

**Anlage zum Verwendungsnachweis
Precision²Treat
Sachbericht zum
Verwendungsnachweis**

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung/ wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Chronische Schmerzen sind ein großes Problem für Einzelpersonen und die Gesellschaft. Neuropathische Schmerzen, verursacht durch Defekte an Nervenfasern, betreffen bis zu 8% der Bevölkerung und beeinträchtigen die Lebensqualität erheblich. Trotz intensiver Forschung wurden in den letzten 20 Jahren nur begrenzte Fortschritte bei der Behandlung erzielt. Ein Drittel der Patienten erhielt 2022 keine wirksame Therapie. Ein innovativer Ansatz ist notwendig, um diesen Bedarf zu decken.

Das Precision²Treat (P2T) Projekt fokussierte auf seltene Schmerzsyndrome wie vererbare Erythromelalie (IEM) und Small Fiber Neuropathy (SFN). Diese Patienten litten unter der Seltenheit ihrer Erkrankung und dem Mangel an wirksamen Therapien. P2T nutzte induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)-abgeleitete sensorische Neurone für Arzneimittelscreenings, um neue Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Das Projekt zielte darauf ab, individuelle Therapien für chronische Schmerzpatient:innen zu identifizieren. Dazu nutzten wir induzierte Stammzellen, die zu Nozizeptoren differenziert wurden und das Genom der Patient:innen trugen. Vorarbeiten zeigten, dass SFN-abgeleitete Nozizeptoren übererregbar waren und spontan Aktionspotentiale sendeten, was die Schmerzen auslöste. Wir planten, Zellen von Patient:innen mit unterschiedlichen Symptomen zu reprogrammieren, um individuelle Veränderungen zu verstehen.

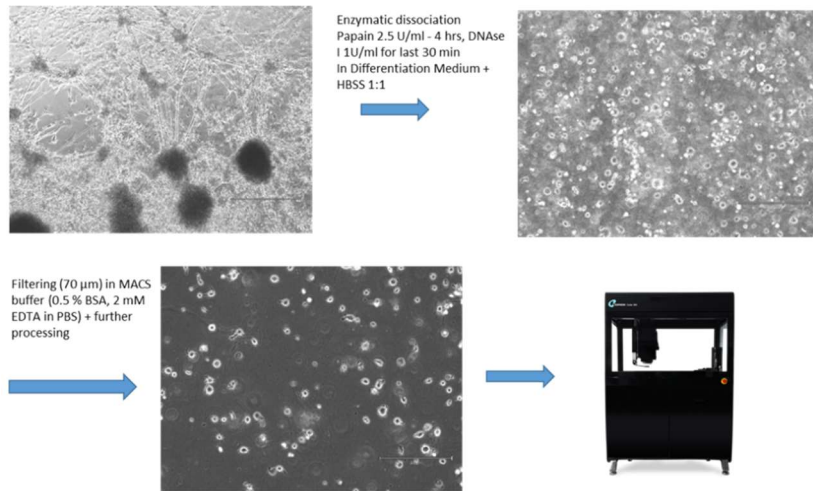
Die iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren wurden auf einem Hochdurchsatz-Elektrophysiologie-Gerät getestet und mit einer Bibliothek von 1.700 zugelassenen Wirkstoffen überprüft, um personalisierte Therapien zu entwickeln. P2T nutzte Patient:innen-eigene Zellen, um individuelle Pathomechanismen zu identifizieren und gezielte Therapien zu finden. Früher mussten Patient:innen mögliche Therapien in frustrierenden Selbstversuchen ausprobieren, was oft zu unsicheren Ergebnissen führte. P2T umging diese Suche und entwickelte effektivere Behandlungen.

2. Ablauf des Vorhabens

- Anschaffung des Hochdurchsatz-Elektrophysiologie Gerätes (HTS-System, Sophion Qube) und einer Substanzbibliothek.
- Reprogrammierung von 10 Patienten mit Schmerzkrankung oder Kontrollprobanden.
- Erfolgreiche Differenzierung von 6 iPSC-Klonen von Patienten oder Probanden zu Nozizeptoren.
- Qualitätskontrolle der Differenzierung mit Hilfe von Immunfärbungen (Peripherin, Tuj1).
- Erstellen von Standardprotokollen für die Stromklemme und die Natriumstrommessung und die Aktionspotentialmessung auf dem HTS-System Qube.
- Elektrophysiologische Messungen per manuellem Patch-Clamp, Multi-Elektroden-Arrays und auf dem Hochdurchsatz-Elektrophysiologie Gerät.
- Aufbau einer Pipeline zur Auswertung der großen Datenmengen.
- Laufende Optimierung der Messungen von differenzierten Stammzellen auf dem HTS-System.
- Codon-optimierung für die vereinfachte Herstellung von stabilen Zelllinien von Natriumkanal-Varianten (Nav1.7) die bei Patient:innen identifiziert wurden.
- Messungen und erste Substanzscreens an heterolog exprimierten Natriumkanälen und deren Varianten (von Schmerzpatienten).
- Identifizierung von biophysikalischen Änderungen und Medikamenten-Sensitivität der Nav1.7/Y990V Variante auf dem HTS-System Qube.

3. Die wesentlichen Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Es wurde ein funktionierendes Dissoziationsprotokoll für die Messung von iPSC-abgeleiteten sensorischen Neuronen auf dem Qube etabliert. Hierzu waren umfangreiche Optimierungen erforderlich und mit dem in Abb. 1 dargestellten Verfahren wurden gute Ergebnisse erzielt.



In den ersten Versuchen wurde nur eine geringe Effizienz erreicht und es konnten keine Aktionspotentiale (AP) gemessen werden. Nach langwieriger Optimierung der Differenzierung und Dissoziation konnte die Effizienz jedoch auf bis zu 20% gesteigert werden. Die Analyse der Messungen ergab, dass wiederholtes Differenzieren zu vergleichbaren und reproduzierbaren Ergebnissen führt. Abbildung 1 zeigt die vorläufige Auswertung.

Abbildung 1: Darstellung des entwickelten Protokolls zur Dissoziation von iPSC abgeleiteten sensorischen Neuronen für die Verwendung auf dem HTS-System Qube.

Die gemessenen Neurone weisen Reife auf, erkennbar an einem negativen Ruhemembranpotential (RMP) (Abb. 1A). Wichtige Parameter der Aktionspotentiale (APs) wie AP-Größe, Hyperpolarisation nach einem AP und der Schwellenwert (Abb. 1B) sind zwischen Zelllinien und Differenzierungen vergleichbar. Die AP-Dauer zeigte jedoch eine höhere Variabilität (Abb. 1C), die aufgrund der laufenden Analysen und Messungen noch nicht eindeutig bewertet werden kann. Es ist möglich, dass sich hier patientenspezifische Eigenschaften manifestieren oder die Heterogenität der differenzierten sensorischen Neurone zeigt. Die aktuellen Differenzierungen und Messungen werden voraussichtlich Aufschluss geben.

