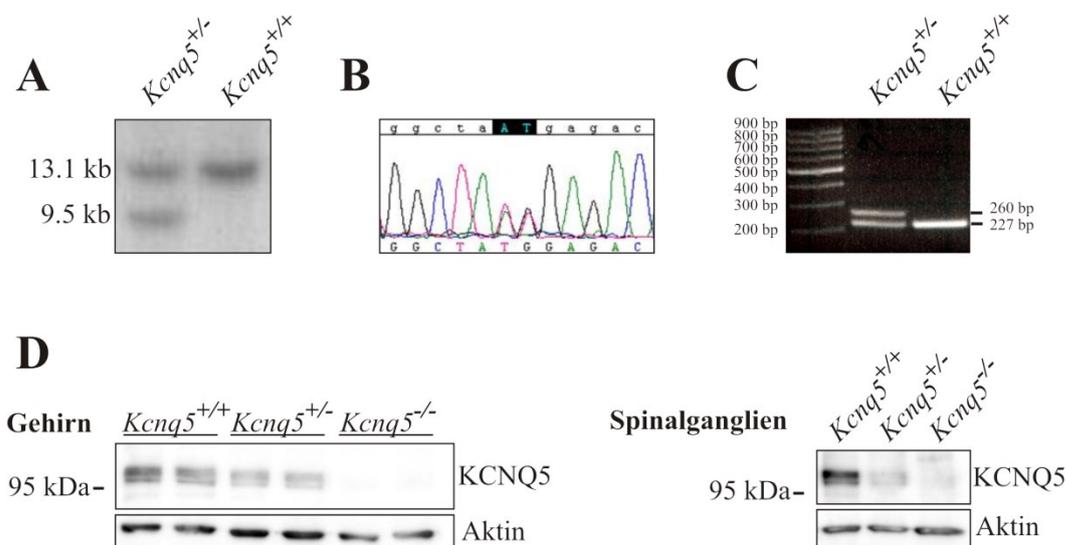


Abbildung 28 | Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchung des *Kcnq5*^{-/-} Mausmodells

(A) Southern Blot Analyse mit *Bam*HI verdauter DNA bestätigt das korrekte ES-Zell Targeting für die Blastocysteninjektion. (B) Die Sequenzierung von durch Blastocysteninjektion entstandener Tiere bestätigt den heterozygoten Genotyp dieser Mäuse (oben KO Allel: TAA TGA; unten WT Allel: TAT GGA; die genetische Modifikation ist schwarz hervorgehoben). (C) Die PCR-Genotypisierung heterozygoter Tiere zeigt aufgrund der verbliebenen loxP-Schnittstelle im KO Allel ein Zwei-Banden Muster auf. (D) Die Western Blot Analyse bestätigt bei homozygoten *Kcnq5*^{-/-} Mäusen den Verlust des KCNQ5 Proteins im Gehirn und in DRG, und zeigt verringerte Proteinmengen bei *Kcnq5*^{+/-} Tieren. Aktin dient der Ladekontrolle.

überprüft (Abbildung 28B). Die verbliebene loxP-Schnittstelle im *Kcnq5* KO Allel (Abbildung 27 unten) wurde sich bei der PCR Genotypisierung zunutze gemacht. Dies führte dazu, dass nach Auftragen des PCR-Produkts auf ein Agarose Gel das KO Allel im Vergleich zum WT Allel ein um 33 bp nach oben verschobenes Bandenmuster aufweist (Abbildung 28C). Der aus dem KO Modell resultierende Verlust des KCNQ5 Proteins wurde über Western Blot Analyse von Gehirn und DRG Geweben nachgewiesen (Abbildung 28D). Des Weiteren zeigte sich auch, dass heterozygote *Kcnq5*^{+/-} Mäuse verringerte KCNQ5 Proteinmengen aufweisen (Abbildung 28D).

Auch auf immunhistochemischer Ebene konnte der Verlust des KCNQ5 Proteins in entsprechendem Mausmodell nachgewiesen werden. Gewebe mit bekanntem KCNQ5 Expressionsmuster diente als Kontrolle. Hierzu zählt die *Crista ampullaris* des Innenohrs (Kharkovets et al., 2006; Spitzmaul et al., 2013) und die CA3 Region des Hippocampus (Lerche et al., 2000; Schroeder et al., 2000a; Jensen et al., 2005; Tzingounis et al., 2010). Sowohl im Innenohr als auch im Hippocampus zeigte sich in WT Gewebe eine KCNQ5 spezifische Färbung, die im entsprechenden KO Modell fehlte (Abbildung 29A,B). Die

immunohistochemische Untersuchung von KCNQ5 in DRG Gewebeschnitten von WT Tieren zeigte zwar auch eine Färbung. Allerdings stellte sich heraus, dass in vergleichbaren Gewebeschnitten von *Kcnq5*^{-/-} Mäusen eine ähnliche Färbung vorhanden war (Abbildung 29C).

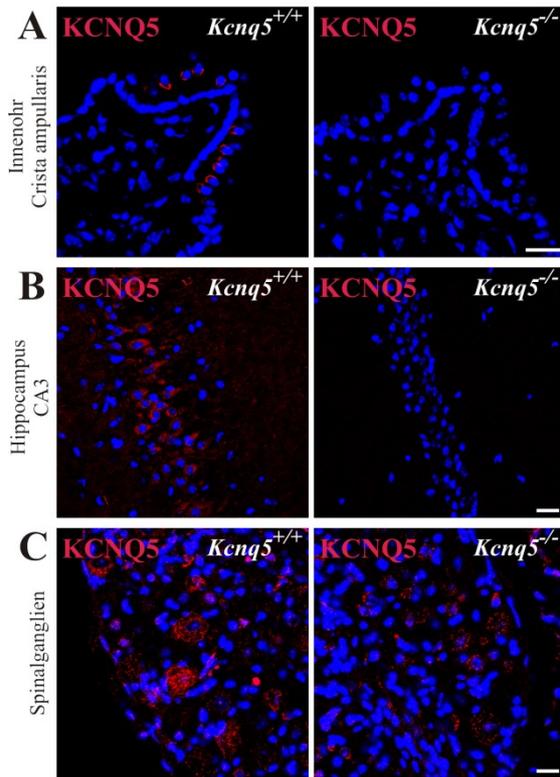


Abbildung 29 | Immunhistochemische Untersuchung des *Kcnq5*^{-/-} Mausmodells

KCNQ5 Antikörper Färbung auf unterschiedlichen Gewebeschnitten von *Kcnq5*^{+/+} und *Kcnq5*^{-/-} Mäusen. (A) Die spezifische KCNQ5 Färbung in Zellen der *Crista ampullaris* des Innenohrs fehlt in Gewebeschnitten von *Kcnq5*^{-/-} Mäusen. (B) Auch in der CA3 Region des Hippocampus fehlt die spezifische KCNQ5 Färbung in *Kcnq5*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *Kcnq5*^{+/+} Tieren. (C) In DRG Schnitten von *Kcnq5*^{-/-} Mäusen verbleibt dagegen eine unspezifische Restfärbung. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20µm.

4.2.2 Charakterisierung von KCNQ5 Antikörpern mit Hilfe des KO Maus Modells

Aufgrund der mangelhaften Qualität der KCNQ5 Färbung in DRG Gewebeschnitten durch den standardmäßig benutzten KCNQ5 C2a rb Antikörper (Abbildung 29C), wurden neben diesem Antikörper weitere in unserer Arbeitsgruppe synthetisierte sowie kommerzielle Antikörper getestet. Dies erfolgte auf Gewebeschnitten von Innenohr, Gehirn und DRG in Verbindung mit entsprechendem Kontrollgewebe von *Kcnq5*^{-/-} Mäusen. Die Ergebnisse des Antikörper-Tests sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass keiner der getesteten Antikörper eine zufriedenstellende und spezifische Färbung auf DRG Gewebeschnitten aufweisen konnte.

Tabelle 13 | Getestete KCNQ5 Antikörper

Antikörper	Epitop	IHC	IHC	IHC
		Innenohr	Gehirn	Spinalganglien
KCNQ5 C2a rb	SESSGSRGSQDFYPKC	+	+	-
KCNQ5 C2a gp (#1222)	SESSGSRGSQDFYPKC	+	+	-
KCNQ5 C rb 1	CKTGDSTDALSLPHVKLN	+	+	-
KCNQ5 C gp	CKTGDSTDALSLPHVKLN	+	+	-
KCNQ5 C1b rb	KSLSVQNLIRSTEELN	+	+	-
KCNQ5 B rb 1	CITDEEVGAETETDT	-	n/v	n/v
KCNQ5 B gp	CITDEEVGAETETDT	-	n/v	n/v
KCNQ5 A rb 1	RRNVKYRRVQNYLYC	-	n/v	n/v
KCNQ5 A gp	RRNVKYRRVQNYLYC	+	+	-
Kommerzieller KCNQ5 Antikörper von Millipore (cat no 5599)	n/v	-	-	-

IHC, Immunhistochemie; +, positives Signal; -, negatives Signal; n/v, nicht verfügbar

4.2.3 Expressionsmuster von KCNQ5 in Maus Spinalganglien

Aufgrund des Fehlens spezifischer KCNQ5 Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen auf DRG Gewebeschnitten, erfolgte die Detektion von KCNQ5 im Folgenden mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen auf RNA statt auf Proteinebene. Der Vergleich zwischen DRG Gewebeschnitten von WT und entsprechendem KO Mausmodell konnte die Spezifität der KCNQ5 *in situ* Markierung zeigen (Abbildung 30).

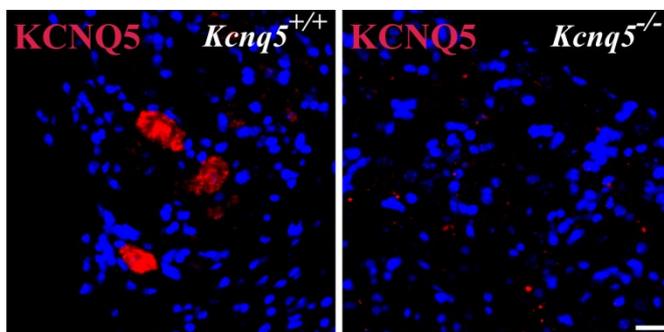


Abbildung 30 | Spezifität der KCNQ5 *in situ* Hybridisierungssonde auf DRG Schnitten

DRG Schnitte von *Kcnq5*^{+/+} und *Kcnq5*^{-/-} Mäusen wurden mit KCNQ5 *in situ* Sonde hybridisiert. Die spezifische Zellkörper Färbung der *Kcnq5*^{+/+} Schnitte fehlt bei *Kcnq5*^{-/-} Gewebe. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 µm.

Die spezifische antisense *in situ* Hybridisierungssonde markierte $8.5 \pm 2.4\%$ aller DRG Neurone (Abbildung 31A). Das Fehlen spezifischer Färbung durch die komplementäre sense *in situ* Sonde deutet auf die Spezifität der antisense *in situ* Sonde hin (Abbildung 31B). Die Quantifizierung der Zellgröße der durch KCNQ5 Sonde markierten Zellen zeigte, dass KCNQ5 vornehmlich in mittelgroßen Neuronen mit einer durchschnittlichen Zellgröße von $693 \pm 26.1 \mu\text{m}^2$ exprimiert wird (Abbildung 31C).

Weitere KCNQ5 *in situ* Hybridisierungen die mit einer Antikörperfärbung für NF200 kombiniert wurden, konnten die vornehmliche Expression von KCNQ5 in myelinisierten DRG Neuronen darlegen (Abbildung 32A). Doppel *in situ* Hybridisierungen mit den Proprioceptor Markern Parvalbumin und Calbindin (Coprav et al., 1994; Ernfors et al., 1994; Honda, 1995) zeigten hingegen keine Ko-Lokalisation mit KCNQ5 (Abbildung 32B,C).

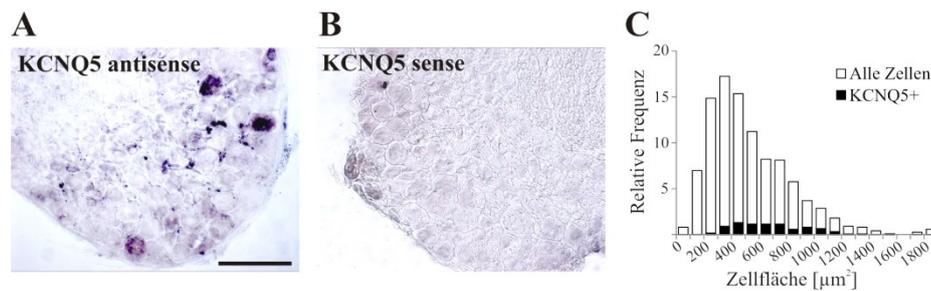


Abbildung 31 | Expressionsanalyse von KCNQ5 in DRG Zellen

DRG Schnitte wurden mit KCNQ5 antisense *in situ* Sonde und sense *in situ* Sonde hybridisiert. (A) Die Hybridisierung von DRG Zellen mit spezifischer antisense Sonde markiert $8.5 \pm 2.4\%$ aller Zellen ($n = 1218$). (B) Diese spezifische Färbung fehlt bei Hybridisierungen mit komplementärer sense Sonde. (C) KCNQ5 befindet sich größtenteils in mittelgroßen DRG Zellen ($693 \pm 26.1 \mu\text{m}^2$, $n = 103$). Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

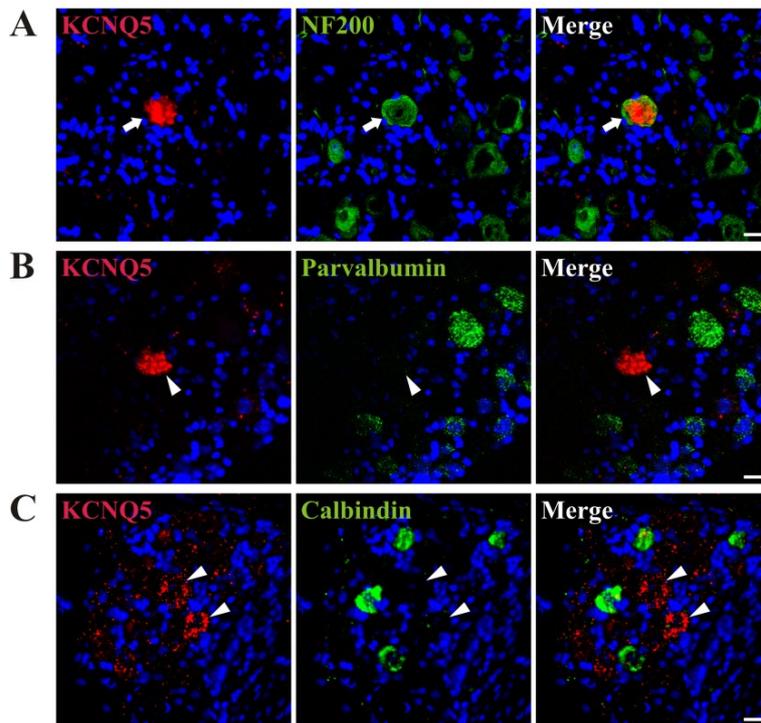


Abbildung 32 | Ko-Expressionsstudie von KCNQ5 in DRG Zellen
 DRG Schnitte wurden mit KCNQ5 *in situ* Sonde hybridisiert und mit NF200 Antikörper (A), Parvalbumin *in situ* Sonde (B) und Calbindin *in situ* Sonde (C) ko-gefärbt. (A) $82.8 \pm 4.1\%$ der KCNQ5-positiven Zellen exprimiert NF200 (Pfeil, $n = 107$). (B) KCNQ5 ko-lokalisiert hingegen nicht mit Parvalbumin (Pfeilspitze, $n = 57$). (C) KCNQ5 befindet sich nicht in Calbindin-exprimierenden Zellen (Pfeilspitzen, $n = 34$). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 μm .

4.3 KCNQ Kanäle und Schmerz

Die Expression von KCNQ Kanälen in nozizeptiven sensorischen Fasern wurde bereits in diversen Veröffentlichungen gezeigt (Jones et al., 1995; Passmore et al., 2003; Crozier et al., 2007). Jedoch konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, welche KCNQ Untereinheit letztlich dieser Funktion zu Grunde liegt. Sowohl für KCNQ5 (King and Scherer, 2011), als auch KCNQ2 und -3 (Linley et al., 2008; Liu et al., 2010; Rose et al., 2011; Passmore et al., 2012; Vetter et al., 2013; King et al., 2014) wurde bereits die Expression in Nozizeptoren postuliert, mit teils gegensätzlichen und widersprüchlichen Ergebnissen. Lokalisationsstudien in Form von *in situ* Hybridisierungen, immunhistochemischen Färbungen, elektrophysiologischen Haut-Nerv Ableitungen und Schmerz-spezifischen Verhaltensversuchen dienen im Folgenden der weiterführenden Untersuchung der Lokalisation und Funktion von KCNQ2, -3 und -5 in nozizeptiven Neuronen des somatosensorischen Systems.

4.3.1 Vergleichende Expressionsanalyse von KCNQ Kanälen in Nozizeptoren

In situ Hybridisierungsversuche ließen vermuten, dass sich KCNQ3 jedoch nicht KCNQ5 in nozizeptiven Spinalganglien Neuronen befindet (Abbildung 33). Die beiden nozizeptiven Marker TRPV1 (Caterina et al., 1997, 2000; Caterina and Julius, 2001) und Na_v1.8 (Akopian et al., 1996; Sangameswaran et al., 1996; Djouhri et al., 2003; Agarwal et al., 2004) konnten demnach eine teilweise Ko-Lokalisation mit KCNQ3 demonstrieren (Abbildung 33A,B). Auf der anderen Seite konnte keine Expression von KCNQ5 in Na_v1.8-positiven Zellen festgestellt werden (Abbildung 33C).

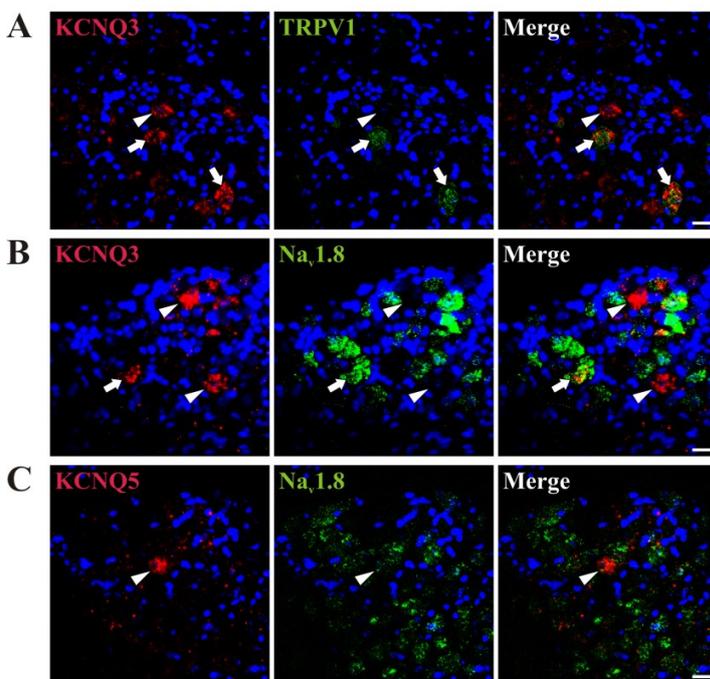


Abbildung 33 | Expression von KCNQ3 aber nicht KCNQ5 in nozizeptiven DRG Zellen

Eine mit Antikörperfärbung kombinierte *in situ* Hybridisierung (A), sowie Doppel *in situ* Hybridisierungen (B,C) auf DRG Schnitten. (A) $19.5 \pm 0.5\%$ der KCNQ3-exprimierenden Zellen sind positiv für TRPV1 (Pfeile, $n = 57$). Pfeilspitze, KCNQ3-positive Zelle, die negativ für TRPV1 ist. (B) KCNQ3 befindet sich teilweise in Na_v1.8-exprimierenden DRG Neuronen (Pfeil, $22.8 \pm 3.5\%$, $n = 129$). Pfeilspitzen, KCNQ3-positive Zellen, die negativ für Na_v1.8 sind. (C) Keine Ko-Lokalisation zwischen KCNQ5 und Na_v1.8 (Pfeilspitze, $n = 75$). Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20 μm .