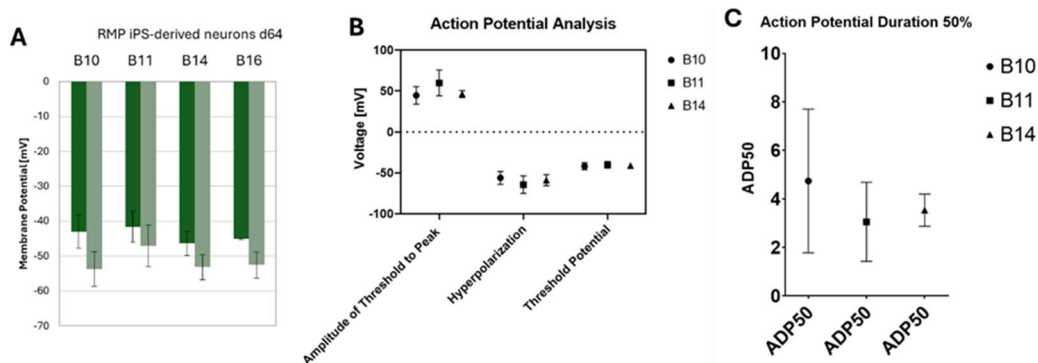


Abbildung 1: Analyse der Aktionspotential-Messungen an Tag 64 von drei Zelllinien. A: Resting membrane potential indicates maturity of neurons. B: AP Amplitude, Nachhyperpolarisation und AP Schwelle. C: AP Dauer in ms in der Mitte des Aps. Die Messungen zeigen, dass wir in verschiedenen Zelllinien und Differenzierungen reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Des Weiteren wurde die NaV1.7/Y990C Variante eines Patienten mit Small Fiber Neuropathie (SFN) aus der SCN-Aachen Kohorte biophysikalisch und pharmakologisch charakterisiert. Die Aktivierungskurve der NaV1.7/Y990C zeigte sich gegenüber dem WT etwas linksverschoben (hyperpolarisierte Aktivierung), was auf einen *gain-of-function* Phänotyp hinweisen könnte, der zu Schmerzsyndromen passen kann. Allerdings zeigten die Zellen des NaV1.7/Y990C gegenüber dem WT eine deutlich höhere Stromdichte, was die Aktivierungskurve beeinflussen kann, da die Spannungsklemme bei hohen Stromdichten weniger verlässlich ist. Dies wird derzeit weiter untersucht. Diese Zelllinie wurde auch genutzt, um die Wirkung von über 90 zugelassenen Arzneimitteln (mit bekannter Wirkung auf das ZNS) auf die Funktion der NaV1.7/Y990C Variante zu untersuchen. Einige Wirkstoffe zeigten gegenüber der Kontrolle (DMSO) einen Einfluss auf die Aktivierungsparameter, der den Varianten-induzierten Effekt entgegenwirkt.

Anlage zum Verwendungsnachweis

Precision²Treat

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Chronische Schmerzen bleiben eine wesentliche Beeinträchtigung für den/die Einzelne:n und ein gesellschaftliches Problem. Neuropathische Schmerzen können durch Defekte an kleinen Nervenfasern in der Haut (kutane Nozizeptoren) und durch Funktionsstörungen großer Nerven verursacht werden und sind besonders schwer behandelbar bzw. häufig therapierefraktär. Sie betreffen bis zu 8% der Bevölkerung, beeinträchtigen die Lebensqualität der Patient:innen erheblich und stellen eine große finanzielle Belastung für die Allgemeinheit dar. Trotz intensiver Bemühungen in den letzten 20 Jahren wurden nur sehr begrenzte Fortschritte bei der Entwicklung neuer, wirksamer Behandlungsstrategien für neuropathische Schmerzen erzielt, und im Jahr 2022 erhielt ein Drittel der Patient:innen nicht einmal diese eingeschränkt wirksame Behandlung. Eine der Hauptursachen ist die mangelnde Translation in der Schmerzforschung, die mit der eingeschränkten Zuverlässigkeit der präklinischen Schmerzmodelle zusammenhängt. Um diesen drängenden klinischen Bedarf zu decken, ist ein innovativer, kooperativer Ansatz erforderlich.

In dem hier berichteten Precision²Treat (P2T) Projekt haben wir uns auf die seltenen Schmerzsyndrome der vererbaren Erythromelalgie (IEM) und Small Fiber Neuropathy (SFN) fokussiert, da sie eine sehr klar definierte Gruppe von neuropathischen Schmerzpatient:innen darstellen. IEM Patient:innen tragen Mutationen in dem Gen für spannungsgesteuerte Natriumkanäle, welches manchmal, aber nicht immer, auch bei SFN Patient:innen verändert ist. Beide Gruppen von Patient:innen leiden stark unter der Seltenheit und daher Unbekanntheit ihrer Erkrankung – nicht zu Letzt aber auch unter dem Mangel an einer funktionierenden Therapie. Im P2T Projekt sollten die von iPSC abgeleiteten sensorischen Neurone an automatische Hochdurchsatz-Patch-Clamp-Elektrophysiologie angepasst werden, um sie für Arzneimittelscreenings zugänglich zu machen. So könnten entweder bereits zugelassene Arzneimittel wiederverwendet (Repurposing) oder neue Medikamente getestet werden. Mit P2T wurde beabsichtigt, eine Möglichkeit schaffen, Wirkstoffe an Patient:innen-eigenen Zellen zu screenen und solche zu identifizieren, die den Patient:innen individuell helfen können. Dafür sollte eine Substanz-Bibliothek mit ca. 1700 zugelassenen Arzneimittelwirkstoffen verwendet werden und die Messungen sollen auf einem Hochdurchsatz-Elektrophysiologie Gerät (high throughput screening, HTS-Gerät) erfolgen. Damit sollen die Grundlagen für Repurposing von bereits vorhandenen Medikamenten und für Screening von neu entwickelten Substanzen geschaffen werden. Dies eröffnet eine Fülle von weiteren möglichen Anwendungen, z.B. die Stratifizierung von Patient:innen vor Beginn einer Studie mit einer neuen Substanz, indem man diese auf den patient:innen-eigenen Zellen testet.

Diesen wissenschaftlichen Ansatz, den wir im P2T Projekt umsetzen, wurde und wird, basierend auf einer PubMed Recherche, noch nicht anderweitig verfolgt und hat hohes Innovationspotential. Ein häufig verfolgter Ansatz, um künftig die Therapie von hereditären

Schmerzerkrankungen zu verbessern beruht auf der Möglichkeit der Genomsequenzierung (Ganzgenom oder Exom) und der daraus abgeleiteten Information zu Mutationen oder Varianten in Genen, die mit der Schmerzwahrnehmung und -empfindung in Zusammenhang stehen. Basierend auf bioinformatischen Analysen des Exoms werden bestimmte Wahrscheinlichkeiten zugeordnet, mit der Mutationen/Varianten krankheits- verursachend sind und dann beispielsweise Wirkstoffe zur Behandlung empfohlen oder vorhergesagt, die an dem veränderten Protein angreifen. Dies ist aber aus mehreren Gründen wenig aussichtsreich: (i) es gibt nicht für alle Schmerz-relevanten Zielstrukturen (drug targets) verfügbare (und zugelassene) Wirkstoffe, (ii) wird dabei nicht berücksichtigt, welche funktionelle Dysfunktion durch eine Mutation hervorgerufen wird, so dass unklar bleibt, ob die Zielstrukturen positiv oder negativ moduliert werden sollten und (iii) ist bei chronischen Schmerzen nur in Einzelfällen (wie z.B. der IEM, siehe oben) eine einzelne genetische Mutation für die Fehlfunktion von sensorischen Neuronen verantwortlich. Im Gegensatz zu diesem Ansatz greift unser Ansatz und Lösungsweg tiefer, weil er durch die Verwendung von individuellen, patient:innen-eigenen Zellen, die das gesamte Genom der/des Patient:in tragen, sämtliche pathophysiologischen Veränderungen hinsichtlich der Modulierbarkeit durch fast alle verfügbaren Arzneimittelwirkstoffe in einem Ansatz untersuchbar macht. Die Einschätzung unseres Ansatzes als besonders innovativ und neu ist auch jetzt etwa 2 Jahre nach Antragstellung aus unserer Sicht noch zutreffend.