Immunhistochemische Versuche konnten die Expression von KCNQ3 in nozizeptiven Na_v1.8-exprimierenden DRG Zellen bestätigen (Abbildung 34). Wie bereits in Abbildung 21A,B gezeigt, befanden sich KCNQ2 und -3 in DRGs vornehmlich an Ranvierschen Schnürringen. In DRG Gewebeschnitten von WT Mäusen ko-lokalisierten hierbei knapp 85% der KCNQ2 positiven Schnürringe mit KCNQ3 (Abbildung 34A,G), während in Kontrollschnitten von konstitutiven KCNQ3 KO Mäusen die spezifische KCNQ3 Färbung fehlte (Abbildung 34C,G). Im konditionalen SNS(Na_v1.8)-Cre *Kcnq3*^{lox/lox} Mausmodell waren dagegen knapp 75% der KCNQ2-exprimierenden Schnürringe positiv für KCNQ3 (Abbildung 34B,G), was eine KCNQ3 Reduzierung von ungefähr 10% im Vergleich zum Wildtyp darstellt. In diesem konditionalen Mausmodell erfolgt die Cre-vermittelte Deletion von

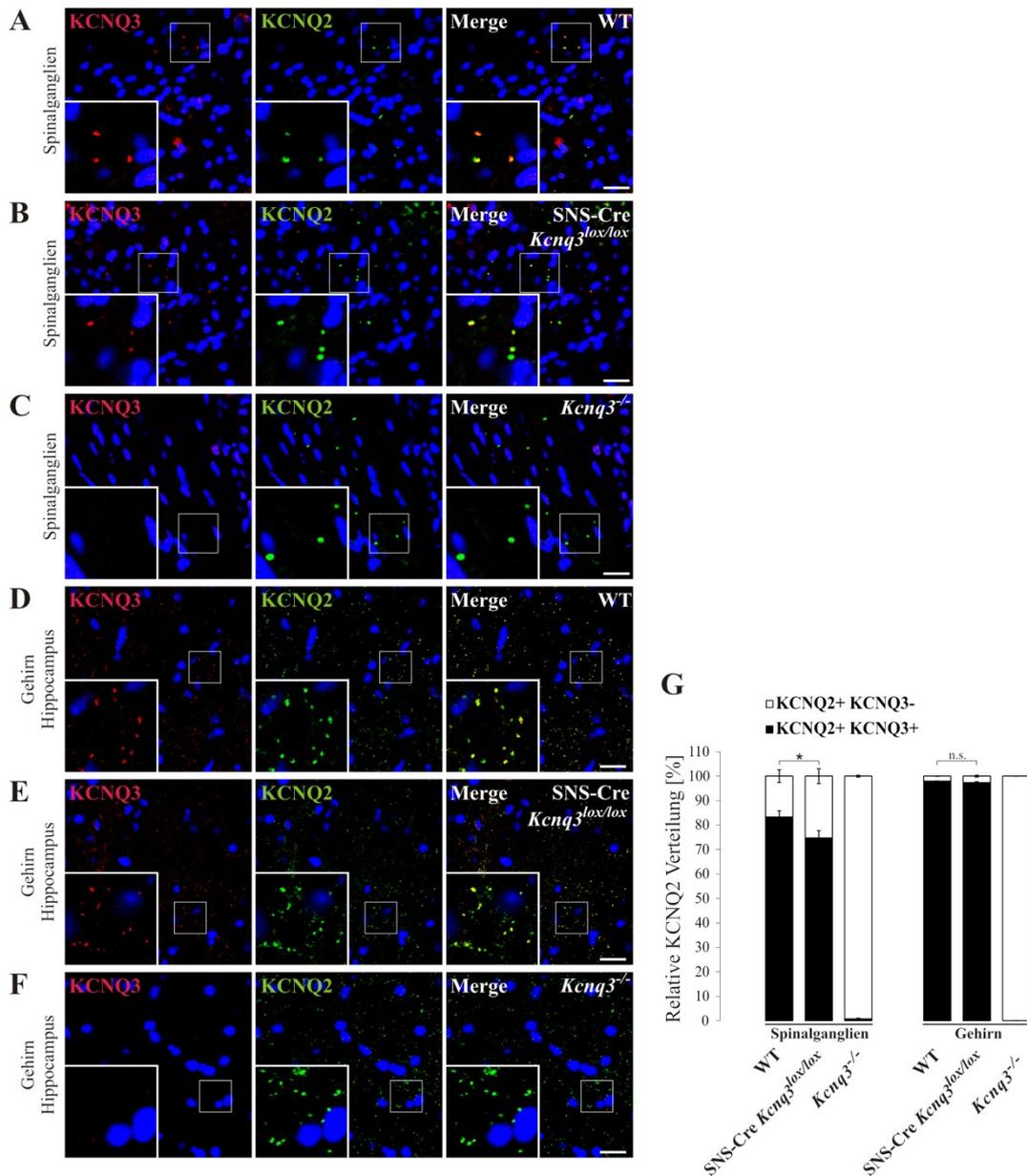


Abbildung 34 | Expressionslevel von KCNQ3 in Ranvierschen Schnürringen von DRG und Gehirnschnitten in verschiedenen KCNQ3 Mausmodellen

Antikörper Färbung für KCNQ2 und -3 auf DRG (A-C) und Gehirn (D-F) Schnitten von WT (A,D), SNS-Cre *Kcnq3^{lox/lox}* (B,E) und *Kcnq3^{-/-}* (C,F) Mäusen. (A) KCNQ2 und -3 ko-lokalisieren in Ranvierschen Schnürringen. Manche der KCNQ2-positiven Schnürringe sind negativ für KCNQ3. (B) Auch im konditionalen SNS-Cre *Kcnq3^{lox/lox}* Mausmodell ko-lokalisieren KCNQ2 und -3. (C) Die KCNQ3 Färbung fehlt dagegen in DRG Schnitten des *Kcnq3^{-/-}* Mausmodells. (D-E) Sowohl in Gehirnschnitten von WT (D) als auch SNS-Cre *Kcnq3^{lox/lox}* (E) Mäusen besteht Ko-Lokalisation zwischen KCNQ2 und -3 im Hippocampus. (F) In Schnitten von *Kcnq3^{-/-}* Mäusen fehlt hingegen die KCNQ3 Färbung. Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Maßstab: 20µm. (G) Quantifizierung der Ko-Lokalisation aus A-F. Die Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 in DRG und Gehirn Schnitten von WT, SNS-Cre *Kcnq3^{lox/lox}* und *Kcnq3^{-/-}* Mäusen wurde gemessen. In WT DRG Schnitten sind von 850 KCNQ2-exprimierenden Ranvierschen Schnürringen 83.2 ± 2.6% positiv für KCNQ3. In konditionalen SNS-Cre *Kcnq3^{lox/lox}* Schnitten sind dies 74.7 ± 3% (n = 685) und in *Kcnq3^{-/-}* Schnitten 0.7 ± 0.4% (n = 585). Die Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 in Ranvierschen Schnürringen des Gehirns beträgt 97.9 ± 0.04% in WT (n = 765) und 97.3 ± 0.4% in SNS-Cre *Kcnq3^{lox/lox}* (n = 687) Schnitten. In Gehirnschnitten von *Kcnq3^{-/-}* Mäusen besteht aufgrund fehlender KCNQ3 Expression keine Ko-Lokalisation (n = 1253) (n.s. P>0.05; *P<0.05; Student's T-Test; Fehlerbalken, s.e.m.)

KCNQ3 lediglich in nozizeptiven und thermorezeptiven DRG und Trigeminalganglien Neuronen (Agarwal et al., 2004). Die unveränderte Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 im Gehirn von konditionalen KCNQ3 KO Mäusen verglichen mit WT Färbungen bestätigte die Spezifität der Cre-vermittelten Deletion im PNS (Abbildung 34D,E,G). In Kontrollschnitten des konstitutiven KCNQ3 KOs lag keine spezifische Färbung mehr vor (Abbildung 34F,G).

4.3.2 Elektrophysiologische Haut-Nerv Messungen an A δ -Mechanonozizeptoren (AMs) in verschiedenen KCNQ Mausmodellen

Es gibt zwei große Gruppen an Nozizeptoren (Lewin and Moshourab, 2004; Basbaum et al., 2009). Zum einen sind dies die mit einer dünnen Myelinschicht ummantelten mittelgroßen A δ -Faser Mechanorezeptoren (AMs), und zum anderen die unmyelinisierten C-Faser Nozizeptoren. Elektrophysiologisch lassen sich diese beiden Fasertypen in der Haut-Nerv Ableitung durch ihre unterschiedliche Leitungsgeschwindigkeit differenzieren. AMs werden in der Maus durch eine Leitungsgeschwindigkeit zwischen 1 – 10 m s⁻¹ charakterisiert, während diese bei C-Fasern unter 1 m s⁻¹ liegt. Von den auch zwischen 1 – 10 m s⁻¹ leitenden D-Haar A δ -Fasern lassen sich AMs durch ihren größeren von Frey Haar Schwellenwert unterscheiden, der bei ungefähr 5.6 mN liegt (Koltzenburg et al., 1997). Der genaue Versuchsablauf wie die Identifizierung des rezeptiven Feldes und die Charakterisierung von Nervenfasern anhand der Leitungsgeschwindigkeit und des von Frey Haar Schwellenwertes werden im Methoden Teil, Kapitel 3.2.6.2 beschrieben.

Die Aktivität von AM Fasern wird gekennzeichnet durch das Feuern während der statischen Phase eines mechanischen Stimulus (siehe hierzu auch Abbildung 23). Um das Feuerverhalten von AM Fasern als Reaktion auf mechanische Reize zu messen, wurden in der elektrophysiologischen Haut-Nerv Ableitung standardisierte mechanische Rampen mit konstanter Geschwindigkeit (1200 $\mu\text{m s}^{-1}$) und variierenden Amplituden (10 – 614 μm) auf das entsprechende rezeptive Feld der Haut appliziert. AM Fasern von WT Mäusen wurden mit denen von *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen verglichen (Abbildung 35). Hierbei konnte kein Unterschied in der Feuerfrequenz während des 10 Sekunden dauernden Stimulus festgestellt werden (Abbildung 35A). Zusätzlich wurde die Feuerfrequenz der ersten drei Sekunden des mechanischen Stimulus ausgewertet. Auch hier zeigte sich kein Unterschied im Feuerverhalten zwischen AM Fasern von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Tieren (Abbildung 35B).

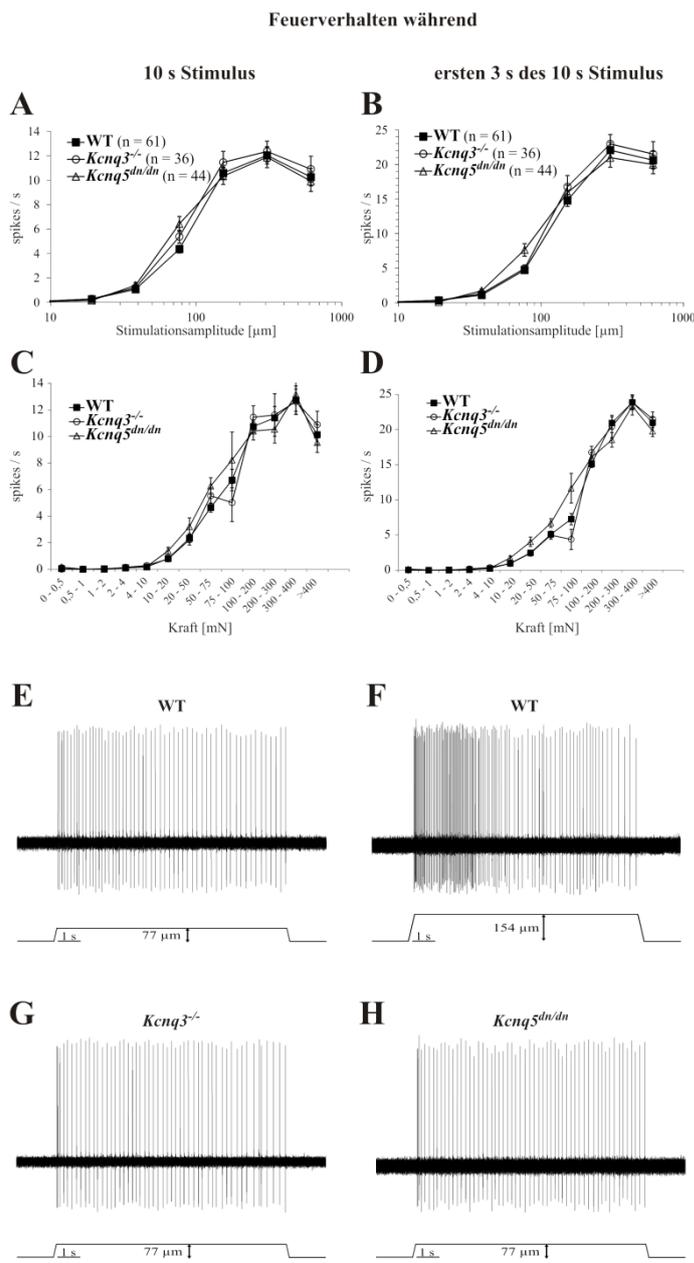


Abbildung 35 | Feuerverhalten von A δ -Mechanorezeptor (AM) Fasern in WT, *Kcnq3^{-/-}* und *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen

AM Fasern wurden in der Saphenus Haut-Nerv Präparation durch mechanische Hautstimulation mit konstanter Rampen Geschwindigkeit von $1200 \mu\text{m s}^{-1}$ und zunehmender Amplitude ($10 - 614 \mu\text{m}$) aktiviert. Das entsprechende Feuerverhalten der Faser wurde entweder während des gesamten 10 Sekunden Stimulus (A,C) oder während der ersten 3 s des mechanischen Haltestimulus (B,D) gemessen; entweder in Relation der gemessenen Amplitude des Nanomotors (A,B) oder der tatsächlich auf der Haut einwirkenden Kraft (C,D). (A) Es besteht kein Unterschied zwischen der Feuerrate von AM Fasern von WT, *Kcnq3^{-/-}* und *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen in Bezug auf die mechanische Haut Stimulation. (B) Auch während der ersten 3 s des Stimulus ergibt sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. (C,D) Das Feuerverhalten bezogen auf die tatsächlich auf die Haut einwirkende Kraft verbleibt sowohl während des kompletten 10 s Stimulus (C) als auch während der ersten 3 s (D) unverändert. (A-D, $P > 0.05$; Student's T-Test; Fehlerbalken, s.e.m.). (E-H) Beispiel Feuerverhalten von WT (E,F), *Kcnq3^{-/-}* (G) und *Kcnq5^{dn/dn}* (H) AM Fasern als Reaktion auf mechanische Stimulation mit einer Rampengeschwindigkeit von $1200 \mu\text{m s}^{-1}$ und einer Stimulusamplitude von $77 \mu\text{m}$ (E,G,H) bzw. $154 \mu\text{m}$ (F).

Zusätzlich zur Stimulus-Amplitude wurde die Feuerrate von AM-Fasern auch in Relation zur tatsächlich gemessenen Kraft gesetzt (Abbildung 35C,D). Allerdings zeigte sich auch mit Hilfe dieser Art der Auswertung, dass das Feuerverhalten sowohl für den gesamten 10 Sekunden dauernden Stimulus (Abbildung 35C), als auch für die ersten drei Sekunden des Stimulus (Abbildung 35D) zwischen den verschiedenen Genotypen unverändert war.

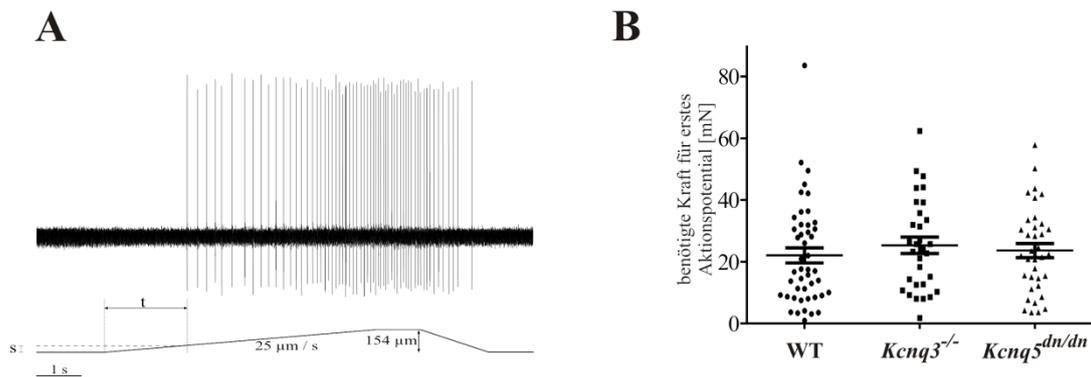


Abbildung 36 | Mechanische Latenz von AM-Fasern

(A) Die mechanische Latenz wurde mit Hilfe eines mechanischen Stimulus mit einer Rampen Geschwindigkeit von $25 \mu\text{m s}^{-1}$ und einer Stimulusamplitude von $154 \mu\text{m}$ bestimmt. Die mechanische Latenz errechnet sich aus der Stimulusamplitude s , die für das erste Aktionspotential nach der Zeit t benötigt wird. (B) Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der mechanischen Latenz von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq5^{dn/dn}$ AM-Fasern ($p > 0.05$; One-way ANOVA).

Des Weiteren wurde als Maß für den mechanischen Schwellenwert von AM Fasern die mechanische Latenz gemessen (Abbildung 36). Die mechanische Latenz beschreibt die benötigte Kraft für das erste Aktionspotential und errechnet sich aus der entsprechenden Stimulusamplitude s (Abbildung 36A). Es konnte allerdings kein messbarer Unterschied in der mechanischen Latenz zwischen AM Fasern von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq5^{dn/dn}$ Mäusen festgestellt werden (Abbildung 36B). Auch die AM Leitungsgeschwindigkeit der verschiedenen Fasern unterschied sich nicht signifikant zwischen diesen Genotypen (Abbildung 37).

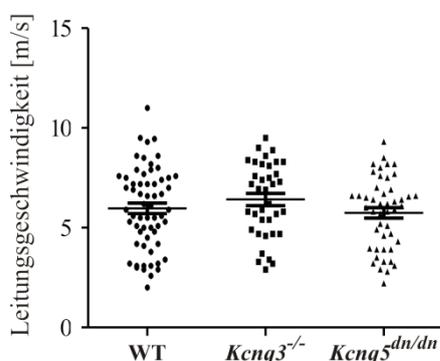


Abbildung 37 | Unveränderte Leitungsgeschwindigkeit von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq5^{dn/dn}$ AM-Fasern

Die Leitungsgeschwindigkeit von AM-Fasern von WT, $Kcnq3^{-/-}$ und $Kcnq5^{dn/dn}$ Mäusen wurde mit Hilfe elektrischer Stimulation des Rezeptiven Feldes gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen ($p > 0.05$; One-way ANOVA).

4.3.3 Elektrophysiologische Haut-Nerv Messungen an C-Fasern in verschiedenen KCNQ Mausmodellen

Wie bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben, lassen sich C-Faser Nozizeptoren durch ihre langsamere Leitungsgeschwindigkeit von AM Nozizeptoren unterscheiden. Da C-Fasern wie auch AMs zu den hoch-schweligen Mechanorezeptoren zählen, wurde zur Messung ihres Feuerverhaltens das gleiche Protokoll verwendet wie für die AM-Fasern (siehe Kapitel 4.3.2). Auch für C-Fasern wurden WT Mäuse mit *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Tieren verglichen (Abbildung 38). Es konnte kein signifikanter Unterschied im C-Faser Feuerverhalten der verschiedenen Versuchsgruppen in Bezug auf die Stimulationsamplitude festgestellt werden; C-Fasern von *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen wiesen lediglich eine leicht erhöhte Feuerfrequenz auf, die allerdings nicht signifikant war (Abbildung 38A). Wie bereits für AM Fasern beschrieben (Kapitel 4.3.2), wurde auch für C-Fasern das Feuerverhalten in Abhängigkeit der tatsächlich gemessenen Kraft bestimmt. Allerdings ergab sich auch hier kein signifikant anderes Resultat (Abbildung 38B) als das bereits in Abbildung 38A gezeigte Ergebnis. Auch die Leitungsgeschwindigkeit von C-Fasern war durch den Verlust des KCNQ3 Proteins bzw. den Funktionsverlust des KCNQ5 Proteins nicht betroffen (Abbildung 39).