In P2T war es im Hinblick auf die konkreten Arbeiten/Untersuchungen unser Ziel, von fünf bis sieben gezielt ausgewählten Patient:innen und drei bis fünf entsprechenden Kontrollen iPSC herzustellen und diese zu sensorischen Neuronen zu differenzieren. Nach erfolgter Reifung sollten die Zellen für Messungen auf dem HTS-Gerät dissoziiert werden und dieses Prozedere zu einem hohen Anteil überleben. Hierzu sollten verschiedene Signal-Kaskaden der Zelldifferenzierung untersucht und spezifisch manipuliert werden, um zu verstehen, welche Kaskade besonders effektiv darin ist, die Zelldifferenzierung zu beschleunigen oder weniger variabel zu gestalten. Dieser sehr grundlagenwissenschaftliche Teil ist ein Herzstück von P2T, da hierauf das Prinzip der möglichen nachgeschalteten Entwicklung von personalisiertem Arzneimittelscreening oder eines companion Diagnostikums beruht.

2. Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen von P2T konnten wir, trotz einiger administrativ bedingten Verzögerungen, einen Großteil der Ziele erfolgreich bearbeiten.

Arbeits- und Zeitplan. Anschaffung des Hochdurchsatz-Elektrophysiologie-Gerätes (HTS-System): Aufgrund der Notwendigkeit einer zweimaligen Ausschreibung kam es zu einer erheblich verzögerten Geräteinstallation. Sie erfolgte erst im Oktober 2023 und das Gerät konnte erst ab Ende Oktober 2023 genutzt werden. Initial sah die zeitliche Planung vor, dass ab Juni 2023 die biophysikalischen Charakterisierungen mittels Hochdurchsatz-Elektrophysiologie und ab August 2023 das Wirkstoffscreening (Hochdurchsatzscreening, HTS) erfolgen soll (vergl. nachfolgend dargestelltem Zeitplan aus der Projektbeschreibung).

Precision ² Treat: Zeitplan		2023															
AP	Projektmonat	Q1			Summe PM Q1	Q2			Summe PM Q2	Q3			Summe PM Q3	Q4		Summe PM Q4	PM Gesamt
		1	2	3		4	5	6		7	8	9		10	11		
1	Herstellung iPSC																
2	Optimierung der Differenzierung	x o	x o	x o	x:3 o:3	x o	x o	x o	x:2 o:3	x			x:0,5				11,5
3	Charakterisierung					x	x		x:1	x	x	x	x:1,25	x		x:0,5	2,75
4	Wirkstoffscreening									x o	x o	x o	x:1,25 o:3	x o	x o	x:1,5 o:2	7,75
	Postdoc: x				3				3				3			2	22
	TA: o				3				3				3			2	

Neben der verzögerten Beschaffung/Installation des HTS-Systems unterlag auch die Reprogrammierung der Patienten-eigenen Zellen von den 10 Schmerzpatienten (bzw. einzelner Kontrollen) einer Verzögerung. Diese am Helmholtz Zentrum in München erfolgten Auftragsarbeiten (verl. Posten Auftragsvergabe bei Finanzmitteln) mussten wegen zu hoher Auslastung der Facility in zwei Chargen erfolgen und einige Klone benötigten längere Zeit, um die erforderliche Virusfreiheit (Sendai-Virus) vor Übergabe der jeweils drei Klone von iPSCs jedes Patienten sicherzustellen. Um dem veränderten Zeitplan gerecht zu werden, wurde Ende 2023 eine kostenneutrale Projektverlängerung bis zum 31.03.2024 beantragt und seitens des ZG bewilligt.

Neben den vorgenannten Verzögerungen im Projektablauf stellte sich insbesondere die Optimierung der Differenzierung von iPSC zu iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren als sehr schwierig und zeitintensiv dar. Erst nach etwa 50 Tagen (Liu et al., 2024) Differenzierung kann man von reifen iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren ausgehen, die den von uns untersuchten Natriumkanal Nav1.7 in einer Ausprägung exprimieren, wie es von primären nozizeptiven Neuronen bekannt ist. Das hat zur Folge, dass (i) Differenzierungen mehrerer iPSC-Klone parallel laufen müssen und (ii) erfolgte Optimierungsschritte erst nach einem längeren Zeitraum beurteilt werden können.

Nach reiflicher Prüfung, in der wir verschiedene Differenzierungsmethoden ausprobiert haben (Kalia et al., 2024), haben wir uns für eine Methode der forcierten Expression von NGN-1 (Schrenk-Siemens et al., 2022) entschieden, da diese verlässlich und reproduzierbar iPSC-neurone in sensorische Neurone differenziert. Nachdem die Kultur- bzw. Differenzierungsbedingungen insoweit angepasst waren, dass die entsprechenden immunhistochemischen Marker der iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren nachweisbar waren (vergl. Abb.1), zeigte es sich als besonders anspruchsvoll, die differenzierten Neurone zu vereinzeln, um diese mittels Hochdurchsatz-Elektrophysiologie auf dem HTS-System zu untersuchen. Wie in Abb.1 ersichtlich, besitzen differenzierte Neurone lange Ausläufer und Fortsätze, die eine Dissoziation und Vereinzeln, wie sie für die HTS zwingend erforderlich ist, sehr erschweren. Hier waren erhebliche Modifikationen der Protokolle erforderlich, um dies zu gewährleisten. Unter anderem mussten die enzymatischen und präparativen Schritte der Gradienten-/Matrixzentrifugation grundlegend verändert werden, um vitale, differenzierte Neurone in Suspension in Zellkulturmedium zu erhalten. Von einer anfänglichen Effizienz von unter 3-5 % (erfolgreiche Anzahl (bzw. Anteil) an gemessenen Zellen auf einem Mess-Chip des HTS-Systems, die auswertbaren Aktionspotentiale gezeigt haben) konnte nach diesen sehr umfangreichen Optimierungsbemühungen eine Effizienz (*success rate*) von ~20 % erreicht werden. Hier ist zu beachten, dass dieser nicht sehr hoch erscheinende Wert vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur zu bewerten ist. Hier wurden im Januar 2023 erstmals Hochdurchsatz-Ionenkanalaufzeichnungen von isolierten primären Spinalganglien (DRG) von Mäusen berichtet, die unter Nutzung des auch von uns angeschafften HTS System Sophion

gelb) ist ein Marker für periphere Neurone, Tuj1 (TUBB3) ist ein Marker für Neurone. Zellkerne sind mit DAPI blau gefärbt.

Wegen der protrahierten Optimierung der Differenzierung von iPSC zu Nozizeptoren wurde zur Kompensation bzw. als fall back Strategie eine heterologe Expression von Natriumkanal NaV1.7 Varianten in HEK293 Zellen begonnen. Dazu wurden Varianten in unserer Kohorte von 260 SFN Patient:innen identifiziert, die von den humangenetischen Kolleg:innen als mit erhöhter Wahrscheinlichkeit pathophysiologisch relevant eingeschätzt wurden. Diese sowie ein entsprechender Workflow wurden erfolgreich implementiert (vergl. Punkt 3. zu codon-optimierter cDNA) und bereits erste Varianten biophysikalisch auf dem HTS System charakterisiert. Diese Daten können die später gewonnenen Daten von den individuellen iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren der Patienten erheblich bereichern, weil so ein Vergleich zwischen einer isolierten Betrachtung der singulären Natriumkanalmutation (im heterologen System) und der Gesamtheit aller Kanalvarianten eines Patienten (in den iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren) möglich ist. Dies stellt einen klaren Mehrwert dar.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Reprogrammierung der Patient:innenzellen und Qualitätskontrolle

Im Rahmen von P2T konnten wir folgende, in der Tabelle dargestellten Patient:innen Zellen reprogrammieren:

Precision2Treat iPSC					
Study-ID	Pseudonym	Group:	Match	Sex (f/m)	Age of blood draw
		SFN / CIP / Control			(Years)
iPS Neuro_008	B009	SFN		m	44
iPS Neuro_009	B010	CIP		m	6
iPS Neuro_010	B011	Control	mother of B010	f	39
iPS Neuro_011	B012	SFN		m	57
iPS Neuro_017	B013	SFN		m	39
iPS Neuro_018	B014	SFN		f	33
iPS Neuro_019	B015	Control	suitable to B014 and B016	f	32
iPS Neuro_020	B016	PEPD		f	35
B2T-106	B2T-106	SFN		w	47
B2T-126	B2T-126	Control		m	64

Tabelle1: Darstellung aller reprogrammierten iPSC-Linien für P2T. Mit dieser Auswahl an Zellen haben wir sichergestellt, dass wir nicht nur eine gute Streuung von männlichen und weiblichen PatientInnen inkludieren, sondern auch die passenden Kontrollen. Die ausgewählten Patient:innen sind teilweise Träger von Varianten, teilweise jedoch auch nicht, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass wir Daten erheben werden, die auch für die Bevölkerungsteile relevant sein können, die keine Varianten tragen, aber dennoch SFN entwickeln. Dies ist die Mehrzahl der SFN Patient:innen.

Ein besonders hervorzuhebender Patient ist B016, der an der extrem seltenen peripheren Neuropathie namens Chronic Insensitivity to Pain (CIP) leidet. Durch unsere internationalen Kontakte und die Förderung durch P2T war es möglich, diesen Patienten aus den USA nach Deutschland zu holen und in diese Studie einzuschließen. Diese Zellen bieten uns die einmalige Möglichkeit, nun genau an den Zellen des Patienten mit all seinen Varianten und genetischen Eigenschaften, die Auswirkungen seiner Mutationen zu untersuchen. Das ist ein wesentlicher Gewinn für dieses Projekt, aber auch für die Wissenschaft im Allgemeinen.

Die in- und externe Qualitätskontrolle ergab, dass wir pro Patient:in 3 Klone (10 x 3 = 30 Klone insgesamt) gewinnen konnten, die keine genetische Aberration tragen, die Mykoplasmen und HIV negativ sind, und die alle in ersten Andifferenzierungen zu sensorischen Neuronen gute Ergebnisse erzielt haben.

Anschaffung einer Substanzbibliothek

Wir haben erfolgreich die Pharmakon-1760 Substanzbibliothek (MicroSource Discovery Systems Inc., USA) angeschafft, die 1760 Substanzen (zugelassene Arzneimittelwirkstoffe FDA und EMA) enthält, und die wir mit einem komplexen Pipetierschema, das wir eigens hierfür detailliert anpassen mussten, auf Substanzplatten umpipettiert haben, die im Qube HTS-System verwendet werden können.

Differenzierung von iPSCs zu iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren und deren Dissoziation

Wie in Abbildung 1 exemplarisch dargestellt konnten wir alle Klone erfolgreich zu sensorischen Neuronen differenzieren. Wir haben die Anzahl der ausgesäten Zellen angepasst und verschiedenen Faktoren im Medium angepasst. Um sicher zu gehen, möglichst reife Neurone zu erhalten, haben wir erst an Tag 65 mit den Messungen begonnen und weiter zwischen Tag 70 und 85 gemessen. Immunfärbungen an Tag 78 zeigen, dass wir Peripherin-positive, sensorische Neurone erhalten haben (vergl. Abb. 1 C).

Sobald die Zellen ausreichend differenziert waren, stellte die Dissoziation eine Herausforderung dar, da die Zellen durch ihre langen Ausläufer sehr empfindlich sind. Hierzu haben wir das Protokoll angepasst und mit dem in Abb. 2 dargestellten Verfahren konnten wir gute Ergebnisse erzielen.

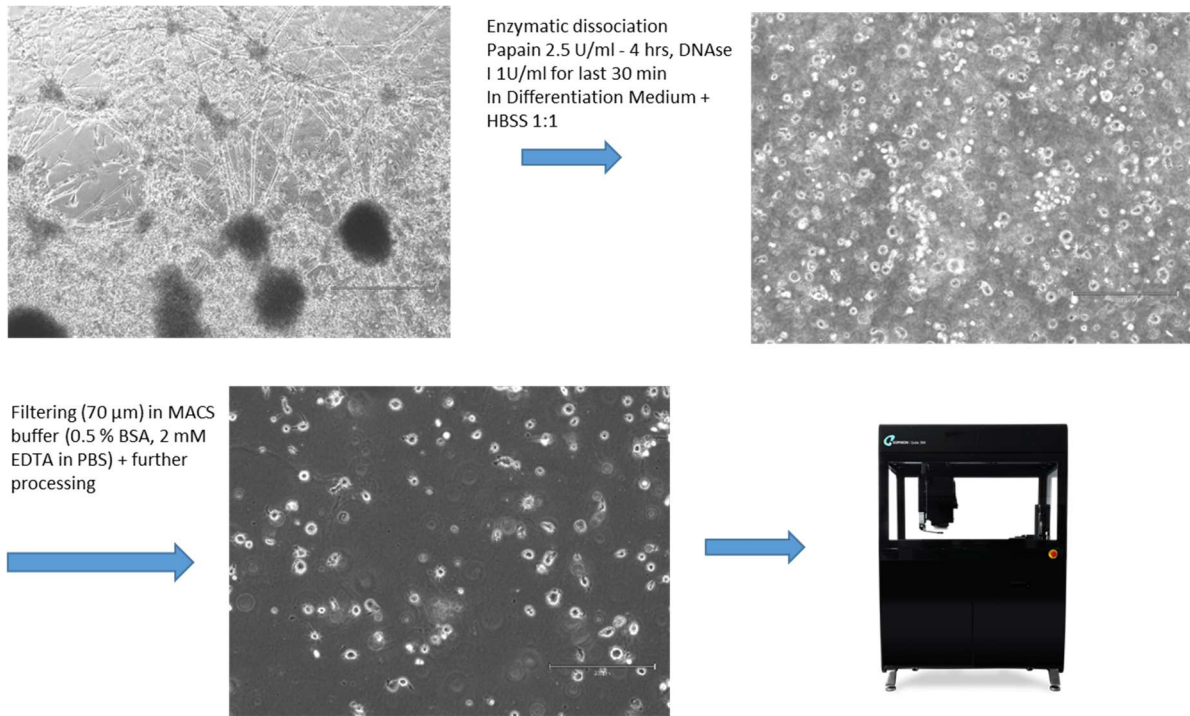


Abbildung 2: Darstellung des entwickelten Protokolls zur Dissoziation von iPSC abgeleiteten sensorischen Neuronen für die Verwendung auf dem HTS-System Qube.