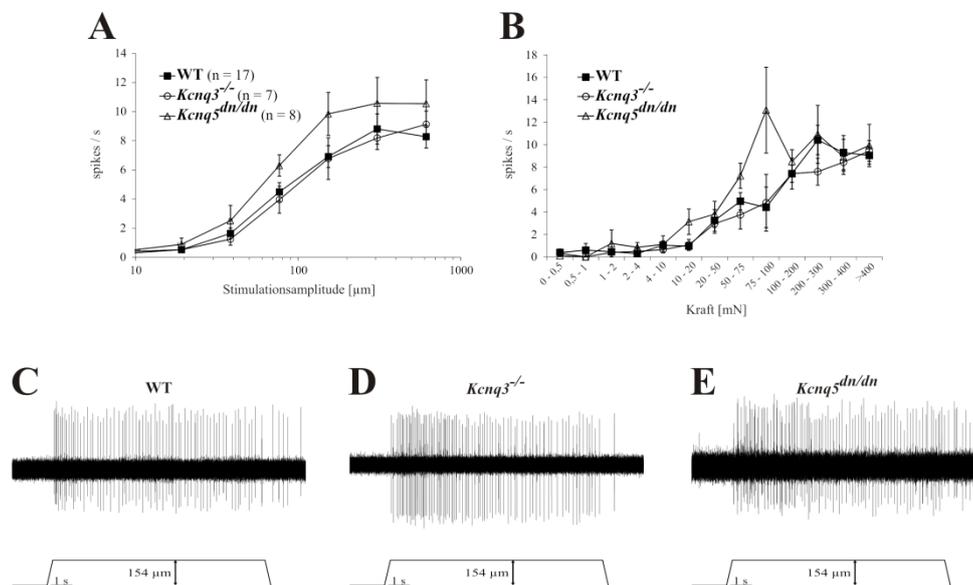


Abbildung 38 | C-Faser Feuerverhalten von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen

C-Fasern von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen wurden in der Saphenus Haut-Nerv Präparation gemessen. Die Fasern wurden am rezeptiven Feld der Haut durch mechanische Stimulation mit konstanter Rampen Geschwindigkeit (1200 µm s⁻¹) und zunehmender Stimulusamplitude (10 – 614 µm) aktiviert, und das Feuerverhalten während des 10 s andauernden Haltestimulus gemessen. (A) Es konnte kein Unterschied in der Feuerfrequenz in Bezug auf den mechanischen Haut-Stimulus festgestellt werden. (B) Bezogen auf die auf die Haut einwirkende Kraft ergibt sich auch kein Unterschied im Feuerverhalten. (A,B, P>0.05; *P<0.05; Student's T-Test; Fehlerbalken, s.e.m.). (C-E) Beispiel Feuerverhalten von WT (C), *Kcnq3*^{-/-} (D) und *Kcnq5*^{dn/dn} (E) C-Fasern als Reaktion auf mechanische Stimulation mit einer Rampengeschwindigkeit von 1200 µm s⁻¹ und einer Stimulusamplitude von 154 µm.

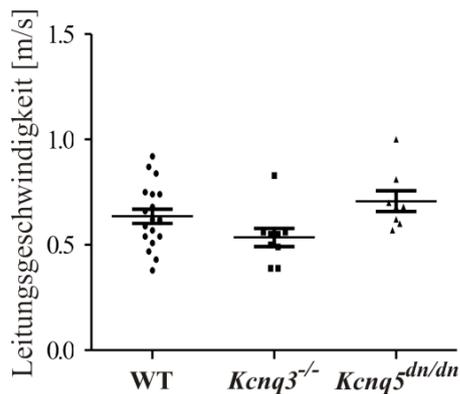


Abbildung 39 | Unveränderte C-Faser Leitungsgeschwindigkeit von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen
Mittels elektrischer Stimulation der rezeptiven Felder auf der Haut wurden die Leitungsgeschwindigkeiten von C-Fasern von WT, *Kcnq3*^{-/-} und *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Versuchsgruppen ($p > 0.05$; One-way ANOVA).

4.3.4 Schmerz-spezifische Verhaltensversuche an *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen

Um die physiologischen Konsequenzen des Funktionsverlusts des KCNQ5 Proteins zu studieren, wurden Schmerz-spezifische Verhaltenstest an *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen durchgeführt. Zum einen beinhaltet dies den Hargreaves-Test, der eine hitzeabhängige Reaktion eines auf die Pfoten-Unterseite gerichteten Laser-Stimulus misst (Hargreaves et al., 1988). Hierbei wurde die Zeit bis zum Wegziehen der Pfote aufgrund zu großer Hitzeentwicklung gemessen. Der Hargreaves-Test an WT und *Kcnq5*^{dn/dn} Mäusen konnte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen aufzeigen (Abbildung 40).

Eine druckempfindliche Schmerzreaktion löst der zweite hier durchgeführte Verhaltenstest aus, der sogenannte Aesthesiometer-Test. Mit Hilfe eines Metallfilaments wurde bei diesem Versuch eine definierte Kraft auf der Pfoten Unterseite appliziert. Es wurde die Kraft in [g] gemessen, bei der die Maus ihre Pfote letztlich aufgrund unangenehmer mechanischer Empfindungen wegzieht. Für diese Art der mechanischen Stimulation zeigte sich, dass *Kcnq5*^{dn/dn} Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant höhere Sensitivität aufweisen (Abbildung 41).

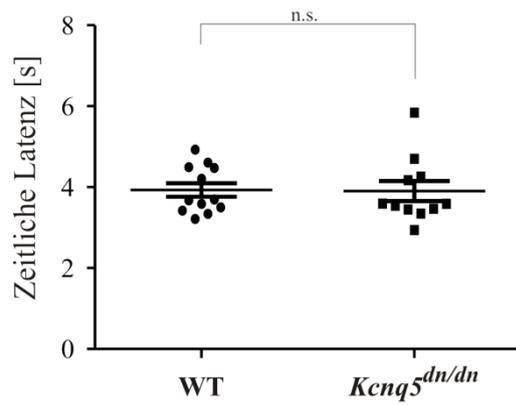


Abbildung 40 | Unveränderte Hitzeempfindlichkeit von *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen
 Der Hargreaves-Test an *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren ergab keinen signifikanten Unterschied in der zeitlichen Latenz bis zum Wegziehen der Pfote als Reaktion auf einen laser-gesteuerten Hitzereiz (n.s. $p > 0.05$; Student's T-Test).

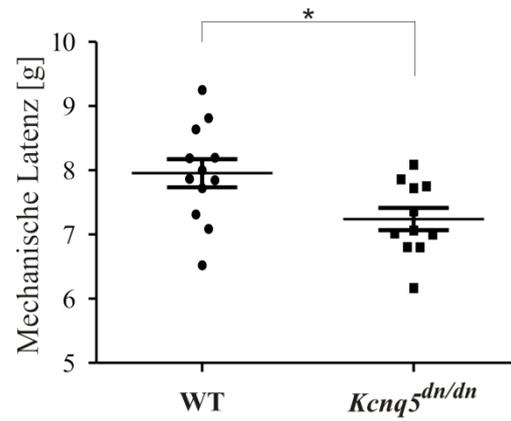


Abbildung 41 | Mechanosensitivität von *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen
Kcnq5^{dn/dn} Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der Empfindlichkeit auf mechanische Stimulation der Pfoten Unterseite im Aesthesiometer-Test (* $p = 0.0194$; Student's T-Test).

5 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle von KCNQ Kanälen im peripheren Nervensystem zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde unter anderem die elektrophysiologische Methode der Haut-Nerv Präparation erlernt, im Labor der AG Jentsch etabliert und angewandt. Mit Hilfe entsprechender KCNQ Mausmodelle ermöglichte dies die Identifikation der in D-Haar Fasern befindlichen KCNQ Untereinheiten sowie die Analyse von KCNQ Kanälen in nozizeptiven Fasern. Die Generierung eines konstitutiven KCNQ5 KO Mausmodells erleichterte ferner die immunhistochemische Untersuchung der Lokalisation des KCNQ5 Proteins.

5.1 Das Expressionsmuster von KCNQ2 und KCNQ3 in Spinalganglien

Bereits im Jahr 1990 konnte der M-Strom in sensorischen Neuronen von Ochsenfrosch DRGs nachgewiesen werden (Tokimasa and Akasu, 1990). Mit Hilfe von Einzelzell-PCRs konnte anschließend sowohl der M-Strom als auch die u.a. ihm zugrunde liegenden molekularen Komponenten KCNQ2 und -3 in unterschiedlich großen DRG Zellpopulationen von Ratten nachgewiesen werden (Passmore et al., 2003). Trotzdem blieb die exakte Lokalisation der verschiedenen KCNQ Untereinheiten innerhalb von DRGs umstritten. So wurden auf immunhistochemischer Ebene in der Folge zum Beispiel gegensätzliche Ergebnisse über die Expression von KCNQ2 veröffentlicht: Zum einen wurde KCNQ2 vornehmlich in kleinen, IB₄- und TRPV1-positiven, nozizeptiven Neuronen beschrieben (Rose et al., 2011). Zum anderen ließen die Ergebnisse einer weiteren Studie die Lokalisation von KCNQ2 vorwiegend in großen, IB₄-negativen Zellen vermuten, während in nozizeptiven Neuronen KCNQ5 die bestimmende KCNQ Untereinheit darstellen sollte (King and Scherer, 2011). Das Thema der in nozizeptiven DRG Neuronen exprimierten KCNQ Untereinheit soll hier zunächst ausgespart und abschließend in Kapitel 5.5 diskutiert werden.

Es zeigte sich, dass KCNQ2 und -3 im somatosensorischen System ein heterogenes Expressionsmuster aufweisen. So konnte die Expression dieser beiden Untereinheiten dort sowohl in nozizeptiven Neuronen als auch in D-Haar A δ -Fasern gefunden werden. *In situ* Hybridisierungen und Antikörper-Immunfärbungen veranschaulichten ferner ein hohes Maß an Ko-Lokalisation zwischen KCNQ2 und -3. Die Ko-Lokalisation der KCNQ2 und -3 Proteine vermag auf der Heteromerisierung dieser beiden Untereinheiten beruhen. Heteromerbildung

zwischen verschiedenen KCNQ Untereinheiten ist begrenzt auf bestimmte Kombinationen an KCNQ Untereinheiten (Schroeder et al., 1998, 2000a; Kubisch et al., 1999; Lerche et al., 2000). KCNQ2 ist demnach ausschließlich zur Heteromerbildung mit KCNQ3 befähigt.

Ferner lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen vermuten, dass KCNQ2 in DRGs ein breiteres Expressionsmuster aufweist als KCNQ3. Nahezu alle KCNQ3-exprimierenden DRG Neurone waren auch positiv für KCNQ2. In der Tat konnten Untersuchungen zeigen, dass homomere KCNQ3 Kanäle in der Regel keine physiologisch relevanten M-Ströme bilden (Zaika et al., 2008; Gómez-Posada et al., 2010). Umgekehrt exprimierten nur ungefähr 65% der KCNQ2-positiven Neurone auch KCNQ3, sodass im Umkehrschluss ein verhältnismäßig großer Anteil an DRG Neuronen mit KCNQ2 lediglich eine KCNQ Untereinheit exprimiert. Dies könnte auch auf unterschiedlichen Detektionssensitivitäten der KCNQ2 und -3 Antikörper sowie *in situ* Sonden beruhen. Ein ähnliches Ergebnis konnte allerdings auch bereits in Ratten beobachtet werden (Schwarz et al., 2006). Hier wurde die Expression von KCNQ2 in allen Ranvierschen Schnürringen peripherer myelinisierter Neurone beschrieben, während eine Färbung für KCNQ3 lediglich an Ranvierschen Schnürringen kleinerer und mittlerer Neurone detektiert werden konnte. Folglich waren die Schnürringe großer Neurone hier ausschließlich KCNQ2 positiv.

Die Ko-Lokalisation mit NF200 und Ankyrin G bekräftigte die Expression von KCNQ2 und -3 an Ranvierschen Schnürringen myelinisierter Neurone. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit diversen weiteren Studien, die KCNQ2 und -3 an Ranvierschen Schnürringen myelinisierter Neurone beschrieben (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Schwarz et al., 2006). Demzufolge besitzen KCNQ2 und -3, aber nicht KCNQ5, ein hoch konserviertes C3 Motiv an ihrem C-Terminus, welches mit Ankyrin G interagiert. Dies bedingt die Lokalisation von KCNQ2 und -3 an Ranvierschen Schnürringen und AIS. Die Sequenz dieses Motivs ähnelt der einer in Na_v Kanälen beschriebenen, der Interaktion mit Ankyrin G dienenden Peptidsequenz, die die axonale Lokalisation dieser Kanäle vermittelt (Garrido et al., 2003; Lemaillet et al., 2003; Fache et al., 2004).

Da lediglich mittelgroß bis große A δ - und A β -Fasern eine Myelin-Ummantelung aufweisen, unterstützt die in meiner Arbeit beschriebene Expression von KCNQ3 in mittelgroßen DRG Neuronen (ungefähre Zellgröße von $570 \mu\text{m}^2$) die Theorie der Lokalisation in myelinisierten Neuronen. Wie bereits beschrieben kann davon ausgegangen werden, dass sich ein nicht zu vernachlässigender Anteil der KCNQ2 Expression zusammen mit KCNQ3 in mittelgroßen Neuronen befindet. Dies wird gestützt durch mehrere bereits oben genannte

Publikationen (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Schwarz et al., 2006; King and Scherer, 2011), die KCNQ2 in mittelgroßen bis großen myelinisierten Neuronen beobachten konnten. Diese Ergebnisse stehen allerdings in Gegensatz zu einer weiteren Publikation, die die Expression von KCNQ2 ausschließlich in kleinen, nozizeptiven DRG Zellen beschrieb (Rose et al., 2011). Der durchschnittliche Durchmesser KCNQ2-positiver Neurone betrug in besagter Publikation $20.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$. Angenommen, die Zellgröße entspricht ungefähr dem Flächeninhalt eines Kreises ($\pi \cdot r^2$) ergibt dies für die Zellgröße KCNQ2-positiver Neurone einen Wert von etwa $314 \mu\text{m}^2$. Dieser Wert unterscheidet sich allerdings erheblich von den in meiner Arbeit gemessenen $570 \mu\text{m}^2$. Die Schlussfolgerung aus Rose et al. (2011), dass KCNQ2 in kleinen, nozizeptiven Neuronen exprimiert wird, beruht lediglich auf in DRG durchgeführten, nicht knock-out kontrollierten, immunhistochemischen Versuchen. Im Gegensatz hierzu sind die in meiner Arbeit gezeigten KCNQ3 Versuche stets knock-out kontrolliert.

Für die Expression von KCNQ2 und -3 in DRG liegen demnach teils widersprüchliche Daten vor. Dies unterscheidet KCNQ2 und -3 von KCNQ4, für die eine eindeutige und spezifische Expression in einer abgegrenzten Unterpopulation von DRG Neuronen nachgewiesen werden konnte (Heidenreich et al., 2011). Die Population der KCNQ4-positiven Zellen konnte als RAI A β -Fasern identifiziert werden. In behaarter Haut formen diese Neurone lanzettförmige Nervenendigungen um Haarfollikel und in unbehaarter Haut assoziieren sie mit Meissner-Körperchen. Die Expression von KCNQ4 in diesen Tastorganen ist demnach bedeutend für die Perzeption niedrig-frequenter Vibrationsstimuli. Demgegenüber konnte für KCNQ2 und -3 keine DRG Population identifiziert werden, die als Einzige diese beiden KCNQ Untereinheiten exprimiert. Vielmehr scheinen KCNQ2 und -3 im Gegensatz zu KCNQ4 in unterschiedlichen Populationen präsent zu sein. Im folgenden Kapitel 5.2 werden zunächst die Ergebnisse bezüglich der Lokalisation von KCNQ2 und -3 in D-Haar A δ -Fasern diskutiert, bevor im letzten Kapitel 5.5 die Resultate für die verschiedenen KCNQ Kanäle bezüglich Schmerz in den Kontext der bereits umfangreich publizierten Studien gesetzt werden.

5.2 KCNQ2 und KCNQ3 werden für die normale Funktion des D-Haar Mechanorezeptors in behaarter Haut benötigt

Die Anwesenheit eines oder mehrerer KCNQ Kanäle in D-Haar Fasern wurde bereits bei Heidenreich et al. (2011) postuliert. Hier konnte in Kontrolltieren gezeigt werden, dass der spezifische KCNQ Kanal Inhibitor Linopirdin die Feuerfrequenz als Reaktion auf mechanische Stimulationsamplituden in Haut-Nerv Ableitungen vergrößert. Ein vergleichbarer Effekt konnte in *Kcnq4*^{-/-} Mäusen beobachtet werden (Heidenreich et al., 2012). Dies führte zu der Annahme, dass dies ein KCNQ4-unabhängiger Prozess ist. In vorliegender Arbeit wurden alle neuronalen KCNQ Kanäle auf ihre Expression in D-Haar Fasern hin untersucht. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden konnte die Expression von KCNQ2 und -3, jedoch nicht von KCNQ4 und -5 in D-Haar Fasern der Maus nachgewiesen werden. Dies beruht unter anderem auf der Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 mit den D-Haar Markern TrkB und Ca_v3.2 in Somata von DRG Zellen. In behaarter Haut konnte KCNQ3 außerdem in den lanzettförmigen Nervenendigungen dieser D-Haar Neurone beobachtet werden. Die Detektion von KCNQ2 in der Haut war mit den hier zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht möglich. Der Verlust des KCNQ3 Proteins führte ferner zu einer erhöhten Feuerfrequenz von D-Haar Fasern als Reaktion auf mechanische Stimulation in elektrophysiologischen Haut-Nerv Ableitungen.

Trotz der Tatsache, dass D-Haar Fasern bereits 1967 das erste Mal in Katzen beschrieben wurden (Brown and Iggo, 1967), waren ihre molekularen Eigenschaften, ihre Funktion bei Tastempfindungen und die Morphologie ihrer axonalen Endigungen in der Haut lange Zeit unbekannt. Erst kürzlich wurden die D-Haar spezifischen Marker TrkB und Ca_v3.2 identifiziert (Stucky et al., 1998, 2002; Shin et al., 2003; Wang and Lewin, 2011), die beide im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Der Tyrosin Kinase Rezeptor TrkB bindet Neurotrophin-4 (NT4) (Klein et al., 1992), welches für die Aufrechterhaltung und das Überleben von D-Haar Fasern essentiell ist (Stucky et al., 1998). Der Knock-out von NT4 führt zu einem beinahe kompletten Verlust an D-Haar Fasern sowie einhergehender Verringerung TrkB-exprimierender Neurone (Stucky et al., 2002). In Haut-Nerv Ableitungen konnten TrkB-positiven Neuronen die charakteristischen physiologischen Eigenschaften von D-Haar Fasern nachgewiesen werden (Li et al., 2011), sodass dieses Protein mittlerweile ein vielfach benutzter und akzeptierter Marker für diese Fasern darstellt (Wende et al., 2012). Als zweiter spezifischer Marker für D-Haar Fasern wurde hier der T-Typ Calcium Kanal Ca_v3.2 benutzt (Shin et al., 2003), der als Art Verstärker in D-Haar Fasern die Mechanosensitivität

erhöht (Wang and Lewin, 2011). Aufgrund der bereits in Kapitel 5.1 diskutierten fehlenden bzw. zu schwachen somatischen Expression von KCNQ2 und -3 waren Antikörperbasierte Versuche für Lokalisationsstudien auf Zellkörper Ebene nicht möglich. Im Fall von KCNQ5 konnte aufgrund fehlender Antikörper-Spezifität auf DRG Schnitten nicht die erwünschte Färbung erzielt werden (siehe hierzu auch Kapitel 5.4). Statt auf Protein Ebene erfolgten die Lokalisationsuntersuchungen für die verschiedenen KCNQ Kanäle in DRGs demnach auf RNA Ebene mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen.

Jeweils weniger als 50% der KCNQ2 und -3 exprimierenden DRG Neurone waren positiv für die beiden D-Haar Marker TrkB und Ca_v3.2. Dies bestätigt die Annahme, dass KCNQ2 und -3 in unterschiedlichen sensorischen Populationen vorhanden sind, und unterscheidet diese beiden KCNQ Kanäle von Ca_v3.2, der als ein hoch spezifischer D-Haar Faser Marker gilt (Shin et al., 2003; Wang and Lewin, 2011). Die Expression von KCNQ2 und -3 in verschiedenen DRG Populationen wurde auch bereits 2003 postuliert (Passmore et al., 2003) und steht demnach in Einklang zu den hier dargestellten Ergebnissen. Gleichwohl wurde bisher lediglich eine Rolle für KCNQ2 und -3 in nozizeptiven Fasern vermutet. Die Identifikation von KCNQ2 und -3 in D-Haar Fasern stellt demgegenüber eine neue, bisher unbeschriebene Lokalisation dieser Kanäle dar.

Zusätzlich zeigte in der Peripherie die Ko-Färbung mit dem Marker TrkB die Lokalisation von KCNQ3 in lanzettförmigen D-Haar Nervenendigungen um Haarfollikel. Neben D-Haar A δ -Fasern sind zwei weitere niederschwellige Fasertypen dafür bekannt, lanzettförmige Nervenendigungen um Haarfollikel zu bilden, A β RAI-LTMRs und C-LTMRs. Diese drei Fasertypen lassen sich in der Haut anhand bestimmter neurochemischer Eigenschaften voneinander unterscheiden (Li et al., 2011; Wende et al., 2012): A β RAI-LTMR werden demnach durch eine S100-, NF200-, und Calbindin-positive Färbung charakterisiert und weisen zusätzlich ein schwaches Signal für TrkB auf. Lanzettförmige A δ D-Haar Fasern lassen sich demgegenüber durch positive Signale für S100 und insbesondere TrkB identifizieren und sind in der Haut negativ für NF200 und Calbindin. C-LTMRs werden dagegen lediglich als positiv für S100 beschrieben, während sie keine Expression für NF200, Calbindin und TrkB aufweisen. Diese drei Fasertypen, A β RAI-LTMRs, A δ D-Haar LTMRs und C-LTMRs, werden alternativ auch als Faser Typ I, II und III bezeichnet (Wende et al., 2012). Die Ko-Lokalisation von KCNQ3 und TrkB in peripheren longitudinalen, lanzettförmigen Nervenendigungen, die negativ für NF200 sind, lassen demnach eindeutig auf A δ D-Haar Fasern schließen.