Messung, Optimierung der Messung und Analyse der zellulären Aktivität von iPSC abgeleiteten sensorischen Neuronen mittels Current clamp Elektrophysiologie auf dem HTS-System Qube

In ersten Versuchen konnte nur eine sehr geringe Effizienz erreicht werden, und kein Aktionspotential (AP) gemessen werden (Abb. 3A). Nach Optimierung der Differenzierung und Dissoziation hingegen, konnte die Effizienz auf bis zu 20% gesteigert werden (Abb. 3B)

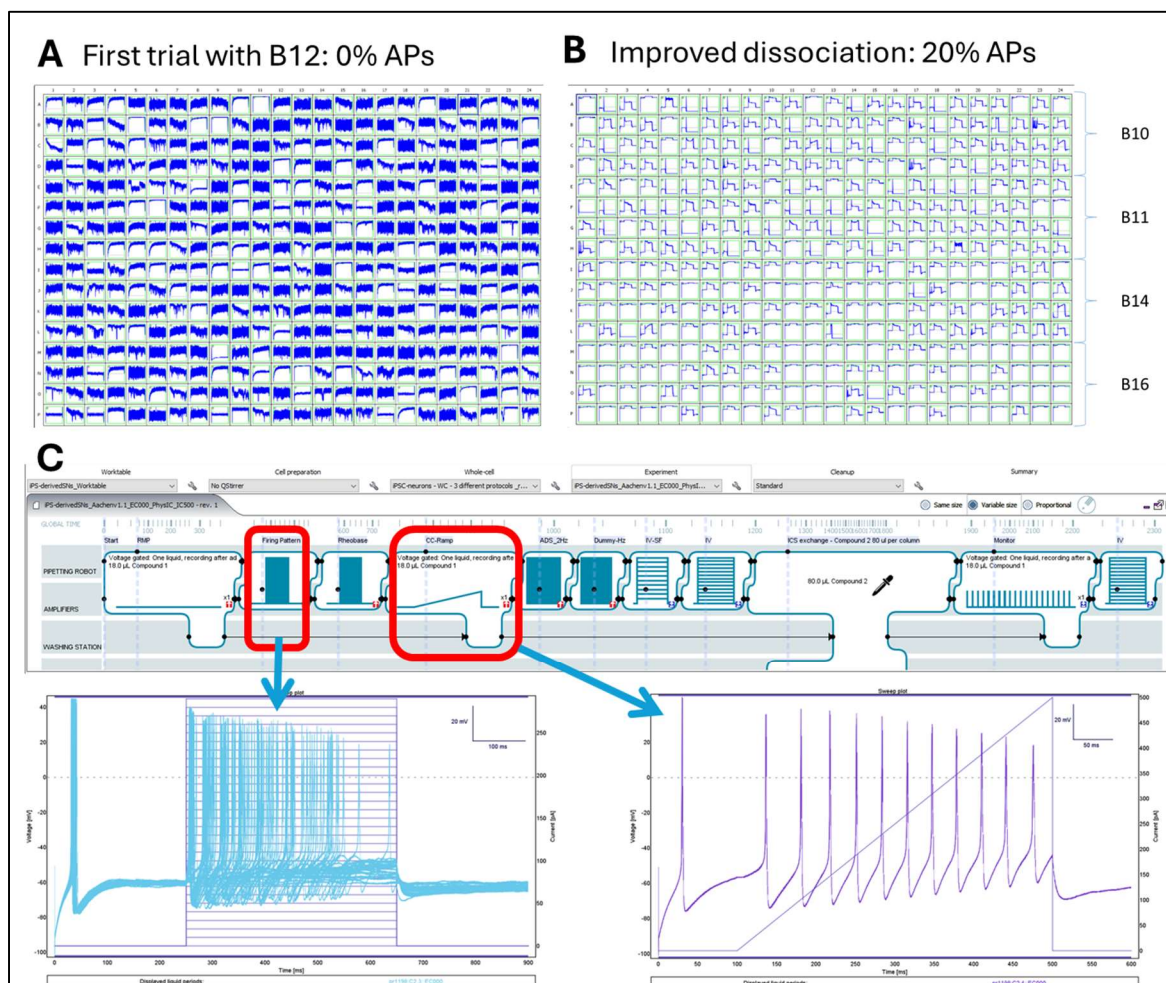


Abbildung 3: Current-Clamp Messungen der neuronalen Aktivität von iPSC-abgeleiteten sensorischen Neuronen auf dem HTS-System Qube. A: zu Beginn war die Ausbeute von gemessenen Aktionspotentialen sehr gering. B: nach Optimierung konnte die Effizienz auf bis zu 20% gesteigert werden. C: Beispiel von APs als Antwort auf Spannungssprünge (links) oder Spannungsrampe (rechts).

Die Analyse der Messungen ergab, dass auch wiederholtes Differenzieren zu vergleichbaren, reproduzierbaren Ergebnissen führt. In Abbildung 4 ist die vorläufige Auswertung dargestellt. Die gemessenen Neurone zeigen Reife, was sich in einem negativen Ruhemembranpotential (RMP) zeigt (Abb. 4A). Wichtige Parameter der APs, wie AP Größe, Hyperpolarisation nach einem AP und der Schwellenwert (Abb. 4B) sind zwischen Zelllinien (und damit Patient:innen) und Differenzierungen vergleichbar. Die AP Dauer hingegen zeigte eine höhere Variabilität (Abb. 4C), die aber auf Grund der noch andauernden Analysen und Messungen noch nicht eindeutig bewertet werden kann. Es ist möglich, dass sich hier Patient:innen spezifische Eigenschaften manifestieren, oder aber, dass sich die Heterogenität der differenzierten sensorischen Neurone zeigt. Die aktuell laufenden Differenzierungen und Messungen werden hier voraussichtlich Aufschluss geben.

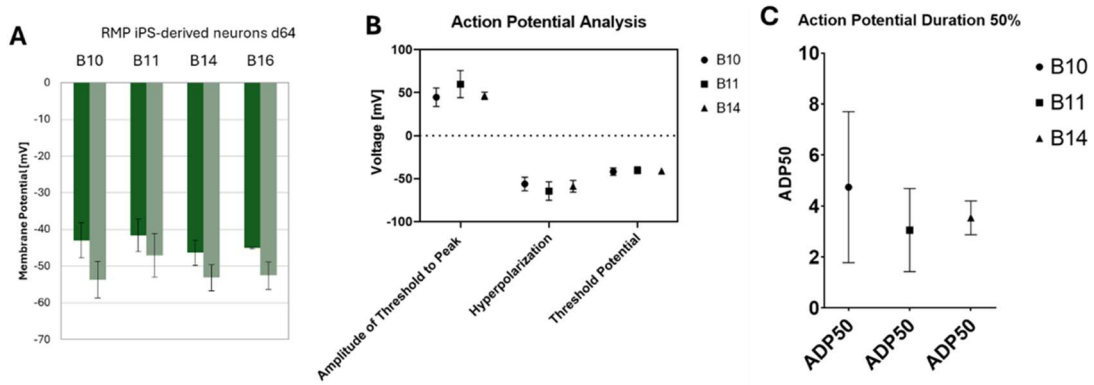


Abbildung 4: Analyse der Aktionspotential-Messungen an Tag 64 von drei Zelllinien. A: Ruhemembranpotential zeigt Reife der Neurone. B: AP Amplitude, Nachhyperpolarisation und AP Schwelle. C: AP Dauer in ms in der Mitte des APs. Die Messungen zeigen, dass wir in verschiedenen Zelllinien und Differenzierungen sehr reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

Messung und Analyse der zellulären Aktivität von iPSC abgeleiteten sensorischen Neuronen im Voltage clamp Modus.

Da einige der eingeschlossenen Patient:innen Natriumkanal-Varianten tragen, war es von großem Interesse für uns, spannungsgesteuerte Natriumkanäle im Voltage-clamp Modus auf dem HTS-System Qube zu messen. Hierfür mussten die intrazellulären Lösungen angepasst werden und die Protokolle an die speziellen Anforderungen der Zellen angepasst werden (Abb. 5A). Mit diesen Anpassungen war es uns möglich, gut geklemmte spannungs-abhängige Natriumkanäle in iPSC abgeleiteten sensorischen Neuronen auf dem Qube zu messen (Abb. 5B-D). Dies ist auch in der Literatur für reife Neurone an Tag 64 bisher nicht beschrieben und eröffnet neue Möglichkeiten des Kanalspezifischen Medikamenten-Screenings, das weit über das aktuelle Projekt hinauswirken wird.

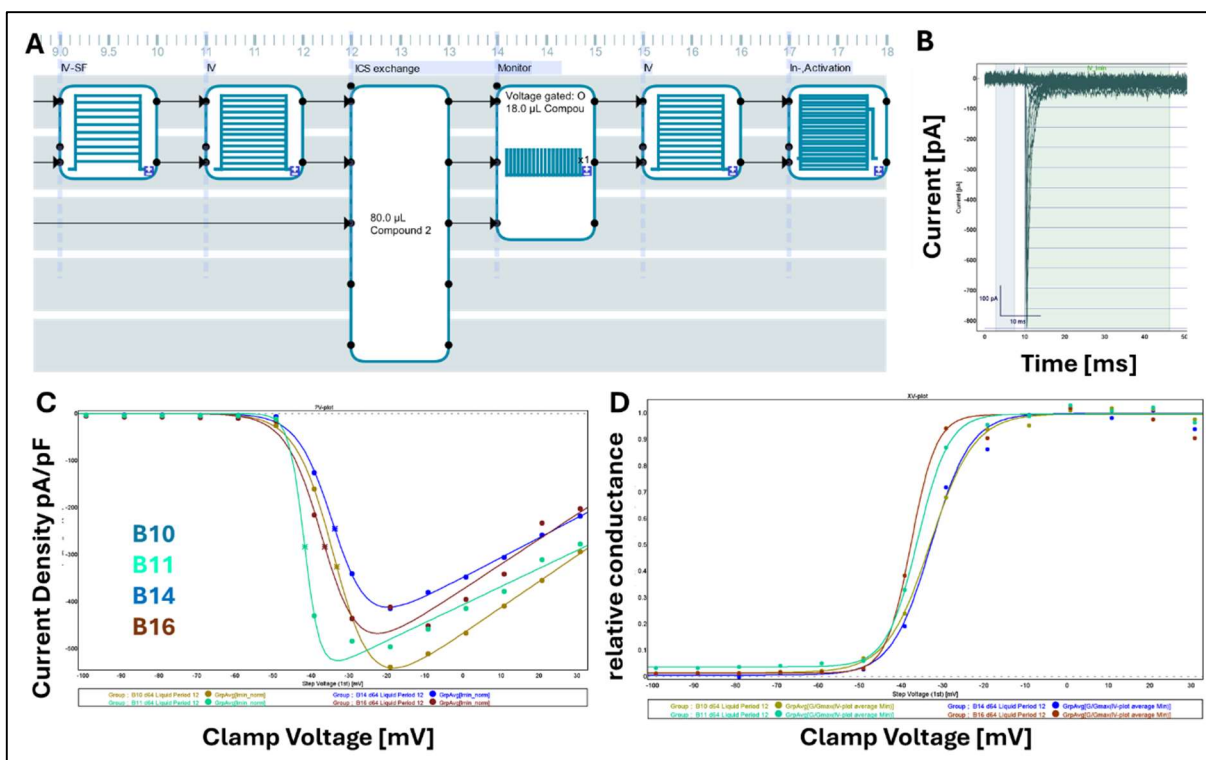


Abbildung 5: Voltage-clamp Messungen von iPSC-abgeleiteten sensorischen Neuronen an Tag 64 auf dem HTS-System Qube. A: Protokolldesign, ausgelegt für anschließendes Drug Screening. B: Beispiel einer Familie von Stromaufnahmen mit dem ersten Protokoll dargestellt in A. Ein großer, schnell schaltender Strom ist sichtbar, der typisch für eine gut geklemmte, qualitativ hochwertige Messung eines spannungsgesteuerten Natriumkanals ist. C: Stromdichte abgetragen über der angelegten Spannung. D: Relative Leitfähigkeit der gemessenen Natriumströme.

Aufgrund der administrativen Verzögerungen (siehe oben), sind wir im Projekt noch nicht so weit, dass wir das geplante Substanzscreening an iPSC-abgeleiteten sensorischen Neuronen durchführen konnten. Allerdings sind die Vorbereitungen auf sehr gutem Wege und wir arbeiten weiterhin an dem Projekt, um die Ziele zu erreichen. Dies verwirklichen wir u.a. durch core-funding. Wir sind zuversichtlich, dass wir in den nächsten Monaten ersten Ergebnisse zum individuellen Ansprechen auf getestete Medikamente gewinnen können und diese, dem geplanten Projekt entsprechend, auswerten und anwenden können werden. Die inzwischen gut etablierten Protokolle bzw. der Workflow in Zusammenhang mit den Messungen der Neurone auf dem HTS-System Qube und die erlangte Erfahrung in der Nutzung des Qube machen die Umsetzung aller Projektziele in den kommenden Monaten sehr wahrscheinlich.