Wie bereits in der Einleitung in Kapitel 1.5.2.5 dargelegt wurde, wird in der Haut von Mäusen zwischen Guard, Awl/Auchene und Zigzag Haaren unterschieden. Jeder dieser drei Haarfollikel-Typen wird von einer ihm eigenen und einzigartigen Kombination an LTMRs innerviert (Li et al., 2011). Guard Haarfollikel werden demzufolge von A β RAI-LTMRs innerviert, und assoziieren darüber hinaus mit von A β SAI-LTMRs innervierten Merkel-Zellen. Awl/Auchene Haare werden dreifach innerviert von A β RAI-LTMRs, A δ D-Haar LTMRs und C-LTMRs, während Zigzag Haarfollikel mit A δ D-Haar LTMRs und C-LTMRs assoziieren. Folglich innervieren KCNQ3-positive A δ D-Haar Fasern sowohl Awl/Auchene als auch Zigzag Haare. Dies entspräche demnach der Expression von KCNQ3 in ungefähr 99% aller mit Haarfollikeln assoziierten Nervenendigungen. In den hier beschriebenen Immunfärbungen von Hautschnitten konnte gleichwohl kein derart weit verbreitetes Expressionsmuster von KCNQ3 um Haarfollikel festgestellt werden. So mag dies an der Qualität der hier zur Verfügung stehenden KCNQ3 Antikörper liegen, deren Signalstärke nicht an die anderer für die Markierung von Nervenendigungen benutzter Antikörper heranreicht (TrkB, NF200, KCNQ4). Es gilt allerdings auch zu bedenken, dass A δ -LTMR lanzettförmige Nervenendigungen kein gleichmäßiges Verteilungsmuster um Awl/Auchene und Zigzag Haare aufweisen, sondern stark polarisiert um diese Haarfollikel herum angeordnet liegen (Rutlin et al., 2014). Es konnte demnach gezeigt werden, dass das Neurotrophin BDNF über den Tyrosin Kinase Rezeptor TrkB eine einseitige Konzentrierung der lanzettförmigen Nervenendigungen auf der kaudalen Seite des Haares bewirkt. Dieses anatomische Merkmal wird ferner auch dafür verantwortlich gemacht, dass D-Haar Fasern bevorzugt auf Haarbewegungen in kaudal-rostraler statt in rostral-kaudaler Richtung reagieren (Rutlin et al., 2014).

Die bereits diskutierte Ko-Lokalisation von KCNQ2 und -3 in DRGs, sowie die Detektion beider KCNQ Untereinheiten in TrkB-exprimierenden DRG Neuronen lässt die Vermutung aufkommen, dass sich KCNQ2/3 heteromere Kanäle nicht nur an Axon Initial Segmenten oder Ranvierschen Schnürringen befinden, sondern auch in D-Haar Nervenendigungen um Haarfollikel gemeinsam lokalisieren. Im Gegensatz zu KCNQ3 konnte die Expression von KCNQ2 allerdings nicht in Nervenendigungen behaarter Haut von Mäusen nachgewiesen werden. Dies kann an fehlender Antikörper Spezifität liegen. Gleichwohl funktionierte dieser Antikörper auf Gehirn und DRG Gewebeschnitten. Ursache für eine fehlende KCNQ2 Färbung in der Haut könnte auch in der Art der Gewebepräparation zu suchen sein. Verschiedene Methoden der Perfusion sowie Möglichkeiten der Antigen-Zurückgewinnung führten allerdings zu keiner Verbesserung der KCNQ2 Färbungen. Es

besteht auch die Möglichkeit, dass KCNQ2 gar nicht an D-Haar Nervenendigungen lokalisiert. Dies würde bedeuten, dass hier keine KCNQ2/3 Heteromere sondern lediglich KCNQ3-homooligomere Kanäle auftreten. Gleichwohl gibt es Hinweise darauf, dass homomere KCNQ3 Kanäle alleine nicht in der Lage sind, einen physiologisch relevanten M-Strom zu bilden (außer in heterologen Expressionssystemen) (Zaika et al., 2008; Gómez-Posada et al., 2010), was wiederum für die Gegenwart heteromerer KCNQ2/3 Kanäle in peripheren Nervenendigungen spräche. Ferner konnte gezeigt werden, dass KCNQ3 Kanäle ein ER Retentions-Motiv besitzen, welches durch die Anwesenheit von KCNQ2 maskiert wird (Nakajo and Kubo, 2008). Bei homomeren KCNQ3 Kanälen wird demnach vermutet, dass die Abwesenheit von KCNQ2 zur Freilegung dieses Motivs und entsprechender Akkumulation von KCNQ3 im ER mit anschließender Aktivierung des ER-assoziierten Abbaus führt (Soh et al., 2014). Im Gegensatz hierzu konnte bei KCNQ2 kein vergleichbares Motiv gefunden werden.

Dieser Thematik kommt auch deshalb eine besondere Bedeutung zu, da KCNQ2/3 heteromere Kanäle größere Ströme erzielen als jeweils KCNQ2 oder KCNQ3 homomere Kanäle (Schroeder et al., 1998; Wang et al., 1998; Schwake et al., 2000). Interessanterweise unterscheiden sich auch KCNQ2 und -3 in ihrer jeweiligen Bedeutung für den M-Strom. So weist der Verlust des KCNQ2 Proteins einen größeren Effekt auf die neuronale Erregbarkeit auf als der Verlust von KCNQ3 (Soh et al., 2014). Der Verlust von KCNQ2 reduziert zusätzlich auch die Proteinmenge von KCNQ3, wohingegen der KCNQ3 KO keinen Einfluss auf KCNQ2 Level besitzt. Die größere Bedeutung des KCNQ2 Proteins wird auch bei humanen Erkrankungen deutlich. So sind krankheitsauslösende Mutationen im *KCNQ2* Gen sehr viel häufiger als im *KCNQ3* Gen. Mutationen in *KCNQ2* können demnach zu einer Vielzahl humaner Erkrankungen führen, wie der neonatalen epileptischen Enzephalopathie, dem Ohtahara Syndrom und infantilen Spasmen (Singh et al., 2003; Millichap and Cooper, 2012; Saitsu et al., 2012; Weckhuysen et al., 2012). Demgegenüber sind krankheitsauslösende Mutationen bei *KCNQ3* vornehmlich mit BFNS verbunden (Maljevic et al., 2008).

Der komplette Verlust des KCNQ2 Proteins konnte leider nicht untersucht werden, da *Kcnq2*^{-/-} Mäuse aufgrund pulmonaler Atelektase direkt nach der Geburt sterben (Watanabe et al., 2000). Heterozygote Tiere weisen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erheblich reduzierte KCNQ2 Protein Level auf (Watanabe et al., 2000). Die Hypothese der gemeinsamen Lokalisation von KCNQ2 und -3 an peripheren Nervenendigungen wurde hier durch weiterführende Messungen in *Kcnq2*^{+/-}/*Kcnq3*^{-/-} Mäusen unterstützt. Die zusätzliche

Verminderung der KCNQ2 Proteinlevel in diesem Mausmodell verursachte eine Erhöhung der Feuerfrequenz innerhalb der zweiten Hälfte der mechanischen Rampe, insbesondere bei langsameren Rampengeschwindigkeiten. Dieser beobachtete Anstieg in *Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}* Mäusen ist folglich ein indirektes Indiz für die Existenz KCNQ2/3 heteromerer statt KCNQ3 homooligomerer Kanäle in peripheren Nervenendigungen.

Der Grund für die erhöhte Feuerfrequenz von *Kcnq3^{-/-}* D-Haar Fasern im Vergleich zu WT Fasern lag in vermehrtem Feuern gegen Ende der mechanischen Stimulation. WT D-Haar Fasern erreichten ihr maximales Feuerverhalten bei langsamen Rampen (158 $\mu\text{m/s}$) nach ungefähr 375 ms und bei schnellen Rampen (1163 $\mu\text{m/s}$) nach ungefähr 35 ms. Dies entspricht publizierten Daten für entsprechende Kontrolltiere (Wang and Lewin, 2011). Bei den in meiner Arbeit untersuchten knock-out Mausmodellen blieb das Feuerverhalten während der initialen Phase des mechanischen Stimulus im Vergleich zu WT Mäusen nahezu unverändert, insbesondere bei langsameren Rampen. Anschließend führte der Verlust von KCNQ Protein(en) allerdings zu einer erhöhten Feuerrate. Die erhöhte mechanische Sensitivität von *Kcnq3^{-/-}* als auch *Kcnq2^{+/-}/Kcnq3^{-/-}* D-Haar Fasern entspricht der dämpfenden Funktion von KCNQ Kanälen auf neuronale Erregung. Dies beruht auf einem langsam aktivierenden, nicht inaktivierenden, auswärts-gerichteten K^+ -Ionenstrom, der teilweise bereits beim Ruhemembranpotential aktiv ist. Analog zu KCNQ4, welches die Sensitivität von schnell adaptierenden Mechanorezeptoren bei niedrig-frequenten, aber nicht hoch-frequenten Vibrationen beeinflusst (Heidenreich et al., 2011), ist der KCNQ2/3 Effekt bei D-Haar Fasern am größten bei niedrigen Stimulus Geschwindigkeiten. Ähnlich der Lokalisation von KCNQ4 an zirkulären und lanzettförmigen Endigungen von schnell adaptierenden Mechanorezeptoren (Heidenreich et al., 2011), befindet sich auch KCNQ3 an lanzettförmigen Nervenendigungen von D-Haar Fasern. Subzellulär stellt diese Lokalisation eine Region dar, die für die Mechanotransduktion sowie die Generierung von Rezeptorpotentialen wichtig ist (siehe hierzu auch Diskussion Kapitel 5.3).

Der Effekt von KCNQ2 und -3 bezüglich der D-Haar Sensitivität war lediglich von relativ geringem Ausmaß und führte auch zu keinem offensichtlichen Verhaltensphänotyp. Der komplette Verlust sowohl von KCNQ3 als auch von KCNQ2 könnte den beobachteten Effekt noch vergrößern. Um die Letalität homozygoter KCNQ2 KO Mäuse zu umgehen, könnte man entsprechende konditionale Mausmodelle verwenden. Kürzlich wurde ein konditionales Mausmodell beschrieben, in dem KCNQ2 lediglich in sensorischen Neuronen deletiert ist (*Pax3Cre-Kcnq2^{lox/lox}*) (King et al., 2014). Wie aufgrund der generell dämpfenden Wirkung des

M-Stroms zu erwarten war, besaßen DRG Neuronen dieser knock-out Mäuse eine erhöhte Erregbarkeit sowie eine reduzierte Spike-Frequenz Adaptation, und die Mäuse entwickelten thermale Hyperalgesie und mechanische Allodynie (King et al., 2014). Alternativ ließe sich KCNQ2 auch über Advillin-Cre Mäuse konditional in DRG und im *Ganglion trigeminale* deletieren (Zurborg et al., 2011). Mit Hilfe der kürzlich beschriebenen TrkB^{CreER} Mäuse könnte man sogar noch spezifischere konditionelle knock-out Mäuse erstellen, welche lediglich eine Deletion in D-Haar Neuronen aufweisen würden (Rutlin et al., 2014).

Die Aktivierung der Haut in der hier durchgeführten Art und Weise entspricht allerdings nicht der physiologischen Stimulation des rezeptiven Feldes. In der Regel wird bei Haut-Nerv Ableitungen das Hautpräparat mit der Lederhaut (*Corium*) nach oben in der Messkammer platziert (Reeh, 1986; Zimmermann et al., 2009). Dadurch wird auch von dieser Seite mechanisch durch den Nanomotor stimuliert. Diese Methode, bei der die Epidermis demnach mit der behaarten Außenseite nach unten zeigt, erleichtert zwar die Perfusion der Dermis sowie die elektrische Stimulation und pharmakologische Manipulation primär afferenter Fasern (Lewin and Moshourab, 2004; Wellnitz et al., 2010). Allerdings entspricht dies nicht der Stimulation der Haut im lebenden Organismus. Da der Grund für die fehlende Auflösungskraft zwischen SAII und SAI A β -Fasern in dieser invertierten Konfiguration der Haut-Nerv Präparation vermutet wurde (Lewin and Moshourab, 2004), entwickelte die Gruppe um Ellen A. Lumpkin eine neuartige Kammer für Haut-Nerv Ableitungen, bei der die Perfusion der Haut von unten erfolgt (Wellnitz et al., 2010). Hierdurch zeigt die epidermale Oberfläche mit der behaarten Außenseite der Haut nach oben, bleibt trocken und erlaubt folglich eine Stimulation der Haut, die eher der physiologischen Stimulation in der lebenden Maus entspricht. Auch für die Aktivierung von mit Haaren assoziierten Fasern wie den D-Haar Fasern entspräche diese neuartige Konfiguration einem physiologischeren Aufbau. Gleichwohl wurde für die in meiner Arbeit vorliegenden Versuche aufgrund der oben genannten Eigenschaften der invertierten Konfiguration dieser etablierte Versuchsaufbau der neuartigeren Version vorgezogen. Hinzu kommt, dass kürzlich gezeigt werden konnte, dass der eigentlich physiologische Stimulus für D-Haar Fasern in einer Haar Umlenkung in kaudal-rostraler Richtung besteht (Rutlin et al., 2014). Dies lässt sich auf die kaudale Lokalisation der A δ -LTMR lanzettförmigen Nervenendigungen um Haarfollikel zurückführen. Der Effekt einer Deletion von KCNQ2 und -3 ließe sich demnach mit Hilfe eines physiologischeren Versuchsaufbaus womöglich noch vergrößern.

Die hier beschriebenen Eigenschaften der neuronalen Innervation von Haaren liegen ausschließlich der Situation in Mäusen zugrunde, und können nicht eins zu eins auf den Menschen übertragen werden. Trotzdem kann auch beim Menschen zwischen verschiedenen Haar Typen unterschieden werden, dem Kopfhaar, dem Schamhaar und dem Vellushaar (bzw. Zwischenhaar oder Flaumhaar) (Schlake, 2007). Im Gegensatz zu den Guard, Awl/Auchene und Zigzag Haaren bei Mäusen treten die menschlichen Haartypen allerdings nicht miteinander vermischt auf, sondern in klar ausgeprägten und definierten Regionen des menschlichen Körpers. Für die Existenz von D-Haar Fasern im Menschen fehlt nach wie vor ein direkter Nachweis. Mikroneurographische Untersuchungen ließen die Existenz von niedrig-schwelligem A δ -Fasern im Menschen zwar vermuten (Adriaensen et al., 1983). Gleichwohl wurde diese Studie nicht mit der ausreichenden Genauigkeit durchgeführt um hieraus schließen zu können, ob die untersuchten Fasern identisch mit D-Haar Fasern sind (Abraira and Ginty, 2013; Lechner and Lewin, 2013). Insofern ist auch die Frage der Expression von KCNQ2 und -3 in Nervenendigungen um Haarfollikel in menschlicher Haut noch nicht geklärt. Demgegenüber besitzt KCNQ4 in menschlicher Haut ein vergleichbares Expressionsmuster wie in der Haut von Mäusen (Heidenreich et al., 2011).

Die Identifikation von KCNQ2 und -3 in D-Haar Fasern der Maus beschreibt demnach eine komplett neue und zusätzliche Funktion dieser Kanäle bei Prozessen der Tastempfindung, und zeigt auf physiologischer Ebene, dass KCNQ Proteine neuronale Sensitivität direkt an den jeweiligen sensorischen Nervenendigungen steuern können (siehe hierzu auch Kapitel 5.3).

5.3 KCNQ Kanäle und Mechanotransduktion

Sowohl KCNQ2 als auch KCNQ3 konnten in D-Haar Fasern beschrieben werden. Ferner konnte KCNQ3 auch peripher in den lanzettförmigen D-Haar Nervenendigungen an Haarfollikeln detektiert werden. Dadurch lokalisiert KCNQ3 direkt an der Stelle, wo die mechanoelektrische Transduktion stattfindet (Hu et al., 2010). Dies ermöglicht KCNQ3 die unmittelbare Beeinflussung der Mechanotransduktion und Regulation der Transformation eines Rezeptorpotentials in eine bestimmte Abfolge von Aktionspotentialen. Eine vergleichbare Lokalisation wurde bereits für die Expression von KCNQ4 in den zirkulären und lanzettförmigen Nervenendigungen schnell-adaptierender niedrig-schwelliger Mechanorezeptoren beschrieben (Heidenreich et al., 2012). Während KCNQ4 Kanäle hier die Erregbarkeit von RAMs kontrollieren, nimmt KCNQ3 die entsprechende Funktion in D-Haar

Fasern wahr. Allerdings konnte gezeigt werden, dass KCNQ Kanäle selbst keine Mechanosensitivität besitzen (Hammami et al., 2009; Heidenreich et al., 2012).

Kürzlich wurde die Theorie aufgestellt, dass die Mechanosensitivität der lanzettförmigen Nervenendigungen auf einem Mechanismus beruht, der vergleichbar der über Tip-Links verbundenen Stereovilli in Haarzellen der Cochlea im auditorischen System funktioniert (LeMasurier and Gillespie, 2005). Es wurde gezeigt, dass die epitheliale Zellmembran von Haarfollikeln über eine Vielzahl an Hemi-desmosomen verfügt, die über feine Filamentstrukturen mit den lanzettförmigen Nervenendigungen von LTMRs verbunden sind (Li and Ginty, 2014). Laut dieser Theorie könnten diese Verbindungen dazu dienen, mechanische Kraft von den Haaren auf die mechanosensitiven Ionenkanäle der assoziierten Nervenendigungen zu übertragen (Zimmerman et al., 2014).

Eine Vielzahl von Ionenkanälen ist im sensorischen System an der Entstehung und Modulierung des Rezeptorpotentials beteiligt (Lumpkin and Caterina, 2007). Mitglieder der DEG/ENaC Kanäle, der TRP Kanäle, sowie der K_{2P} Kanäle gelten hier als Kandidaten für potenzielle Mechanotransduktionskanäle (Gillespie and Walker, 2001; Lumpkin and Caterina, 2007; Chalfie, 2009; Arnadóttir and Chalfie, 2010; Brierley, 2010; Del Valle et al., 2012; Eijkelkamp et al., 2013). Insbesondere aber auch Piezo Proteine wurden als mechanisch aktivierbare Ionenkanäle identifiziert (Coste et al., 2010, 2012), die z.B. für die Mechanotransduktion in Merkel Zell-Neurit Komplexen benötigt werden (Ikeda et al., 2014; Maksimovic et al., 2014; Woo et al., 2014). Auch weitere Ionenkanäle lassen sich bestimmten sensorischen Endorganen zuordnen. So gelten die spannungsgesteuerten Na^+ Kanäle $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ als Nozizeptor-spezifisch (Akopian et al., 1996; Dib-Hajj et al., 1998, 2002; Fang et al., 2002; Djouhri et al., 2003). Die Expression von KCNQ4 im somatosensorischen System bleibt auf schnell-adaptierende niedrig-schwellige Mechanorezeptoren beschränkt (Heidenreich et al., 2012), und der spannungsgesteuerte Ca^{2+} Kanal $Ca_v3.2$ konnte als ein spezifischer Ionenkanal für D-Haar Fasern gezeigt werden (Shin et al., 2003; Wang and Lewin, 2011). Während $Ca_v3.2$ Kanäle in den peripheren Nervenendigungen allerdings als Art Verstärker insbesondere die hohe Sensitivität von D-Haar Fasern sowie die Wahrnehmung kleiner sich bewegender Stimuli bewirken (Wang and Lewin, 2011), konnte für KCNQ3 eine zu $Ca_v3.2$ gegensätzliche Funktion beschrieben werden. KCNQ3 Kanäle wirken demnach einer übermäßigen Aktivität der D-Haar Mechanorezeptoren entgegen, und fungieren entsprechend als Art Bremse (Soldovieri et al., 2011). Dies lässt sich darauf zurückführen,