Untersuchung von heterolog exprimierten NaV1.7 Varianten

Wie im vorherigen Kapitel dargestellt, zeigte sich die Optimierung der Differenzierung von iPSCs zu Neuronen als (zeit)aufwendig. Um Varianten der Natriumkanäle NaV1.7, die bei Patienten in unserer Kohorte von Schmerzpatienten gefunden wurden, biophysikalisch untersuchen zu können, sollten diese auch heterolog in HEK293 Zellen exprimiert werden. Bei der Herstellung von cDNA-Konstrukten, die zur Expression des NaV1.7 Proteins in Säugetierzellen geeignet sind, aber auch bei der Handhabung der für den NaV1.7 kodierenden cDNA selbst, besteht das Problem, dass die NaV1.7 kodierenden cDNA nicht gut in E. coli Bakterien propagiert werden kann, bzw. diese cDNA vermutlich toxische RNA in Bakterien verursachen kann (wie auch für den NaV1.1 zutreffend, vergl. (DeKeyser et al., 2021)). Hierdurch ergeben sich methodische Einschränkungen, weil (i) die Temperatur zum Bakterienwachstum reduziert werden muss, um diese vital zu halten und (ii) trotzdem die meisten Klone dieser Bakterien fehlerhafte cDNA beinhalten. Um dies zu umgehen und die Herstellung von NaV1.7 Expressions-Zelllinien zu forcieren, haben wir die den NaV1.7 kodierende cDNA gezielt verändert, um die „Klonierbarkeit“ zu verbessern. In Anlehnung an eine Publikation in der die NaV1.1 kodierende cDNA optimiert wurde (Bertelli et al., 2019), haben wir die NaV1.7 kodierende cDNA (SCN9A Gen) an die des NaV1.5 (SCN5A Gen; diese cDNA lässt sich gut in E.coli propagieren) angepasst. Hierzu haben wir die von Bertelli et. al. veröffentlichte Codon-Optimierungsstrategie verwendet. Es wurde zunächst die Aminosäuresequenzen von SCN9A und SCN5A abgeglichen und dann wurde für jede Position, an der die gleiche Aminosäure in SCN9A und SCN5A vorhanden war, das entsprechende Codon der SCN9A cDNA-Sequenz durch das Codon der SCN5A ersetzt. Für alle anderen Aminosäuren wurde das in SCN9A vorhandene Codon durch das synonyme Codon ersetzt, das dem entsprechenden SCN5A-Codon am ähnlichsten ist, sofern möglich. Dieses Verfahren der Codonoptimierung ist in Abb. 6 dargestellt.

SCN5A	⁷ P	R	G	T	S	S	F	R	R	F	T
	¹⁹ cct	cgg	ggc	acc	agc	agc	ttc	cgc	agg	ttc	aca
SCN9A	⁸ P	P	G	P	Q	S	F	V	H	F	T
	¹⁶ ccc	cca	gga	cct	cag	agc	ttt	gtc	cat	ttc	aca

↓ **codon optimization** ↓

SCN9A ^{cod.opt.}	¹⁶ cct	cgg	ggc	ccc	cag	agc	ttc	gtc	cat	ttc	aca
	⁸ P	P	G	P	Q	S	F	V	H	F	T

Abbildung 6: Strategie der Codon-Optimierung. Abgleich der Aminosäure- und Nukleotidsequenzen von SCN5A und SCN9A. Zur Optimierung wurden die Codons von SCN9A denen von SCN5A ähnlicher gemacht, ohne die Proteinsequenz von SCN9A zu verändern. Die optimierte Nukleotidsequenz des optimierten SCN9A (SCN9A^{cod.opt.}) ist unten dargestellt, wobei die geänderten Nukleotide gelb hervorgehoben sind.

Die resultierende Nukleotidsequenz wurde kommerziell synthetisch hergestellt und durch uns in einen Expressionsvektor umkloniert. Wie erwartet und entsprechend der publizierten Daten für die SCN1A DNA (Bertelli et al., 2019) zeigte sich die codon-optimierte SCN9A cDNA (kodierend für den NaV1.7) als effizient in E. coli propagierbar und gut klonierbar. Hierdurch ist es uns gelungen, einen Workflow zu etablieren, mit dem in wenigen Wochen (üblicherweise 4-5) stabile, isogene Expressionszelllinien für NaV1.7 Varianten hergestellt werden können. Inzwischen wurden zahlreiche stabile, isogene Expressionszelllinien hergestellt (u.a. NaV1.7/M899I; NaV1.7/Q875E; NaV1.7/Y990C) und mittels des HTS Systems elektrophysiologisch untersucht. Mit diesem Ansatz konnten wir auch bereits ein Arzneimittelscreening an einer Patienten-Variante durchführen.

Exemplarisch sind nachfolgend Ergebnisse der biophysikalischen und pharmakologischen Charakterisierung der NaV1.7/Y990C Variante eines Patienten mit Small Fiber Neuropathie (SFN) aus unserer Kohorte in Aachen dargestellt (Abb 7). Hier zeigt sich, dass die Aktivierungskurve des NaV1.7/Y990C gegenüber dem WT etwas linksverschoben (hyperpolarisierte Aktivierung) ist, was für einen gain-of-function Phänotyp sprechen könnte, der zu Schmerzsyndromen passen kann (Abb. 7B, C). Allerdings zeigten bei diesen Analysen die Zellen des NaV1.7/Y990C gegenüber dem WT eine deutlich höhere Stromdichte (Abb. 7A), was die Aktivierungskurve ähnlich beeinflussen kann, weil die Spannungsklemme bei hohen Stromdichten weniger verlässlich sein kann. Dies wird derzeit weiter untersucht.