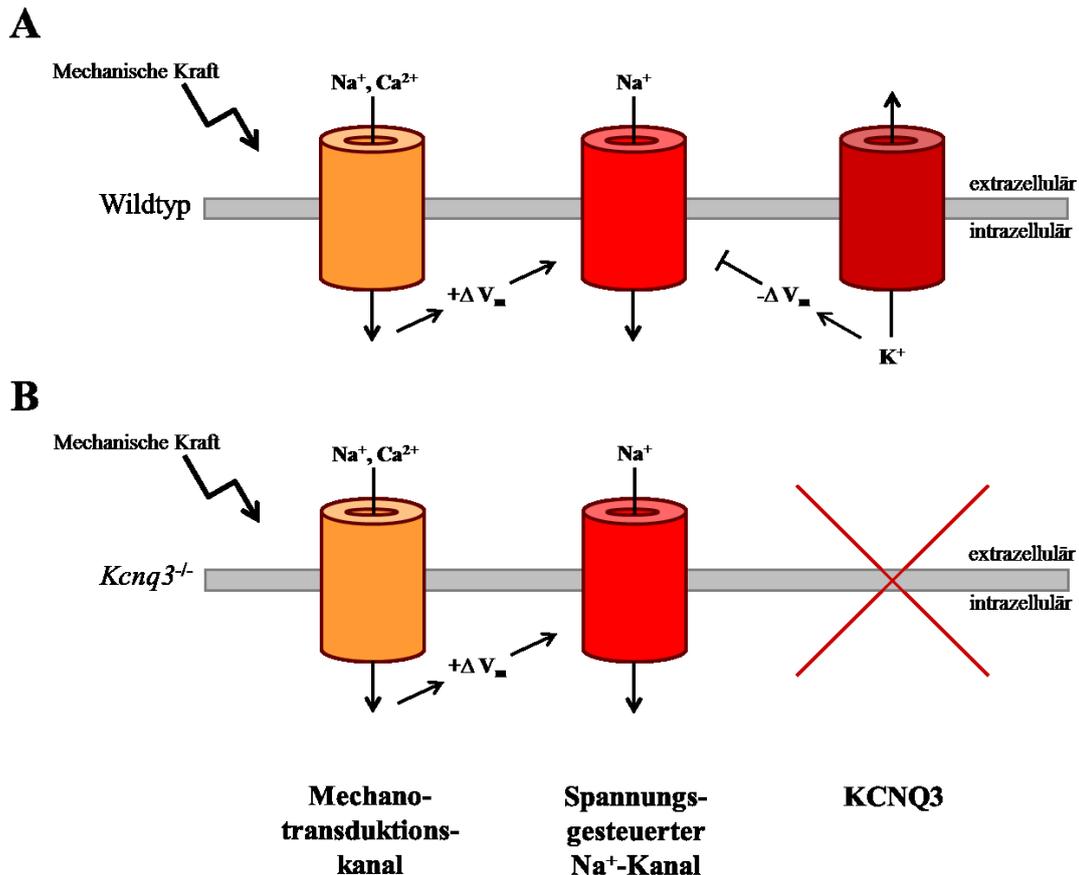


Abbildung 42 | Schematisches Modell zur KCNQ3-abhängigen Verminderung der D-Haar Erregbarkeit

(A) Unter Wildtyp Bedingungen hyperpolarisiert KCNQ3 das Ruhemembranpotential ($-\Delta V_m$), und wirkt dadurch Mechanotransduktionskanälen entgegen, die für die Entstehung des Rezeptorpotentials verantwortlich sind ($+\Delta V_m$). Die Wirkung von KCNQ3 erschwert folglich die Aktivierung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle. (B) Im *Kcnq3*^{-/-} Mausmodell führt das Fehlen von KCNQ3-Ionenkanälen dagegen zu einer ungehinderten Wirkung von Mechanotransduktionskanälen, was letztlich das Erreichen des Aktionspotential-Schwellenwertes erleichtert. (modifiziert nach einem Modell aus Munns and Caterina, 2012)

dass KCNQ Kanäle sich bei negativen Membranpotentialen in einem bereits teilweise geöffneten Zustand befinden und nicht-inaktivierend sind. Diese Eigenschaft trägt letztlich mit zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei. Das Fehlen von KCNQ Kanälen führt dagegen zu einem depolarisierteren Ruhemembranpotential, welches sich folglich näher am Aktionspotential-Schwellenwert befindet. Dies erklärt die hier beobachtete erhöhte Sensitivität von D-Haar Fasern im *Kcnq3*^{-/-} bzw. von RAMs im *Kcnq4*^{-/-} und *Kcnq4*^{dn/dn} (Heidenreich et al., 2012) Mausmodell und ist schematisch in Abbildung 42 dargestellt. Der KCNQ2/3-abhängige Effekt trat zudem jeweils vermehrt gegen Ende der mechanischen Rampen auf, was der verhältnismäßig langsamen Aktivierung von KCNQ Kanälen entspricht. Interessanterweise

war der Effekt von KCNQ2 und -3 bei langsameren Rampengeschwindigkeiten am Ausgeprägtesten. Eine vergleichbare Wirkung erzielte auch KCNQ4 in RAMs (Heidenreich et al., 2012). In den entsprechenden KCNQ4 Mausmodellen zeigte sich demnach vornehmlich bei niedrigen jedoch nicht bei hohen Vibrations-Frequenzen eine erhöhte Mechanosensitivität. Diese Effekte lassen sich dadurch erklären, dass bei langsamen Stimulations-Geschwindigkeiten / -Frequenzen die Auswirkungen KCNQ-abhängiger konduktiver Ströme am Ausgeprägtesten sind. Bei höheren Stimulationsreizen nimmt dagegen die Bedeutung kapazitiver Ströme zu. Dies mag letztlich der Grund für die Abnahme des KCNQ2/KCNQ3 bzw. KCNQ4 Effekts bei schnelleren mechanischen Stimulationsrampen bzw. höheren Frequenzen sein.

Schließlich stellt sich hier auch die Frage der generellen Bedeutung der KCNQ2 und -3 Kanäle für das D-Haar-vermittelte Tastverhalten. So könnte man annehmen, dass eine erhöhte Tastempfindung aufgrund des Fehlens dieser Kalium-Ionenkanäle einen evolutionären Vorteil bedeuten würde. Warum gibt die Natur also den Vorteil einer höheren Tastsensitivität zugunsten der Expression von KCNQ2 und -3 auf? Es lässt sich spekulieren, dass eine höhere Tastsensitivität nicht zwangsläufig auch von Vorteil sein muss. Dies würde ja bedeuten, dass die ohnehin schon sensitivsten Tastrezeptoren noch empfindlicher werden. Bereits die sanfteste Stimulation der entsprechenden Haare würde dann zu einer überproportional starken Reizantwort mit viel intensiverer Wahrnehmung führen. Dies würde bedeuten, dass Reiz und Wahrnehmung nicht mehr im richtigen Verhältnis zueinander stehen. Letztlich kann davon ausgegangen werden, dass die ‚bremsende‘ Wirkung von KCNQ Kanälen insgesamt von Vorteil für eine adäquate Reizwahrnehmung in D-Haar Fasern sein muss.

Eine KCNQ-vermittelte Übererregbarkeit von D-Haar Fasern könnte allerdings auch physiologisch durch eine intrazelluläre Signalkaskade zustande kommen. KCNQ Kanäle lassen sich demnach indirekt über die Aktivierung vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren hemmen (Mechanismus hierzu siehe Einleitung Kapitel 1.1.3). Neben dem muskarinischen Acetylcholin Rezeptor mAChR zählen hierzu auch die metabotropen Glutamaterezeptoren mGluR-1 und -5, der Histaminrezeptor H1, der Serotoninrezeptor 5-HT_{2C}, die Nukleotidrezeptoren P2Y_{1,2,4,6}, sowie die Peptidrezeptoren für Gonadoliberin (GnRH), Substanz P, Bradykinin und Angiotensin (Marrion, 1997; Brown and Passmore, 2009). Die Aktivierung eines in D-Haar Fasern exprimierten G-Protein gekoppelten Rezeptors würde letztlich als Nebeneffekt zu einer erhöhten Tastsensitivität führen. Gleichwohl konnte bisher kein G-Protein gekoppelter Rezeptor speziell in D-Haar Fasern nachgewiesen werden.

5.4 Das KCNQ5 KO Mausmodell als nützliches Hilfsmittel zur Aufklärung der Lokalisation und physiologischen Funktion von KCNQ5

KCNQ5 stellt die einzige KCNQ Untereinheit dar, mit der bisher keine humanen Krankheiten assoziiert werden konnten. Im Vergleich zu den anderen neuronalen KCNQ Untereinheiten wurde der Expression von KCNQ5 im somatosensorischen System bisher erst relativ wenig Beachtung beigemessen. Zwar konnte die Existenz von KCNQ5 in unterschiedlich großen DRG Neuronen bereits 2003 nachgewiesen werden (Passmore et al., 2003). Trotzdem dauerte es aber bis ins Jahr 2011 bis eine Studie die Lokalisation von KCNQ5 in nozizeptiven C-Fasern postulierte (King and Scherer, 2011). In dieser Publikation wurde KCNQ5 als die hauptsächliche KCNQ Untereinheit in diesen Fasern dargestellt, während die Expression von KCNQ2 in großen, myelinisierten, nicht nozizeptiven Fasern beschrieben wurde. Dieses Ergebnis blieb umstritten, da im gleichen Jahr eine weitere Studie KCNQ2 und nicht KCNQ5 als den primären KCNQ Kanal in kleinen, nozizeptiven DRG Neuronen entdeckte (Rose et al., 2011). Die zu diesen Aussagen führenden Ergebnisse beruhten allerdings ausschließlich auf nicht knock-out kontrollierten immunhistochemischen Untersuchungen. Die Generierung eines konstitutiven KCNQ5 KO Mausmodells im Rahmen dieser Arbeit diente dem Ziel der Erleichterung der eindeutigen Lokalisation von KCNQ5. So stellt ein entsprechendes knock-out Modell stets den Gold-Standard der Negativ-Kontrolle dar.

Das Einfügen zweier Stopcodons in Exon 6 des *Kcnq5* Gens führte nachweislich zum Verlust des KCNQ5 Proteins in *Kcnq5*^{-/-} Mäusen. Gleichwohl konnte in DRG Schnitten dieser Tiere mit den uns zur Verfügung stehenden Antikörpern eine Restfärbung festgestellt werden. In Kontroll-Gewebe mit bekanntem KCNQ5 Expressionsmuster wie dem Innenohr (Kharkovets et al., 2006; Spitzmaul et al., 2013) und dem Gehirn (Schroeder et al., 2000a; Tzingounis et al., 2010) war dagegen in *Kcnq5*^{-/-} Mäusen immunhistochemisch kein KCNQ5 Protein mehr detektierbar. Im Umkehrschluss legt dies nahe, dass der KCNQ5 Antikörper in DRG Schnitten demnach eine unspezifische Färbung verursacht haben muss. Alternative Methoden der Gewebepreparation und Antigen-Zurückgewinnung, sowie unterschiedliche Antikörper gegen verschiedene Epitope des KCNQ5 Proteins erzielten insgesamt keine Verbesserung der immunhistochemischen Färbungen. Auch der in King and Scherer (2011) verwendete, kommerzielle KCNQ5 Antikörper wurde hier getestet. Gleichwohl erbrachte auch

dieser Antikörper weder auf Maus DRG Schnitten, noch auf Kontroll-Gehirn und Innenohr Geweben eine spezifische Färbung (Tabelle 13).

Aufgrund der unspezifischen Bindeeigenschaften der getesteten KCNQ5 Antikörper wurde für die hier durchgeführten Studien auf *in situ* Hybridisierungen zurückgegriffen. Gewebe von *Kcnq5*^{-/-} Mäusen konnte die Spezifität dieser Methode bestätigen. Der Großteil der KCNQ5 Expression konnte infolgedessen in myelinisierten DRG Neuronen detektiert werden. Jedoch konnte weder in D-Haar Fasern noch in Nozizeptoren (siehe hierzu auch Kapitel 5.5) oder Propriozeptoren KCNQ5 Expression gezeigt werden. Darüber hinaus legten pharmakologische Untersuchungen nahe, dass sich abgesehen von der in RA A β -Fasern befindlichen KCNQ4 Untereinheit keine weiteren KCNQ Untereinheiten in A β -Fasern befinden (Heidenreich et al., 2011). Zusammengefasst schließen diese Ergebnisse die Expression von KCNQ5 praktisch in allen verschiedenen Klassen von sensorischen Nerven aus. Jedoch gilt die Expression von KCNQ5 in DRGs als gesichert (Passmore et al., 2003). Dies konnte ferner auch durch *in situ* Hybridisierungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, wobei KCNQ5 offensichtlich in einer relativ kleinen Population von DRG Neuronen exprimiert wird. Ähnlich der spezifischen Expression von KCNQ4 in RAI A β -Fasern (Heidenreich et al., 2011), scheint dies offensichtlich eine kleine und klar abgegrenzte Unterpopulation eines bestimmten Fasertyps zu sein. Weitere Ko-Lokalisationsstudien mit entsprechenden Markerproteinen werden folglich zur Aufklärung der exakten Expression von KCNQ5 nötig sein.

5.5 KCNQ Kanäle und Schmerz: KCNQ2/3 vs. KCNQ5

Schon früh wurden KCNQ Kanäle mit Nozizeption in Verbindung gebracht. Bereits 1995 konnte demnach in sympathischen Neuronen die Inhibition des M-Stroms durch das inflammatorisch wirkende Bradykinin gezeigt werden (Jones et al., 1995). Das gleiche inhibitorische Prinzip konnte anschließend auch in kleinen nozizeptiven DRG Neuronen entdeckt werden (Liu et al., 2010). Die Aktivierung dieses G-Protein gekoppelten B₂-Rezeptors bewirkt eine Depolarisation und erhöhtes Feuern in den entsprechenden nozizeptiven Fasern. Die Beobachtung der Schmerzlinderung durch das KCNQ Kanal aktivierende Retigabine (Blackburn-Munro and Jensen, 2003; Liu et al., 2010), sowie die Schmerz-initiiierende Wirkung des KCNQ Kanal Inhibitors XE991 (Linley et al., 2008; Liu et al., 2010) implizierten eine regulatorische Funktion von KCNQ Kanälen in nozizeptiven

sensorischen Neuronen. In der Tat konnte sowohl der M-Strom als auch die ihm zugrunde liegenden molekularen Bestandteile KCNQ2, -3 und -5 in kleinen, Capsaicin-sensitiven, nozizeptiven DRG Neuronen detektiert werden (Passmore et al., 2003). Eine Vielzahl weiterer Studien untersuchte den M-Strom bzw. KCNQ Kanäle in nozizeptiven DRG Fasern. So führte die selektive Aktivierung des in kleinen, IB₄-positiven, nicht-peptidergen Nozizeptoren exprimierten Mas-verwandten G-Protein gekoppelten Rezeptors D (MrgD) zur Hemmung der M-Strom Aktivität, und infolgedessen zu einer erhöhten Erregung primär afferenter nozizeptiver Neurone (Crozier et al., 2007). Auch die Aktivierung eines weiteren in Nozizeptoren weit verbreiteten G-Protein gekoppelten Rezeptors, des Protease-aktivierten Rezeptors 2 (PAR-2), führte zur Inhibition des M-Stroms (Linley et al., 2008).

Verschiedene Fasertypen sind für die Perzeption von Schmerz in der Peripherie verantwortlich. So wird A δ -Nozizeptoren der gut lokalisierte erste Schmerz bzw. „schnelle“ Schmerz zugeordnet, während C-Faser Nozizeptoren den schlecht lokalisierten „zweiten“ Schmerz übermitteln, auch langsamer Schmerz genannt (Basbaum et al., 2009). Die Expression von KCNQ Kanälen konnte in beiden dieser Nozizeptor Populationen nachgewiesen werden (Lang et al., 2008; King and Scherer, 2011; Rose et al., 2011; Passmore et al., 2012; Vetter et al., 2013). Dies steht in Einklang zu den anfänglichen Untersuchungen von Passmore et al. (2003), in denen KCNQ Kanäle in unterschiedlich großen sensorischen DRG Neuronen detektiert werden konnten.

In dieser Arbeit konnte KCNQ3 in einer bestimmten Population von DRG Neuronen beschrieben werden, die aufgrund der Ko-Lokalisation mit TRPV1 und Na_v1.8 als Nozizeptoren identifiziert wurden (Akopian et al., 1996; Sangameswaran et al., 1996; Caterina et al., 1997, 2000; Caterina and Julius, 2001; Djouhri et al., 2003; Agarwal et al., 2004). Wie bereits beschrieben deutet die fast ausnahmslose Ko-Expression von KCNQ3 sowohl mit NF200 als auch mit KCNQ2 auf die gemeinsame Expression von KCNQ2 und -3 in myelinisierten Neuronen hin. Zusammengefasst lässt dies auf die Lokalisation von KCNQ2 und -3 in nozizeptiven A δ -Fasern (AMs) schließen. Dies steht in Einklang zu einer Vielzahl an Studien, die KCNQ2 und -3 allgemein an Ranvierschen Schnürringen myelinisierter Neuronen (Devaux et al., 2004; Pan et al., 2006; Schwarz et al., 2006) sowie myelinisierter A δ -Faser Neuronen (Passmore et al., 2012; King et al., 2014) detektieren konnten. Elektrophysiologische Haut-Nerv Messungen im Rahmen meiner Arbeit konnten allerdings als Reaktion auf mechanische Stimulation keinen signifikanten Unterschied im Feuerverhalten von *Kcnq3*^{-/-} und Wildtyp A δ -Faser Nozizeptoren aufzeigen. Dies mag an der

kompensatorischen Wirkung von KCNQ2 liegen, welches im KCNQ3 KO nahezu unverändert exprimiert wird (Soh et al., 2014). Dies ließe sich durch entsprechende Doppel KO Mausmodelle mit konditionaler KCNQ2 Deletion umgehen (potenzielle Mausmodellen siehe Kapitel 5.2).

Im Gegensatz zu KCNQ3 konnte KCNQ5 nicht in Na_v1.8-exprimierenden DRG Neuronen detektiert werden. Da Na_v1.8 lediglich einer mehrerer möglicher nozizeptiver Marker darstellt, kann daraus nicht zwangsläufig abgeleitet werden, dass KCNQ5 sich nicht in nozizeptiven Neuronen befindet. Es zeigte sich, dass ungefähr 20% der KCNQ5 Expression in NF200-negativen, und demnach unmyelinisierten Neuronen lokalisiert. Dies lässt KCNQ5 in unmyelinisierten C-Fasern vermuten. In elektrophysiologischen Haut-Nerv Ableitungen zeigte sich in C-Fasern eine leicht erhöhte Feuerfrequenz bei *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen, die allerdings nicht signifikant war. Dies mag daran liegen, dass sich C-Fasern mit den Möglichkeiten des in unserem Labor installierten Messplatzes für Haut-Nerv Präparationen nicht weiter differenzieren lassen, sodass hier die Gesamtheit der sehr heterogenen C-Faser Population abgeleitet wird. Mit der Haut-Nerv Präparation konnten in unserem Labor lediglich die langsam leitenden C-Fasern und die mit mittlerer Geschwindigkeit leitenden AM-Nozizeptoren unterschieden werden. Dies stellt einen limitierenden Faktor für Haut-Nerv Messungen an nozizeptiven Fasern dar, besitzen Nozizeptoren doch unterschiedliche Sensitivitäten für verschiedene Reize wie Hitze, Kälte, sowie mechanische und chemische Stimulationen (Julius and Basbaum, 2001; Lewin and Moshourab, 2004; Basbaum et al., 2009; Smith and Lewin, 2009; Dubin and Patapoutian, 2010). So besteht durchaus auch die Möglichkeit, dass sich KCNQ Kanäle lediglich in einer spezialisierten Subpopulation nozizeptiver Fasern befinden, die hier allerdings nicht weiter aufgegliedert werden konnte. Ließen sich C-Fasern mit Hilfe der Haut-Nerv Präparation in klar abgegrenzte nozizeptive Subpopulationen unterscheiden sowie spezifisch ableiten, könnte die oben beschriebene Tendenz einer erhöhten Feuerfrequenz in C-Fasern von *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen durchaus zu einem signifikanten Effekt werden.

Zusätzlich konnte der Aesthesiometer-Test in *Kcnq5^{dn/dn}* Mäusen einen signifikanten Anstieg der Sensitivität auf mechanische Stimuli demonstrieren, wohingegen im Hitzesensitiven Hargreaves-Test kein Unterschied auftrat. Die vermutete Expression von KCNQ5 in unmyelinisierten, nozizeptiven C-Fasern wird ferner auch durch eine Publikation gestützt, die mit Hilfe immunhistochemischer Methoden KCNQ5 in unmyelinisierten Nozizeptoren nachweisen konnte (King and Scherer, 2011). Neben dieser Lokalisation von KCNQ5 in

unmyelinisierten Neuronen zeigte sich allerdings, dass mit ungefähr 80% der Großteil der KCNQ5 Expression sich in myelinisierten, NF200-positiven Neuronen befindet. Zur Identifizierung dieser Zellen bedarf es allerdings weiterführender Versuche.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe Y, Nawa H, Namba H (2009) Activation of epidermal growth factor receptor ErbB1 attenuates inhibitory synaptic development in mouse dentate gyrus. *Neurosci Res* 63:138–148.
- Abraira VE, Ginty DD (2013) The sensory neurons of touch. *Neuron* 79:618–639.
- Adriaensen H, Gybels J, Handwerker HO, Van Hees J (1983) Response properties of thin myelinated (A-delta) fibers in human skin nerves. *J Neurophysiol* 49:111–122.
- Agarwal N, Offermanns S, Kuner R (2004) Conditional gene deletion in primary nociceptive neurons of trigeminal ganglia and dorsal root ganglia. *Genesis* 38:122–129.
- Ahmad S, Dahllund L, Eriksson AB, Hellgren D, Karlsson U, Lund P-E, Meijer IA, Meury L, Mills T, Moody A, Morinville A, Morten J, O'donnell D, Raynoschek C, Salter H, Rouleau GA, Krupp JJ (2007) A stop codon mutation in SCN9A causes lack of pain sensation. *Hum Mol Genet* 16:2114–2121.
- Aiken SP, Lampe BJ, Murphy PA, Brown BS (1995) Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. *Br J Pharmacol* 115:1163–1168.
- Airaksinen MS, Koltzenburg M, Lewin GR, Masu Y, Helbig C, Wolf E, Brem G, Toyka KV, Thoenen H, Meyer M (1996) Specific Subtypes of Cutaneous Mechanoreceptors Require Neurotrophin-3 Following Peripheral Target Innervation. *Neuron* 16:287–295.
- Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379:257–262.
- Alaimo A, Gómez-Posada JC, Aivar P, Etxeberria A, Rodriguez-Alfaro JA, Areso P, Villarroel A (2009) Calmodulin activation limits the rate of KCNQ2 K⁺ channel exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 284:20668–20675.
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, Duprat F, Noël J, Chemin J, Guy N, Blondeau N, Voilley N, Rubat-Coudert C, Borsotto M, Romey G, Heurteaux C, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2006) TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25:2368–2376.
- Aristoteles (n.d.) Über die Seele. *De anima*.
- Arnadóttir J, Chalfie M (2010) Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys* 39:111–137.
- Averill S, McMahon SB, Clary DO, Reichardt LF, Priestley JV (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 7:1484–1494.

- Baker MD (2005) Protein kinase C mediates up-regulation of tetrodotoxin-resistant, persistent Na⁺ current in rat and mouse sensory neurones. *J Physiol (Lond)* 567:851–867.
- Baker MD, Chandra SY, Ding Y, Waxman SG, Wood JN (2003) GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na⁺ current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensory neurones. *J Physiol (Lond)* 548:373–382.
- Bal M, Zhang J, Zaika O, Hernandez CC, Shapiro MS (2008) Homomeric and heteromeric assembly of KCNQ (Kv7) K⁺ channels assayed by total internal reflection fluorescence/fluorescence resonance energy transfer and patch clamp analysis. *J Biol Chem* 283:30668–30676.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* 384:78–80.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267–284.
- Bautista DM, Lumpkin EA (2011) Perspectives on: Information and coding in mammalian sensory physiology: Probing mammalian touch transduction. *J Gen Physiol* 138:291–301.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt S-E, Julius D (2007) The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208.
- Belloq C, van Ginneken ACG, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MMAM, Baró I, Wilde AAM (2004) Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 109:2394–2397.
- Bentivoglio M, Pacini P (1995) Filippo Pacini: a determined observer. *Brain Res Bull* 38:161–165.
- Bernstein J (1902) Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme.
- Bessou P, Perl ER (1969) Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32:1025–1043.
- Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK (1998) A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279:403–406.
- Biervert C, Steinlein OK (1999) Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum Genet* 104:234–240.
- Blackburn-Munro G, Jensen BS (2003) The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 460:109–116.

- Bofill-Cardona E, Vartian N, Nanoff C, Freissmuth M, Boehm S (2000) Two different signaling mechanisms involved in the excitation of rat sympathetic neurons by uridine nucleotides. *Mol Pharmacol* 57:1165–1172.
- Bolanowski SJ, Zwislocki JJ (1984) Intensity and frequency characteristics of pacinian corpuscles. I. Action potentials. *J Neurophysiol* 51:793–811.
- Boot PMMD, Rowden G, Walsh NFRCP (C) (1992) The Distribution of Merkel Cells in Human Fetal and Adult Skin. [Editorial]. *Journal of Dermatopathology* 14:391–396.
- Boulet IR, Raes AL, Ottschytch N, Snyders DJ (2006) Functional effects of a KCNQ1 mutation associated with the long QT syndrome. *Cardiovasc Res* 70:466–474.
- Bourane S, Garces A, Venteo S, Pattyn A, Hubert T, Fichard A, Puech S, Boukhaddaoui H, Baudet C, Takahashi S, Valmier J, Carroll P (2009) Low-threshold mechanoreceptor subtypes selectively express MafA and are specified by Ret signaling. *Neuron* 64:857–870.
- Brierley SM (2010) Molecular basis of mechanosensitivity. *Auton Neurosci* 153:58–68.
- Brohawn SG, Campbell EB, MacKinnon R (2014a) Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature* 516:126–130.
- Brohawn SG, del Mármol J, MacKinnon R (2012) Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* 335:436–441.
- Brohawn SG, Su Z, MacKinnon R (2014b) Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:3614–3619.
- Brown AG, Iggo A (1967) A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J Physiol (Lond)* 193:707–733.
- Brown DA, Adams PR (1980) Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283:673–676.
- Brown DA, Passmore GM (2009) Neural KCNQ (K_v7) channels. *Br J Pharmacol* 156:1185–1195.
- Brücke E (1843) Beiträge zur Lehre von der diffusion tropfbarflüssiger körper durch poröse Scheidewände.
- Brueggemann LI, Moran CJ, Barakat JA, Yeh JZ, Cribbs LL, Byron KL (2007) Vasopressin stimulates action potential firing by protein kinase C-dependent inhibition of KCNQ5 in A7r5 rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1352–H1363.
- Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M, Patapoutian A (2015) Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife* 4.

- Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001) Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* 85:1561–1574.
- Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE (1988) Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* 32:89–94.
- Castaldo P, del Giudice EM, Coppola G, Pascotto A, Annunziato L, Tagliatalata M (2002) Benign familial neonatal convulsions caused by altered gating of KCNQ2/KCNQ3 potassium channels. *J Neurosci* 22:RC199.
- Caterina MJ, Julius D (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487–517.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824.
- Cauna N (1956) Nerve supply and nerve endings in Meissner's corpuscles. *Am J Anat* 99:315–350.
- Cauna N, Mannan G (1958) The structure of human digital Pacinian corpuscles (corpuscula lamellosa) and its functional significance. *J Anat* 92:1–20.4.
- Cauna N, Ross LL (1960) THE FINE STRUCTURE OF MEISSNER'S TOUCH CORPUSCLES OF HUMAN FINGERS. *J Biophys Biochem Cytol* 8:467–482.
- Chalfie M (2009) Neurosensory mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:44–52.
- Chalfie M, Au M (1989) Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science* 243:1027–1033.
- Chambers MR, Andres KH, von Duering M, Iggo A (1972) The structure and function of the slowly adapting type II mechanoreceptor in hairy skin. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 57:417–445.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP, Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288–294.
- Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M (1998) A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet* 18:53–55.
- Chen Y-H et al. (2003) KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 299:251–254.

- Chung HJ, Jan YN, Jan LY (2006) Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8870–8875.
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ, Wang Y, Lawrence D, D’Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N (2007) Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54:379–386.
- Constanti A, Brown DA (1981) M-Currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurones. *Neurosci Lett* 24:289–294.
- Cooper EC (2010) Made for “anchorin”: $K_v7.2/7.3$ (KCNQ2/KCNQ3) channels and the modulation of neuronal excitability in vertebrate axons. *Semin Cell Dev Biol* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940059> [Accessed February 3, 2011].
- Coppola G, Castaldo P, Miraglia del Giudice E, Bellini G, Galasso F, Soldovieri MV, Anzalone L, Sferro C, Annunziato L, Pascotto A, Tagliatela M (2003) A novel KCNQ2 K^+ channel mutation in benign neonatal convulsions and centrotemporal spikes. *Neurology* 61:131–134.
- Copray JC, Mantingh-Otter IJ, Brouwer N (1994) Expression of calcium-binding proteins in the neurotrophin-3-dependent subpopulation of rat embryonic dorsal root ganglion cells in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 81:57–65.
- Coste B, Crest M, Delmas P (2007) Pharmacological dissection and distribution of $Na_v1.9$, T-type Ca^{2+} currents, and mechanically activated cation currents in different populations of DRG neurons. *J Gen Physiol* 129:57–77.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330:55–60.
- Coste B, Osorio N, Padilla F, Crest M, Delmas P (2004) Gating and modulation of presumptive $Na_v1.9$ channels in enteric and spinal sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 26:123–134.
- Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M, Patapoutian A (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483:176–181.
- Coucke PJ et al. (1999) Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum Mol Genet* 8:1321–1328.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444:894–898.
- Crawford AC, Fettiplace R (1985) The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *J Physiol (Lond)* 364:359–379.

- Cronk KM, Wilkinson GA, Grimes R, Wheeler EF, Jhaveri S, Fundin BT, Silos-Santiago I, Tessarollo L, Reichardt LF, Rice FL (2002) Diverse dependencies of developing Merkel innervation on the *trkA* and both full-length and truncated isoforms of *trkC*. *Development* 129:3739–3750.
- Crozier RA, Ajit SK, Kaftan EJ, Pausch MH (2007) MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. *J Neurosci* 27:4492–4496.
- Cruzblanca H, Koh DS, Hille B (1998) Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca^{2+} release from IP₃-sensitive Ca^{2+} stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7151–7156.
- Dahimène S, Alcoléa S, Naud P, Jourdon P, Escande D, Brasseur R, Thomas A, Baró I, Mérot J (2006) The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome. *Circ Res* 99:1076–1083.
- Darian-Smith I, Johnson KO, Dykes R (1973) “Cold” fiber population innervating palmar and digital skin of the monkey: responses to cooling pulses. *J Neurophysiol* 36:325–346.
- Dedek K, Kunath B, Kananura C, Reuner U, Jentsch TJ, Steinlein OK (2001) Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K^+ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12272–12277.
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242–245.
- Delmas P, Brown DA (2005) Pathways modulating neural KCNQ/M (K_v7) potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 6:850–862.
- Delmas P, Hao J, Rodat-Despoix L (2011) Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nat Rev Neurosci* 12:139–153.
- Del Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA (2012) Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. *Microsc Res Tech* 75:1033–1043.
- Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS (2004) KCNQ2 is a nodal K^+ channel. *J Neurosci* 24:1236–1244.
- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A (2007) TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54:371–378.
- Dib-Hajj S, Black JA, Cummins TR, Waxman SG (2002) NaN/Na_v1.9: a sodium channel with unique properties. *Trends Neurosci* 25:253–259.
- Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG (1998) NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8963–8968.

- Dirajlal S, Pauers LE, Stucky CL (2003) Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J Neurophysiol* 89:513–524.
- Djoughri L, Fang X, Okuse K, Wood JN, Berry CM, Lawson SN (2003) The TTX-resistant sodium channel Na_v1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol (Lond)* 550:739–752.
- Djoughri L, Lawson SN (2004) Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46:131–145.
- Douglas WW, Ritchie JM (1957) Nonmedullated fibres in the saphenous nerve which signal touch. *J Physiol (Lond)* 139:385–399.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69–77.
- Drenth JPH, Waxman SG (2007) Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders. *J Clin Invest* 117:3603–3609.
- Drew LJ, Rohrer DK, Price MP, Blaver KE, Cockayne DA, Cesare P, Wood JN (2004) Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J Physiol (Lond)* 556:691–710.
- Drew LJ, Wood JN (2007) FM1-43 is a permeant blocker of mechanosensitive ion channels in sensory neurons and inhibits behavioural responses to mechanical stimuli. *Mol Pain* 3:1.
- Drew LJ, Wood JN, Cesare P (2002) Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and -insensitive sensory neurons. *J Neurosci* 22:RC228.
- Driscoll M, Chalfie M (1991) The mec-4 gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349:588–593.
- Dry JW (1926) The coat of the mouse (*Mus musculus*). *J Genet* 16:287–340.
- Dubin AE, Patapoutian A (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120:3760–3772.
- Edin BB (1992) Quantitative analysis of static strain sensitivity in human mechanoreceptors from hairy skin. *J Neurophysiol* 67:1105–1113.
- Eijkelkamp N, Quick K, Wood JN (2013) Transient receptor potential channels and mechanosensation. *Annu Rev Neurosci* 36:519–546.
- Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R (1994) Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77:503–512.

- Ettxeberria A, Aivar P, Rodriguez-Alfaro JA, Alaimo A, Villacé P, Gómez-Posada JC, Areso P, Villarroel A (2008) Calmodulin regulates the trafficking of KCNQ2 potassium channels. *FASEB J* 22:1135–1143.
- Fache M-P, Moussif A, Fernandes F, Giraud P, Garrido JJ, Dargent B (2004) Endocytotic elimination and domain-selective tethering constitute a potential mechanism of protein segregation at the axonal initial segment. *J Cell Biol* 166:571–578.
- Fagan BM, Cahusac PM (2001) Evidence for glutamate receptor mediated transmission at mechanoreceptors in the skin. *Neuroreport* 12:341–347.
- Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Lawson SN (2002) The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na_v1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 22:7425–7433.
- Fidzinski P, Korotkova T, Heidenreich M, Maier N, Schuetze S, Kobler O, Zuschratter W, Schmitz D, Ponomarenko A, Jentsch TJ (2015) KCNQ5 K⁺ channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. *Nat Commun* 6:6254.
- Fleischer E, Handwerker HO, Joukhadar S (1983) Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. *Brain Res* 267:81–92.
- Fleming MS, Luo W (2013) The anatomy, function, and development of mammalian A β low-threshold mechanoreceptors. *Front Biol (Beijing)* 8.
- Franqueza L, Lin M, Shen J, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC (1999) Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with minK subunits. *J Biol Chem* 274:21063–21070.
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452–458.
- Fundin BT, Silos-Santiago I, Ernfors P, Fagan AM, Aldskogius H, DeChiara TM, Phillips HS, Barbacid M, Yancopoulos GD, Rice FL (1997) Differential dependency of cutaneous mechanoreceptors on neurotrophins, trk receptors, and P75 LNGFR. *Dev Biol* 190:94–116.
- Gamper N, Li Y, Shapiro MS (2005) Structural requirements for differential sensitivity of KCNQ K⁺ channels to modulation by Ca²⁺/calmodulin. *Mol Biol Cell* 16:3538–3551.
- Gamper N, Shapiro MS (2003) Calmodulin mediates Ca²⁺-dependent modulation of M-type K⁺ channels. *J Gen Physiol* 122:17–31.
- Garell PC, McGillis SL, Greenspan JD (1996) Mechanical response properties of nociceptors innervating feline hairy skin. *J Neurophysiol* 75:1177–1189.
- Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache M-P, Debanne D, Dargent B (2003) A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300:2091–2094.

- Gillespie PG, Walker RG (2001) Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 413:194–202.
- Goldberg YP et al. (2007) Loss-of-function mutations in the $Na_v1.7$ gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet* 71:311–319.
- Gómez-Posada JC, Etxeberria A, Roura-Ferrer M, Areso P, Masin M, Murrell-Lagnado RD, Villarroel A (2010) A pore residue of the KCNQ3 potassium M-channel subunit controls surface expression. *J Neurosci* 30:9316–9323.
- Goodman MB (2006) Mechanosensation. *WormBook*:1–14.
- Goodman MB, Ernstrom GG, Chelur DS, O'Hagan R, Yao CA, Chalfie M (2002) MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENaC channels needed for mechanosensation. *Nature* 415:1039–1042.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547–5551.
- Gu J, Polak JM, Tapia FJ, Marangos PJ, Pearse AG (1981) Neuron-specific enolase in the Merkel cells of mammalian skin. *American Journal of Pathology* 104:63–68.
- Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF (2005) $K_v7/KCNQ/M$ and HCN/h , but not $KCa2/SK$ channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol (Lond)* 566:689–715.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473–508.
- Haeberle H, Fujiwara M, Chuang J, Medina MM, Panditrao MV, Bechstet S, Howard J, Lumpkin EA (2004) Molecular profiling reveals synaptic release machinery in Merkel cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14503–14508.
- Haitin Y, Attali B (2008) The C-terminus of K_v7 channels: a multifunctional module. *J Physiol (Lond)* 586:1803–1810.
- Halata Z (1977) The ultrastructure of the sensory nerve endings in the articular capsule of the knee joint of the domestic cat (Ruffini corpuscles and Pacinian corpuscles). *J Anat* 124:717–729.
- Halata Z, Grim M, Bauman KI (2003) Friedrich Sigmund Merkel and his “Merkel cell”, morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 271:225–239.
- Halliwel JV, Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250:71–92.

- Hammami S, Willumsen NJ, Olsen HL, Morera FJ, Latorre R, Klaerke DA (2009) Cell volume and membrane stretch independently control K^+ channel activity. *J Physiol (Lond)* 587:2225–2231.
- Hansen HH, Waroux O, Seutin V, Jentsch TJ, Aznar S, Mikkelsen JD (2008) K_v7 channels: interaction with dopaminergic and serotonergic neurotransmission in the CNS. *J Physiol (Lond)* 586:1823–1832.
- Hao J, Bonnet C, Amsalem M, Ruel J, Delmas P (2015) Transduction and encoding sensory information by skin mechanoreceptors. *Pflügers Arch* 467:109–119.
- Hao J, Delmas P (2010) Multiple desensitization mechanisms of mechanotransducer channels shape firing of mechanosensory neurons. *J Neurosci* 30:13384–13395.
- Hao J, Padilla F, Dandonneau M, Lavebratt C, Lesage F, Noël J, Delmas P (2013) $K_v1.1$ channels act as mechanical brake in the senses of touch and pain. *Neuron* 77:899–914.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88.
- Harmar AJ et al. (2009) IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res* 37:D680–D685.
- Hart IK, Maddison P, Newsom-Davis J, Vincent A, Mills KR (2002) Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability. *Brain* 125:1887–1895.
- Hartschuh W, Weihe E (1980) Fine structural analysis of the synaptic junction of Merkel cell-axon-complexes. *J Invest Dermatol* 75:159–165.
- Hartschuh W, Weihe E, Egner U (1990) Electron microscopic immunogold cytochemistry reveals chromogranin A confined to secretory granules of porcine Merkel cells. *Neuroscience Letters* 116:245–249.
- Heidenreich M, Lechner SG, Vardanyan V, Wetzel C, Cremers CW, De Leenheer EM, Aránguez G, Moreno-Pelayo MÁ, Jentsch TJ, Lewin GR (2011) $KCNQ4$ K^+ channels tune mechanoreceptors for normal touch sensation in mouse and man. *Nature Neuroscience* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101641> [Accessed November 23, 2011].
- Heidenreich M, Lechner SG, Vardanyan V, Wetzel C, Cremers CW, De Leenheer EM, Aránguez G, Moreno-Pelayo MÁ, Jentsch TJ, Lewin GR (2012) $KCNQ4$ K^+ channels tune mechanoreceptors for normal touch sensation in mouse and man. *Nat Neurosci* 15:138–145.
- Hilaire C, Lucas O, Valmier J, Scamps F (2012) Neurotrophin-4 modulates the mechanotransducer $Ca_v3.2$ T-type calcium current in mice down-hair neurons. *Biochem J* 441:463–471.
- Hildebrand MS, Tack D, McMordie SJ, DeLuca A, Hur IA, Nishimura C, Huygen P, Casavant TL, Smith RJH (2008) Audioprofile-directed screening identifies novel mutations in $KCNQ4$ causing hearing loss at the DFNA2 locus. *Genet Med* 10:797–804.

- Hille B (1988) Ionic Channels: Molecular Pores of Excitable Membranes.
- Hirose S, Zenri F, Akiyoshi H, Fukuma G, Iwata H, Inoue T, Yonetani M, Tsutsumi M, Muranaka H, Kurokawa T, Hanai T, Wada K, Kaneko S, Mitsudome A (2000) A novel mutation of KCNQ3 (c.925T-->C) in a Japanese family with benign familial neonatal convulsions. *Ann Neurol* 47:822–826.
- Hitchcock IS, Genever PG, Cahusac PMB (2004) Essential components for a glutamatergic synapse between Merkel cell and nerve terminal in rats. *Neuroscience Letters* 362:196–199.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol (Lond)* 117:500–544.
- Honda CN (1995) Differential distribution of calbindin-D28k and parvalbumin in somatic and visceral sensory neurons. *Neuroscience* 68:883–892.
- Honoré E (2007) The neuronal background K₂P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8:251–261.
- Hoshi N, Zhang J-S, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, Langeberg LK, Yoneda Y, Scott JD, Brown DA, Higashida H (2003) AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat Neurosci* 6:564–571.
- Hu J, Chiang L-Y, Koch M, Lewin GR (2010) Evidence for a protein tether involved in somatic touch. *EMBO J* 29:855–867.
- Hu J, Lewin GR (2006) Mechanosensitive currents in the neurites of cultured mouse sensory neurones. *J Physiol (Lond)* 577:815–828.
- Iannotti FA, Panza E, Barrese V, Viggiano D, Soldovieri MV, Tagliatela M (2010) Expression, localization, and pharmacological role of K_v7 potassium channels in skeletal muscle proliferation, differentiation, and survival after myotoxic insults. *J Pharmacol Exp Ther* 332:811–820.
- Idé C (1976) The fine structure of the digital corpuscle of the mouse toe pad, with special reference to nerve fibers. *Am J Anat* 147:329–355.
- Iggo A (1960) Cutaneous mechanoreceptors with afferent C fibres. *J Physiol (Lond)* 152:337–353.
- Iggo A, Kornhuber HH (1977) A quantitative study of C-mechanoreceptors in hairy skin of the cat. *J Physiol (Lond)* 271:549–565.
- Iggo A, Muir AR (1969) The structure and function of a slowly adapting touch corpuscle in hairy skin. *J Physiol (Lond)* 200:763–796.
- Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG (2014) Merkel Cells Transduce and Encode Tactile Stimuli to Drive A β -Afferent Impulses. *Cell* 157:664–675.

- Jänig W, Schmidt RF, Zimmermann M (1968) Single unit responses and the total afferent outflow from the cat's foot pad upon mechanical stimulation. *Exp Brain Res* 6:100–115.
- Jensen HS, Callø K, Jespersen T, Jensen BS, Olesen S-P (2005) The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Brain Res Mol Brain Res* 139:52–62.
- Jentsch TJ (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat Rev Neurosci* 1:21–30.
- Johansson RS, Landström U, Lundström R (1982) Responses of mechanoreceptive afferent units in the glabrous skin of the human hand to sinusoidal skin displacements. *Brain Res* 244:17–25.
- Johansson RS, Trulsson M, Olsson KA, Westberg KG (1988) Mechanoreceptor activity from the human face and oral mucosa. *Exp Brain Res* 72:204–208.
- Johnson KO (2001) The roles and functions of cutaneous mechanoreceptors. *Curr Opin Neurobiol* 11:455–461.
- Johnson KO, Yoshioka T, Vega-Bermudez F (2000) Tactile functions of mechanoreceptive afferents innervating the hand. *J Clin Neurophysiol* 17:539–558.
- Jones S, Brown DA, Milligan G, Willer E, Buckley NJ, Caulfield MP (1995) Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. *Neuron* 14:399–405.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203–210.
- Kamada F, Kure S, Kudo T, Suzuki Y, Oshima T, Ichinohe A, Kojima K, Niihori T, Kanno J, Narumi Y, Narisawa A, Kato K, Aoki Y, Ikeda K, Kobayashi T, Matsubara Y (2006) A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the genotype-phenotype correlation. *J Hum Genet* 51:455–460.
- Kang D, Kim D (2006) TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol, Cell Physiol* 291:C138–C146.
- Kang L, Gao J, Schafer WR, Xie Z, Xu XZS (2010) *C. elegans* TRP Family Protein TRP-4 Is a Pore-Forming Subunit of a Native Mechanotransduction Channel. *Neuron* 67:381–391.
- Kharkovets T, Dedek K, Maier H, Schweizer M, Khimich D, Nouvian R, Vardanyan V, Leuwer R, Moser T, Jentsch TJ (2006) Mice with altered KCNQ4 K⁺ channels implicate sensory outer hair cells in human progressive deafness. *EMBO J* 25:642–652.
- Kharkovets T, Hardelin JP, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ (2000) KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4333–4338.

- King CH, Lancaster E, Salomon D, Peles E, Scherer SS (2014) Kv7.2 regulates the function of peripheral sensory neurons. *J Comp Neurol* 522:3262–3280.
- King CH, Scherer SS (2011) Kv7.5 is the primary Kv7 subunit expressed in C-fibers. *The Journal of Comparative Neurology* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134895> [Accessed December 5, 2011].
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M (1992) The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8:947–956.
- Knibestöl M (1973) Stimulus-response functions of rapidly adapting mechanoreceptors in human glabrous skin area. *J Physiol (Lond)* 232:427–452.
- Koltzenburg M, Lewin GR (1997) Receptive properties of embryonic chick sensory neurons innervating skin. *J Neurophysiol* 78:2560–2568.
- Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR (1997) Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 78:1841–1850.
- Konietzny F, Hensel H (1977) Response of rapidly and slowly adapting mechanoreceptors and vibratory sensitivity in human hairy skin. *Pflugers Arch* 368:39–44.
- Kosenko A, Kang S, Smith IM, Greene DL, Langeberg LK, Scott JD, Hoshi N (2012) Coordinated signal integration at the M-type potassium channel upon muscarinic stimulation. *EMBO J* 31:3147–3156.
- Kress M, Koltzenburg M, Reeh PW, Handwerker HO (1992) Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *J Neurophysiol* 68:581–595.
- Krumerman A, Gao X, Bian J-S, Melman YF, Kagan A, McDonald TV (2004) An LQT mutant minK alters KvLQT1 trafficking. *Am J Physiol, Cell Physiol* 286:C1453–C1463.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96:437–446.
- Kumazawa T, Perl ER (1977) Primate cutaneous sensory units with unmyelinated (C) afferent fibers. *J Neurophysiol* 40:1325–1338.
- Kung C (2005) A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436:647–654.
- Lacour J p., Dubois D, Pisani A, Ortonne J p. (1991) Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis. *British Journal of Dermatology* 125:535–542.
- LaMotte CC, Kapadia SE (1993) Deafferentation-induced terminal field expansion of myelinated saphenous afferents in the adult rat dorsal horn and the nucleus gracilis following pronase injection of the sciatic nerve. *J Comp Neurol* 330:83–94.
- Lancet D (1986) Vertebrate olfactory reception. *Annu Rev Neurosci* 9:329–355.

- Lang PM, Fleckenstein J, Passmore GM, Brown DA, Grafe P (2008) Retigabine reduces the excitability of unmyelinated peripheral human axons. *Neuropharmacology* 54:1271–1278.
- Lawson SN, Waddell PJ (1991) Soma Neurofilament Immunoreactivity Is Related to Cell Size and Fibre Conduction Velocity in Rat Primary Sensory Neurons. *J Physiol* 435:41–63.
- Lechner SG, Lewin GR (2013) Hairy Sensation. *Physiology* 28:142–150.
- Leem JW, Willis WD, Chung JM (1993) Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *J Neurophysiol* 69:1684–1699.
- Lee WL, Biervert C, Hallmann K, Tay A, Dean JC, Steinlein OK (2000) A KCNQ2 splice site mutation causing benign neonatal convulsions in a Scottish family. *Neuropediatrics* 31:9–12.
- Lemaitre G, Walker B, Lambert S (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 278:27333–27339.
- LeMasurier M, Gillespie PG (2005) Hair-cell mechanotransduction and cochlear amplification. *Neuron* 48:403–415.
- Le Pichon CE, Chesler AT (2014) The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Front Neuroanat* 8:21.
- Lerche C, Scherer CR, Seebohm G, Derst C, Wei AD, Busch AE, Steinmeyer K (2000) Molecular cloning and functional expression of KCNQ5, a potassium channel subunit that may contribute to neuronal M-current diversity. *J Biol Chem* 275:22395–22400.
- Lerche H, Biervert C, Alekov AK, Schleithoff L, Lindner M, Klinger W, Bretschneider F, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Bode H, Lehmann-Horn F, Steinlein OK (1999) A reduced K^+ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann Neurol* 46:305–312.
- Lewin GR, Mendell LM (1994) Regulation of cutaneous C-fiber heat nociceptors by nerve growth factor in the developing rat. *J Neurophysiol* 71:941–949.
- Lewin GR, Moshourab R (2004) Mechanosensation and pain. *J Neurobiol* 61:30–44.
- Li L, Ginty DD (2014) The structure and organization of lanceolate mechanosensory complexes at mouse hair follicles. *Elife* 3:e01901.
- Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147:1615–1627.
- Linley JE, Rose K, Ooi L, Gamper N (2010) Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflugers Arch* 459:657–669.

- Linley JE, Rose K, Patil M, Robertson B, Akopian AN, Gamper N (2008) Inhibition of M current in sensory neurons by exogenous proteases: a signaling pathway mediating inflammatory nociception. *J Neurosci* 28:11240–11249.
- Liu B, Linley JE, Du X, Zhang X, Ooi L, Zhang H, Gamper N (2010) The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J Clin Invest* 120:1240–1252.
- Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A, Ru F, Guan Y, Weng H-J, Geng Y, Udem BJ, Kollarik M, Chen Z-F, Anderson DJ, Dong X (2009) Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* 139:1353–1365.
- Liu Q, Vrontou S, Rice FL, Zylka MJ, Dong X, Anderson DJ (2007) Molecular genetic visualization of a rare subset of unmyelinated sensory neurons that may detect gentle touch. *Nat Neurosci* 10:946–948.
- Li W, Feng Z, Sternberg PW, Xu XZS (2006) A *C. elegans* stretch receptor neuron revealed by a mechanosensitive TRP channel homologue. *Nature* 440:684–687.
- Li Y, Gamper N, Hilgemann DW, Shapiro MS (2005) Regulation of K_v7 (KCNQ) K⁺ channel open probability by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25:9825–9835.
- Loewenstein WR, Skalak R (1966) Mechanical transmission in a Pacinian corpuscle. An analysis and a theory. *J Physiol (Lond)* 182:346–378.
- Löken LS, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Olausson H (2009) Coding of pleasant touch by unmyelinated afferents in humans. *Nat Neurosci* 12:547–548.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309:897–903.
- Lumpkin EA, Caterina MJ (2007) Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 445:858–865.
- Luo W, Enomoto H, Rice FL, Milbrandt J, Ginty DD (2009) Molecular identification of rapidly adapting mechanoreceptors and their developmental dependence on ret signaling. *Neuron* 64:841–856.
- Lynn B (1971) The form and distribution of the receptive fields of Pacinian corpuscles found in and around the cat's large foot pad. *J Physiol (Lond)* 217:755–771.
- MacKinnon R (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 350:232–235.
- Madamba SG, Schweitzer P, Siggins GR (1999) Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism. *J Neurophysiol* 82:1768–1775.

- Maeda T, Ochi K, Nakakura-Ohshima K, Youn SH, Wakisaka S (1999) The Ruffini ending as the primary mechanoreceptor in the periodontal ligament: its morphology, cytochemical features, regeneration, and development. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:307–327.
- Maingret F, Coste B, Padilla F, Clerc N, Crest M, Korogod SM, Delmas P (2008) Inflammatory mediators increase $\text{Na}_v1.9$ current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J Gen Physiol* 131:211–225.
- Maksimovic S, Nakatani M, Baba Y, Nelson AM, Marshall KL, Wellnitz SA, Firozi P, Woo S-H, Ranade S, Patapoutian A, Lumpkin EA (2014) Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors. *Nature*.
- Maljevic S, Lerche C, Seebohm G, Alekov AK, Busch AE, Lerche H (2003) C-terminal interaction of KCNQ2 and KCNQ3 K^+ channels. *J Physiol (Lond)* 548:353–360.
- Maljevic S, Lerche H (2014) Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy. *Prog Brain Res* 213:17–53.
- Maljevic S, Wuttke TV, Lerche H (2008) Nervous system K_v7 disorders: breakdown of a subthreshold brake. *J Physiol (Lond)* 586:1791–1801.
- Maljevic S, Wuttke TV, Seebohm G, Lerche H (2010) K_v7 channelopathies. *Pflugers Arch* 460:277–288.
- Marrion NV (1997) Control of M-current. *Annu Rev Physiol* 59:483–504.
- McCarter GC, Levine JD (2006) Ionic basis of a mechanotransduction current in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 2:28.
- McCarter GC, Reichling DB, Levine JD (1999) Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neurosci Lett* 273:179–182.
- McCarthy PW, Lawson SN (1989) Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience* 28:745–753.
- McCarthy PW, Lawson SN (1997) Differing action potential shapes in rat dorsal root ganglion neurones related to their substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. *J Comp Neurol* 388:541–549.
- McGlone F, Wessberg J, Olausson H (2014) Discriminative and affective touch: sensing and feeling. *Neuron* 82:737–755.
- Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, Meadows H, Duckworth MD, Kellsell RE, Gloger II, Pangalos MN (2001) Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* 86:101–114.

- Mencia A, González-Nieto D, Modamio-Høybjør S, Etxeberria A, Aránguez G, Salvador N, Del Castillo I, Villarroel A, Moreno F, Barrio L, Moreno-Pelayo MA (2008) A novel KCNQ4 pore-region mutation (p.G296S) causes deafness by impairing cell-surface channel expression. *Hum Genet* 123:41–53.
- Mense S (2008) 5.03 - Anatomy of Nociceptors. In: *The Senses: A Comprehensive Reference* (Gardner RHMDADAHMDOFKBCBIBHKP, ed), pp 11–41. New York: Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123708809001377> [Accessed June 16, 2015].
- Merkel FS (1875) Tastzellen und Tastkörperchen bei den Haustieren und beim Menschen.
- Meyer RA, Davis KD, Cohen RH, Treede RD, Campbell JN (1991) Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. *Brain Res* 561:252–261.
- Milenkovic N, Zhao W-J, Walcher J, Albert T, Siemens J, Lewin GR, Poulet JFA (2014) A somatosensory circuit for cooling perception in mice. *Nat Neurosci* 17:1560–1566.
- Millard CL, Woolf CJ (1988) Sensory innervation of the hairs of the rat hindlimb: a light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 277:183–194.
- Millichap JJ, Cooper EC (2012) KCNQ2 Potassium Channel Epileptic Encephalopathy Syndrome: Divorce of an Electro-Mechanical Couple? *Epilepsy Curr* 12:150–152.
- Moore SD, Madamba SG, Joëls M, Siggins GR (1988) Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* 239:278–280.
- Munger BL (1965) The intraepidermal innervation of the snout skin of the opossum. A light and electron microscope study, with observations on the nature of Merkel's Tastzellen. *J Cell Biol* 26:79–97.
- Munger BL, Pubols LM, Pubols BH (1971) The Merkel rete papilla--a slowly adapting sensory receptor in mammalian glabrous skin. *Brain Res* 29:47–61.
- Munns CH, Caterina MJ (2012) Tune in to KCNQ. *Nat Neurosci* 15:8–10.
- Mu X, Silos-Santiago I, Carroll SL, Snider WD (1993) Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J Neurosci* 13:4029–4041.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8424–8428.
- Nakajo K, Kubo Y (2008) Second coiled-coil domain of KCNQ channel controls current expression and subfamily specific heteromultimerization by salt bridge networks. *J Physiol (Lond)* 586:2827–2840.

- Neubauer BA, Waldegger S, Heinzinger J, Hahn A, Kurlmann G, Fiedler B, Eberhard F, Muhle H, Stephani U, Garkisch S, Eeg-Olofsson O, Müller U, Sander T (2008) KCNQ2 and KCNQ3 mutations contribute to different idiopathic epilepsy syndromes. *Neurology* 71:177–183.
- Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, Guy N, Borsotto M, Reeh P, Eschalier A, Lazdunski M (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28:1308–1318.
- O’Hagan R, Chalfie M, Goodman MB (2005) The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. *Nat Neurosci* 8:43–50.
- Olausson H, Wessberg J, Morrison I, McGlone F, Vallbo A (2010) The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *Neurosci Biobehav Rev* 34:185–191.
- Orhan G, Bock M, Schepers D, Ilina EI, Reichel SN, Löffler H, Jezutkovic N, Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, Danker T, Guenther E, Scheffer IE, De Jonghe P, Lerche H, Maljevic S (2014) Dominant-negative effects of KCNQ2 mutations are associated with epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 75:382–394.
- Otto JF, Singh NA, Dahle EJ, Leppert MF, Pappas CM, Pruess TH, Wilcox KS, White HS (2009) Electroconvulsive seizure thresholds and kindling acquisition rates are altered in mouse models of human KCNQ2 and KCNQ3 mutations for benign familial neonatal convulsions. *Epilepsia* 50:1752–1759.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul J-Y, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and Na_v channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26:2599–2613.
- Papp A, Fehér O, Erdélyi L (1987) The ionic mechanism of the pentylenetetrazol convulsions. *Acta Biol Hung* 38:349–361.
- Passmore GM, Reilly JM, Thakur M, Keasberry VN, Marsh SJ, Dickenson AH, Brown DA (2012) Functional significance of M-type potassium channels in nociceptive cutaneous sensory endings. *Front Mol Neurosci* 5:63.
- Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, Al-Qatari M, Marsh SJ, Matthews EA, Dickenson AH, Brown TA, Burbidge SA, Main M, Brown DA (2003) KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 23:7227–7236.
- Patel TD, Jackman A, Rice FL, Kucera J, Snider WD (2000) Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron* 25:345–357.
- Pereira V, Busserolles J, Christin M, Devilliers M, Poupon L, Legha W, Alloui A, Aissouni Y, Bourinet E, Lesage F, Eschalier A, Lazdunski M, Noël J (2014) Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* 155:2534–2544.

- Peroz D, Dahimène S, Baró I, Loussouarn G, Mérot J (2009) LQT1-associated mutations increase KCNQ1 proteasomal degradation independently of Derlin-1. *J Biol Chem* 284:5250–5256.
- Perry MJ, Lawson SN (1998) Differences in expression of oligosaccharides, neuropeptides, carbonic anhydrase and neurofilament in rat primary afferent neurons retrogradely labelled via skin, muscle or visceral nerves. *Neuroscience* 85:293–310.
- Peters HC, Hu H, Pongs O, Storm JF, Isbrandt D (2005) Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat Neurosci* 8:51–60.
- Rahman F, Harada F, Saito I, Suzuki A, Kawano Y, Izumi K, Nozawa-Inoue K, Maeda T (2011) Detection of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in periodontal Ruffini endings of mouse incisors. *Neurosci Lett* 488:173–177.
- Ranade SS, Qiu Z, Woo S-H, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li Y-SJ, Chien S, Patapoutian A (2014a) Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:10347–10352.
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A (2015) Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* 87:1162–1179.
- Ranade SS, Woo S-H, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qiu Z, Wood JN, Lewin GR, Patapoutian A (2014b) Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature* 516:121–125.
- Rasband MN (2010) The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11:552–562.
- Rasmussen HB, Frøkjær-Jensen C, Jensen CS, Jensen HS, Jørgensen NK, Misonou H, Trimmer JS, Olesen S-P, Schmitt N (2007) Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J Cell Sci* 120:953–963.
- Reeh PW (1986) Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 66:141–146.
- Ribeiro-da-Silva A, Tagari P, Cuello AC (1989) Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: a quantitative study. *J Comp Neurol* 281:497–415.
- Rice FL, Albrecht PJ (2008) 6.01 - Cutaneous Mechanisms of Tactile Perception: Morphological and Chemical Organization of the Innervation to the Skin. In: *The Senses: A Comprehensive Reference* (Gardner RHMDADAHMDOFKBCBIBHKP, ed), pp 1–31. New York: Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123708809003406> [Accessed June 10, 2015].

- Ronen GM, Rosales TO, Connolly M, Anderson VE, Leppert M (1993) Seizure characteristics in chromosome 20 benign familial neonatal convulsions. *Neurology* 43:1355–1360.
- Rose K, Ooi L, Dalle C, Robertson B, Wood IC, Gamper N (2011) Transcriptional repression of the M channel subunit Kv7.2 in chronic nerve injury. *Pain* 152:742–754.
- Roudaut Y, Lonigro A, Coste B, Hao J, Delmas P, Crest M (2012) Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. *Channels (Austin)* 6:234–245.
- Roura-Ferrer M, Solé L, Martínez-Mármol R, Villalonga N, Felipe A (2008) Skeletal muscle Kv7 (KCNQ) channels in myoblast differentiation and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 369:1094–1097.
- Ruffini A (1894) Di un nuovo organo nervoso terminale e sulla presenza dei corpuscoli Golgi-Mazzoni nel connettivo sottocutaneo dei polpastrelli delle dita dell'uomo. *Tip. della R. Accademia dei Lincei*. Available at: <https://books.google.de/books?id=P5c1nQEACAAJ>.
- Russell MW, Dick M, Collins FS, Brody LC (1996) KVLQT1 mutations in three families with familial or sporadic long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 5:1319–1324.
- Rutlin M, Ho C-Y, Abaira VE, Cassidy C, Woodbury CJ, Ginty DD (2014) The cellular and molecular basis of direction selectivity of A δ -LTMRs. *Cell* 159:1640–1651.
- Saito H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N (2012) Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 72:298–300.
- Sakurai K, Akiyama M, Cai B, Scott A, Han B-X, Takatoh J, Sigrist M, Arber S, Wang F (2013) The organization of submodality-specific touch afferent inputs in the vibrissa column. *Cell Rep* 5:87–98.
- Sangameswaran L, Delgado SG, Fish LM, Koch BD, Jakeman LB, Stewart GR, Sze P, Hunter JC, Eglén RM, Herman RC (1996) Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem* 271:5953–5956.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* 384:80–83.
- Scherrer G, Imamachi N, Cao Y-Q, Contet C, Mennicken F, O'Donnell D, Kieffer BL, Basbaum AI (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell* 137:1148–1159.
- Schlake T (2007) Determination of hair structure and shape. *Semin Cell Dev Biol* 18:267–273.

- Schleifenbaum J, Kassmann M, Szijártó IA, Hercule HC, Tano J-Y, Weinert S, Heidenreich M, Pathan AR, Anistan Y-M, Alenina N, Rusch NJ, Bader M, Jentsch TJ, Gollasch M (2014) Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries. *Circ Res* 115:263–272.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H (1995) Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* 15:333–341.
- Schmitt N, Calloe K, Nielsen NH, Buschmann M, Speckmann E-J, Schulze-Bahr E, Schwarz M (2007) The novel C-terminal KCNQ1 mutation M520R alters protein trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 358:304–310.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O (2000) A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 19:332–340.
- Schroeder BC, Hechenberger M, Weinreich F, Kubisch C, Jentsch TJ (2000a) KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275:24089–24095.
- Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ (1998) Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396:687–690.
- Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ (2000b) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature* 403:196–199.
- Schwake M, Jentsch TJ, Friedrich T (2003) A carboxy-terminal domain determines the subunit specificity of KCNQ K⁺ channel assembly. *EMBO Rep* 4:76–81.
- Schwake M, Pusch M, Kharkovets T, Jentsch TJ (2000) Surface expression and single channel properties of KCNQ2/KCNQ3, M-type K⁺ channels involved in epilepsy. *J Biol Chem* 275:13343–13348.
- Schwarz JR, Glassmeier G, Cooper EC, Kao T-C, Nodera H, Tabuena D, Kaji R, Bostock H (2006) KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J Physiol (Lond)* 573:17–34.
- Schweitzer P, Madamba S, Siggins GR (1990) Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature* 346:464–467.
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23:5080–5081.
- Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI, Edwards RH (2009) Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 462:651–655.

- Seebohm G, Scherer CR, Busch AE, Lerche C (2001) Identification of specific pore residues mediating KCNQ1 inactivation. A novel mechanism for long QT syndrome. *J Biol Chem* 276:13600–13605.
- Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Ureche ON, Henrion U, Baltaev R, Mack AF, Korniyuchuk G, Steinke K, Tapken D, Pfeufer A, Käab S, Bucci C, Attali B, Merot J, Tavaré JM, Hoppe UC, Sanguinetti MC, Lang F (2008) Long QT syndrome-associated mutations in KCNQ1 and KCNE1 subunits disrupt normal endosomal recycling of IKs channels. *Circ Res* 103:1451–1457.
- Seebohm G, Westenskow P, Lang F, Sanguinetti MC (2005) Mutation of colocalized residues of the pore helix and transmembrane segments S5 and S6 disrupt deactivation and modify inactivation of KCNQ1 K⁺ channels. *J Physiol (Lond)* 563:359–368.
- Selyanko AA, Brown DA (1996) Intracellular calcium directly inhibits potassium M channels in excised membrane patches from rat sympathetic neurons. *Neuron* 16:151–162.
- Shahidullah M, Santarelli LC, Wen H, Levitan IB (2005) Expression of a calmodulin-binding KCNQ2 potassium channel fragment modulates neuronal M-current and membrane excitability. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16454–16459.
- Shah MM, Mistry M, Marsh SJ, Brown DA, Delmas P (2002) Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol (Lond)* 544:29–37.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52:557–594.
- Shin J-B, Martinez-Salgado C, Heppenstall PA, Lewin GR (2003) A T-type calcium channel required for normal function of a mammalian mechanoreceptor. *Nat Neurosci* 6:724–730.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, Leppert M (1998) A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet* 18:25–29.
- Singh NA, Otto JF, Dahle EJ, Pappas C, Leslie JD, Vilaythong A, Noebels JL, White HS, Wilcox KS, Leppert MF (2008) Mouse models of human KCNQ2 and KCNQ3 mutations for benign familial neonatal convulsions show seizures and neuronal plasticity without synaptic reorganization. *J Physiol (Lond)* 586:3405–3423.
- Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF, BFNC Physician Consortium (2003) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* 126:2726–2737.
- Smith ESJ, Lewin GR (2009) Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology A* 195:1089–1106.

- Soh H, Pant R, LoTurco JJ, Tzingounis AV (2014) Conditional deletions of epilepsy-associated KCNQ2 and KCNQ3 channels from cerebral cortex cause differential effects on neuronal excitability. *J Neurosci* 34:5311–5321.
- Soldovieri MV, Castaldo P, Iodice L, Miceli F, Barrese V, Bellini G, Miraglia del Giudice E, Pascotto A, Bonatti S, Annunziato L, Tagliatalata M (2006) Decreased subunit stability as a novel mechanism for potassium current impairment by a KCNQ2 C terminus mutation causing benign familial neonatal convulsions. *J Biol Chem* 281:418–428.
- Soldovieri MV, Cilio MR, Miceli F, Bellini G, Miraglia del Giudice E, Castaldo P, Hernandez CC, Shapiro MS, Pascotto A, Annunziato L, Tagliatalata M (2007) Atypical gating of M-type potassium channels conferred by mutations in uncharged residues in the S4 region of KCNQ2 causing benign familial neonatal convulsions. *J Neurosci* 27:4919–4928.
- Soldovieri MV, Miceli F, Tagliatalata M (2011) Driving with no brakes: molecular pathophysiology of K_v7 potassium channels. *Physiology (Bethesda)* 26:365–376.
- Spitzmaul G, Tolosa L, Winkelmann BHJ, Heidenreich M, Frens MA, Chabbert C, de Zeeuw CI, Jentsch TJ (2013) Vestibular role of KCNQ4 and KCNQ5 K⁺ channels revealed by mouse models. *J Biol Chem* 288:9334–9344.
- Squires RF, Saederup E, Crawley JN, Skolnick P, Paul SM (1984) Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sciences* 35:1439–1444.
- Stucky CL, DeChiara T, Lindsay RM, Yancopoulos GD, Koltzenburg M (1998) Neurotrophin 4 is required for the survival of a subclass of hair follicle receptors. *J Neurosci* 18:7040–7046.
- Stucky CL, Shin J-B, Lewin GR (2002) Neurotrophin-4: a survival factor for adult sensory neurons. *Curr Biol* 12:1401–1404.
- Su C-C, Yang J-J, Shieh J-C, Su M-C, Li S-Y (2007) Identification of novel mutations in the KCNQ4 gene of patients with nonsyndromic deafness from Taiwan. *Audiol Neurootol* 12:20–26.
- Suh B-C, Hille B (2002) Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron* 35:507–520.
- Szeder V, Grim M, Kucera J, Sieber-Blum M (2003) Neurotrophin-3 signaling in mammalian Merkel cell development. *Dev Dyn* 228:623–629.
- Takahashi-Iwanaga H, Shimoda H (2003) The three-dimensional microanatomy of Meissner corpuscles in monkey palmar skin. *J Neurocytol* 32:363–371.
- Talbot WH, Darian-Smith I, Kornhuber HH, Mountcastle VB (1968) The sense of flutter-vibration: comparison of the human capacity with response patterns of mechanoreceptive afferents from the monkey hand. *J Neurophysiol* 31:301–334.

- Talebizadeh Z, Kelley PM, Askew JW, Beisel KW, Smith SD (1999) Novel mutation in the KCNQ4 gene in a large kindred with dominant progressive hearing loss. *Hum Mutat* 14:493–501.
- Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T (2014) Potassium Channels: Structures, Diseases, and Modulators. *Chem Biol Drug Des* 83:1–26.
- Tinel N, Lauritzen I, Chouabe C, Lazdunski M, Borsotto M (1998) The KCNQ2 potassium channel: splice variants, functional and developmental expression. Brain localization and comparison with KCNQ3. *FEBS Lett* 438:171–176.
- Tokimasa T, Akasu T (1990) ATP regulates muscarine-sensitive potassium current in dissociated bull-frog primary afferent neurones. *J Physiol (Lond)* 426:241–264.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543.
- Tzingounis AV, Heidenreich M, Kharkovets T, Spitzmaul G, Jensen HS, Nicoll RA, Jentsch TJ (2010) The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:10232–10237.
- Tzingounis AV, Nicoll RA (2008) Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19974–19979.
- Vallbo AB, Johansson RS (1984) Properties of cutaneous mechanoreceptors in the human hand related to touch sensation. *Hum Neurobiol* 3:3–14.
- Van Hauwe P, Coucke PJ, Ensink RJ, Huygen P, Cremers CW, Van Camp G (2000) Mutations in the KCNQ4 K⁺ channel gene, responsible for autosomal dominant hearing loss, cluster in the channel pore region. *Am J Med Genet* 93:184–187.
- Vetter I, Hein A, Sattler S, Hessler S, Touska F, Bressan E, Parra A, Hager U, Leffler A, Boukalova S, Nissen M, Lewis RJ, Belmonte C, Alzheimer C, Huth T, Vlachova V, Reeh PW, Zimmermann K (2013) Amplified cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition. *J Neurosci* 33:16627–16641.
- Vilceanu D, Stucky CL (2010) TRPA1 mediates mechanical currents in the plasma membrane of mouse sensory neurons. *PLoS ONE* 5:e12177.
- von Frey M (1896) Frey, Max von - Untersuchungen über die Sinnesfunktionen der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz. Available at: <http://echo.mpiwg-berlin.mpg.de/ECHODOCUView?url=/permanent/vlp/lit29425/index.meta&start=61&pn=5> [Accessed March 5, 2015].
- Vrontou S, Wong AM, Rau KK, Koerber HR, Anderson DJ (2013) Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. *Nature* 493:669–673.

- Wagner R, Meissner G (1852) Ueber das Vorhandensein bisher unbekannter eigenthümlicher Tastkörperchen (Corpuscula tactus) in den Gefühlswärzchen der menschlichen Haut und über die Endausbreitung sensitiver Nerven.
- Walker RG, Willingham AT, Zuker CS (2000) A *Drosophila* Mechanosensory Transduction Channel. *Science* 287:2229–2234.
- Wang H, Rivero-Melián C, Robertson B, Grant G (1994) Transganglionic transport and binding of the isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in rat primary sensory neurons. *Neuroscience* 62:539–551.
- Wang HS, McKinnon D (1995) Potassium currents in rat prevertebral and paravertebral sympathetic neurones: control of firing properties. *J Physiol (Lond)* 485 (Pt 2):319–335.
- Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890–1893.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12:17–23.
- Wang R, Lewin GR (2011) The Ca_v3.2 T-type calcium channel regulates temporal coding in mouse mechanoreceptors. *J Physiol (Lond)* 589:2229–2243.
- Watakabe A, Ichinohe N, Ohsawa S, Hashikawa T, Komatsu Y, Rockland KS, Yamamori T (2007) Comparative analysis of layer-specific genes in mammalian neocortex. *Cereb Cortex* 17:1918–1933.
- Watanabe H, Nagata E, Kosakai A, Nakamura M, Yokoyama M, Tanaka K, Sasai H (2000) Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability. *J Neurochem* 75:28–33.
- Weckhuysen S et al. (2012) KCNQ2 encephalopathy: Emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Annals of Neurology* 71:15–25.
- Wellnitz SA, Lesniak DR, Gerling GJ, Lumpkin EA (2010) The regularity of sustained firing reveals two populations of slowly adapting touch receptors in mouse hairy skin. *J Neurophysiol* 103:3378–3388.
- Wende H, Lechner SG, Cheret C, Bourane S, Kolanczyk ME, Pattyn A, Reuter K, Munier FL, Carroll P, Lewin GR, Birchmeier C (2012) The Transcription Factor c-Maf Controls Touch Receptor Development and Function. *Science* 335:1373–1376.
- Wen H, Levitan IB (2002) Calmodulin is an auxiliary subunit of KCNQ2/3 potassium channels. *J Neurosci* 22:7991–8001.

- Winks JS, Hughes S, Filippov AK, Tatulian L, Abogadie FC, Brown DA, Marsh SJ (2005) Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J Neurosci* 25:3400–3413.
- Woodbury CJ, Koerber HR (2007) Central and peripheral anatomy of slowly adapting type I low-threshold mechanoreceptors innervating trunk skin of neonatal mice. *J Comp Neurol* 505:547–561.
- Woodbury CJ, Ritter AM, Koerber HR (2001) Central anatomy of individual rapidly adapting low-threshold mechanoreceptors innervating the “hairy” skin of newborn mice: early maturation of hair follicle afferents. *J Comp Neurol* 436:304–323.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75–78.
- Woo S-H, Lumpkin EA, Patapoutian A (2015) Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends Cell Biol* 25:74–81.
- Woo S-H, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A (2014) Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*.
- Wuttke TV, Jurkat-Rott K, Paulus W, Garncarek M, Lehmann-Horn F, Lerche H (2007) Peripheral nerve hyperexcitability due to dominant-negative KCNQ2 mutations. *Neurology* 69:2045–2053.
- Yang WP, Levesque PC, Little WA, Conder ML, Ramakrishnan P, Neubauer MG, Blannar MA (1998) Functional expression of two KvLQT1-related potassium channels responsible for an inherited idiopathic epilepsy. *J Biol Chem* 273:19419–19423.
- Yan Z, Zhang W, He Y, Gorczyca D, Xiang Y, Cheng LE, Meltzer S, Jan LY, Jan YN (2013) *Drosophila* NOMPC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation. *Nature* 493:221–225.
- Yeung SYM, Lange W, Schwake M, Greenwood IA (2008) Expression profile and characterisation of a truncated KCNQ5 splice variant. *Biochem Biophys Res Commun* 371:741–746.
- Yeung SYM, Pucovský V, Moffatt JD, Saldanha L, Schwake M, Ohya S, Greenwood IA (2007) Molecular expression and pharmacological identification of a role for K_v7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol* 151:758–770.
- Yue C, Yaari Y (2004) KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:4614–4624.
- Yus-Nájera E, Muñoz A, Salvador N, Jensen BS, Rasmussen HB, Defelipe J, Villarroel A (2003) Localization of KCNQ5 in the normal and epileptic human temporal neocortex and hippocampal formation. *Neuroscience* 120:353–364.

- Yus-Najera E, Santana-Castro I, Villarroel A (2002) The identification and characterization of a noncontinuous calmodulin-binding site in noninactivating voltage-dependent KCNQ potassium channels. *J Biol Chem* 277:28545–28553.
- Zaika O, Hernandez CC, Bal M, Tolstykh GP, Shapiro MS (2008) Determinants within the turret and pore-loop domains of KCNQ3 K⁺ channels governing functional activity. *Biophys J* 95:5121–5137.
- Zhang H, Craciun LC, Mirshahi T, Rohács T, Lopes CMB, Jin T, Logothetis DE (2003) PIP₂ activates KCNQ channels, and its hydrolysis underlies receptor-mediated inhibition of M currents. *Neuron* 37:963–975.
- Zhang W, Cheng LE, Kittelmann M, Li J, Petkovic M, Cheng T, Jin P, Guo Z, Göpfert MC, Jan LY, Jan YN (2015) Ankyrin Repeats Convey Force to Gate the NOMPC Mechanotransduction Channel. *Cell* 162:1391–1403.
- Zimmerman A, Bai L, Ginty DD (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science* 346:950–954.
- Zimmermann K, Hein A, Hager U, Kaczmarek JS, Turnquist BP, Clapham DE, Reeh PW (2009) Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc* 4:174–196.
- Zotterman Y (1939) Touch, pain and tickling: an electro-physiological investigation on cutaneous sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 95:1–28.
- Zurborg S, Piszczek A, Martínez C, Hublitz P, Al Banchaabouchi M, Moreira P, Perlas E, Heppenstall PA (2011) Generation and characterization of an Advillin-Cre driver mouse line. *Mol Pain* 7:66.
- Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ (2005) Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron* 45:17–25

7 DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen geht zunächst mein großer Dank an Thomas Jentsch.

Für die Begutachtung meiner Dissertation möchte ich mich auch bei Prof. Stephan Sigrist bedanken.

Matthias Heidenreich danke ich für die Einführung in das Thema dieser Arbeit zu Beginn meiner Doktorandenzeit.

Ein großes Dankeschön geht auch an Prof. Gary Lewin, in dessen Labor ich die Methode der Haut-Nerv Präparation erlernen durfte. Die entsprechende Betreuung erfolgte durch seine Mitarbeiter Christiane Wetzel, Stefan Lechner und Jan Walcher, denen ich hierfür auch ganz herzlich danken möchte. Insbesondere Jan Walcher möchte ich in diesem Zusammenhang hervorheben, der mir auch im weiteren Verlauf meiner Arbeit stets ausgesprochen hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite stand, und mir eine große Hilfe bei Fragen bezüglich Schmerz- und Tastempfindungen war. Nicht zuletzt war Jan auch abseits wissenschaftsrelevanter Themen ein guter Gesprächs- und Diskussionspartner. Zusätzlich danke ich ihm auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit, genauso wie auch Janis Vogt.

Bei Patrick Seidler bedanke ich mich für seine technische Unterstützung. Insbesondere sei hier seine gewissenhafte Durchführung etlicher *in situ* Hybridisierungen sowie die Genotypisierung vieler vieler stetig anfallender Mausbiopsien zu nennen.

Franziska Binder und Franziska Ellert danke ich für die Versorgung dieser vielen Mauslinien.

Jonas Münch möchte ich dafür danken, dass er bei jeglicher Art von IT Problemen stets außerordentlich hilfsbereit zur Seite stand.

Den gesamten Arbeitsgruppen Jentsch und Plested danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre im 2. Stock des TRH und die Zeit, die wir auch außerhalb der Wissenschaft zusammen verbracht haben. Ein paar Personen möchte ich hier besonders hervorheben. Auch aufgrund des gemeinsamen Musizierens in unserem Bandprojekt möchte ich in diesem Zusammenhang Josef („Hemo“) Kaiser danken; die ‚Walze‘ war stets ein guter Ausgleich zur Laborarbeit. Durch das Beachen mit Steffi Weinert hat sich meine große Liebe zum Beach-Volleyball entwickeln können. Auch bedankt sich der ‚Beißer‘ bei seiner Fußball-Crew Corinna Göppner, Darius Lutter, Till Stuhlmann und Janis Vogt für viele gemeinsame Stunden im Bucher Fußball Käfig. Sowohl für die ein oder andere wissenschaftliche Diskussion, als auch für diverse andere interessante Unterhaltungen über ‚Gott und die Welt‘ bei einem Kännchen auf dem Balkon möchte ich mich bei Viktoria Klippenstein bedanken. Darüber hinaus möchte ich noch insbesondere Sebastian Albrecht, Ruth Pareja, Janet Liebold und meiner Bench-Nachbarin Johanna Jedamzick für das angenehme Arbeitsumfeld danken.

Nicht zuletzt hat immer auch die Musik eine große Rolle in meinem Leben gespielt. Kompositionen von Franz Schubert, Johann Sebastian Bach, Wolfgang Amadeus Mozart, Ludwig van Beethoven, Max Bruch und vielen weiteren klassischen Komponisten, aber auch Dub/Reggae Musik wie z.B. von Bob Marley konnten mir den ein oder anderen einsamen Mess-Tag in meinem Elektrophysiologie-Kämmerchen ein wenig erträglicher gestalten.

Ohne die nicht ganz freiwillige Teilnahme von genau 400 direkt in Versuchen involvierten Versuchsmäusen, sowie einer Vielzahl ‚verbrauchter‘ Mäuse aufgrund eines falschen Genotyps wäre die hier vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen. Aus diesem Grund halte ich es für mehr als gerechtfertigt, diese Stelle auch dazu zu nutzen, jener Tiere zu gedenken, deren Tod den Erfolg dieser Arbeit erst ermöglichten.

Des Weiteren möchte ich diese Gelegenheit auch dazu nutzen, meiner Familie dafür zu danken, dass sie immer für mich da waren, mich bei meinen Vorhaben stets unterstützen und mir bereits so vieles im Leben ermöglichen konnten. Ich weiß, ich kann mich stets auf sie verlassen. Dieser familiäre Rückhalt bedeutet mir wirklich sehr viel! Auch möchte ich hier an meine Großeltern denken, die stets mit großem Interesse dem Fortgang der vorliegenden Dissertation beiwohnten, leider aber nicht mehr alle den Abschluss dieser Arbeit erleben dürfen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich auch bei meiner Freundin Julia Burkhardt, die in den letzten Jahren ein wichtiger und fester Bestandteil meines Lebens wurde. Dank ihr konnte ich anstrengende Labortage stets gut hinter mir lassen. Auch sorgte sie dafür, dass die Wissenschaft ein nicht zu überhandnehmendes, alles dominierendes Thema in meinem Leben wurde, wofür ich sehr dankbar bin. Letztlich danke ich Julia auch dafür, dass sie mein Leben insgesamt ein Stückchen reicher gemacht hat!

8 PUBLIKATIONEN

Glebov K*, Schütze S*, Walter J (2011) Functional Relevance of a Novel SlyX Motif in Non-conventional Secretion of Insulin-degrading Enzyme. *J Biol Chem* 286:22711-22715

Fidzinski P, Korotkova T, Heidenreich M, Maier N, Schuetze S, Kobler O, Zuschratter W, Schmitz D, Ponomarenko A, Jentsch TJ (2015) KCNQ5 K(+) channels control hippocampal synaptic inhibition and fast network oscillations. *Nat Commun* 6:6254.

Schütze S, Orozco IJ, Jentsch TJ (2016) KCNQ Potassium Channels Modulate Sensitivity of Skin D-hair Mechanoreceptors. *J Biol Chem* doi: 10.1074/jbc.M115.681098

* geteilte Erstautorenschaft