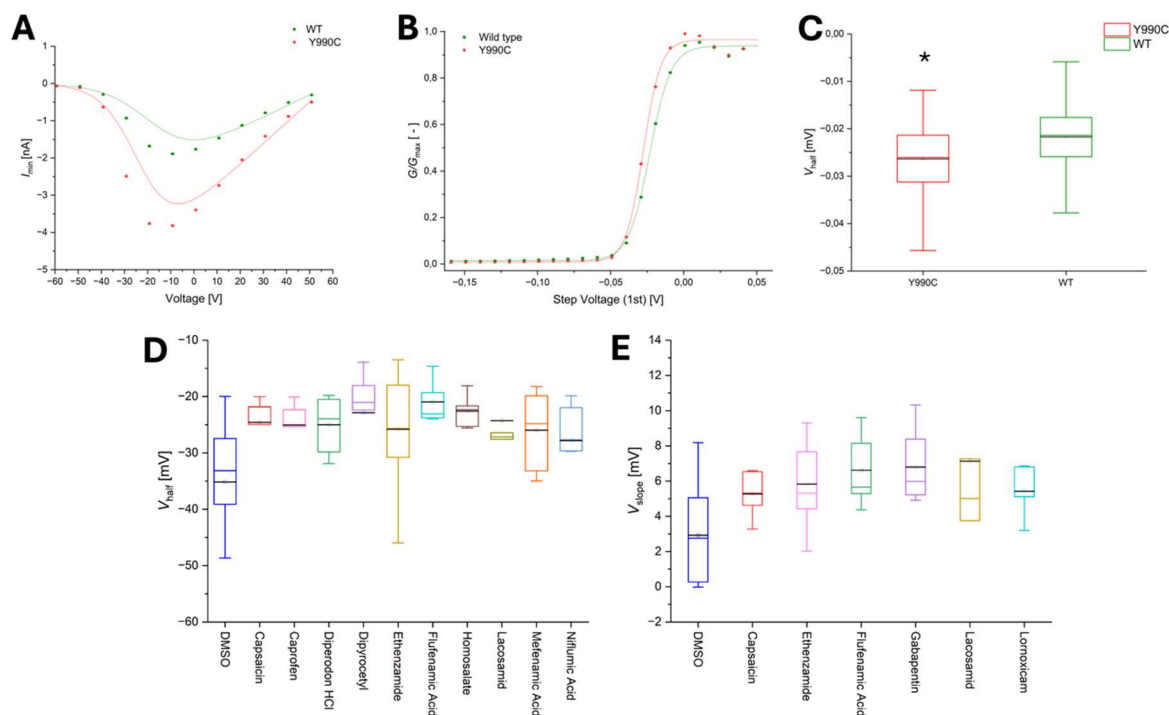


Abbildung 7: Biophysikalische Charakterisierung und Arzneimittel-Screening der Nav1.7/Y990C Variante mit HTS auf dem Qube. A: Strom-Spannungs-Kurve für WT Nav1.7 (grün) und die Y990C variante (rot) zeigt einen größeren Strom für die Variante. B: Leitfähigkeit-Spannungsdiagramm zeigt eine Linksverschiebung der Spannungsabhängigkeit für die Variante. C: Spannung der halbmaximalen Aktivierung für die Nav1.7/Y990C Variante im Vergleich zu WT. * kennzeichnet eine signifikante Änderung im Vergleich zu WT ($p < 0,05$). D: Effekt der auf der X-Achse aufgeführten Medikamente (Wirkstoffe) auf die Halbmaximale Aktivierung der Nav1.7/Y990C Variante. E: Effekt der auf der X-Achse aufgeführten Medikamente (Wirkstoffe) auf die Steigung der Aktivierungskurve der Nav1.7/Y990C Variante.

Auch konnte diese Zelllinie genutzt werden, um die Wirkung von über 90 zugelassenen Arzneimittel-Wirkstoffen (mit bekannter Wirkung auf das ZNS) auf die Funktion der Nav1.7/Y990C Variante zu untersuchen. Hier zeigten einige Wirkstoffe gegenüber der Kontrolle (DMSO) einen Einfluss auf die Aktivierungsparameter (Abb. 7D, E), der den Varianten-induzierten Effekt entgegnet.

Diese Daten können die später gewonnenen Daten von den individuellen iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren der Patienten erheblich bereichern, weil so ein Vergleich zwischen einer isolierten Betrachtung der singulären Natriumkanalmutation (im heterologen HEK293 System) und der Gesamtheit aller Kanalvarianten eines Patienten (in den iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren) möglich ist. Dies stellt einen klaren Mehrwert dar. Auch hier machen die inzwischen gut etablierten Protokolle bzw. der Workflow in Zusammenhang mit den Messungen der heterolog exprimierten Natriumkanal Varianten auf dem HTS-System Qube und die erlangte Erfahrung in der Nutzung des Qube die Ergänzung der Projektziele mit diesen Untersuchungen in den kommenden Monaten sehr wahrscheinlich.

Ergänzende Darstellungen

1. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Kostenplanung. Die ursprüngliche Planung sah entsprechend dem Zuwendungsbescheid vor, dass folgende Finanzmittel verausgabt werden sollen:

Finanzaufstellung	Finanzmittel, €
Hoch-Durchsatz-Elektrophysiologie-Gerät, Sophion Qube	877.340
Zubehör (Mess-Chips und Verbrauchsmaterial, Substanzbibliothek zugl. Arzneistoffe (Pharmakon-collection))	324.870
Vergabe von Aufträgen (Reprogrammierung von Patienten-Zellen zu iPSCs)	105.000
Postdoc Differenzierung, HT-E'phys, Screening u. Auswertung	65.900
Technische Assistent:in für Zellkultur, HT-E'phys, Screening	47.880
Summe	1.420.990
Projektpauschale	284.198
Summe gesamt, inkl. Projektpauschale	1.705.188 €

Die tatsächlichen Kosten für die Anschaffung des Hoch-Durchsatz-Elektrophysiologie-Gerät Sophion Qube inkl. Vorrat an Mess-Chips und Installation entsprachen den geplanten Ausgaben. Abweichend von den initial geplanten Ausgaben wurden, mit Zustimmung des ZG, Ausgaben für Personal (technische Assistent:in) umgewidmet, da (i) diese Stelle nicht besetzt werden konnte und (ii) sich die Kosten für Verbrauchsmaterialien erhöht haben. Weitere, mit Zustimmung des ZG aus den Personalkosten umgewidmete Mittel wurden für Verbrauchsmittel und studentische Hilfskräfte verwendet. Die größten Posten bei den Verbrauchsmitteln waren Kosten für Sequenzierungsreagenzien für genetische Untersuchungen von Patienten aus der Kohorte von Schmerzpatienten (zur Vorbereitung der Reprogrammierung von iPSCs) sowie von diesen gewonnenen Zellen. Die Kosten für die Beschaffung der Substanzbibliothek beliefen sich inkl. Einfuhrumsatzsteuer, Kosten für die Zollabwicklung und Einfuhr sowie Transport auf Trockeneis auf ~29.070 € statt der initial veranschlagten 20.000 €. Des weiteren wurden, mit Zustimmung des ZG, Reisekosten einer amerikanischen Familie eines minderjährigen Schmerzpatienten zur genetischen und tiefgreifenden klinischen Untersuchung, und zur Gewinnung der Stammzellen in Aachen verausgabt.

Arbeits- und Zeitplan. Wie bereits bei den Inhalten zuvor dargestellt, kam es aufgrund der Notwendigkeit einer zweimaligen Ausschreibung des Hochdurchsatz-Elektrophysiologie-Gerätes (HTS System) es zu einer erheblich verzögerten Geräteinstallation. Sie erfolgte erst im Oktober 2023 und das Gerät konnte erst ab Ende Oktober 2023 genutzt werden. Initial sah die zeitliche Planung vor, dass ab Juni 2023 die biophysikalischen Charakterisierungen mittels Hochdurchsatz-Elektrophysiologie und ab August 2023 das Wirkstoffscreening (Hochdurchsatzscreening, HTS) erfolgen soll (vergl. Zeitplan aus der Projektbeschreibung oben).

Neben der verzögerten Beschaffung/Installation des HTS-Systems unterlag auch die Reprogrammierung der Patienten-eigenen Zellen von den 10 Schmerzpatienten (bzw. einzelner Kontrollen) einer Verzögerung. Diese am Helmholtz Zentrum in München erfolgten Auftragsarbeiten (verl. Posten Auftragsvergabe bei Finanzmitteln) mussten wegen zu hoher Auslastung der Facility in zwei Chargen erfolgen und einige Klone benötigten längere Zeit, um die erforderliche Virusfreiheit (Sendai-Virus) vor Übergabe der jeweils drei Klone von iPSCs jedes Patienten sicherzustellen. Um dem veränderten Zeitplan gerecht zu werden, wurde Ende 2023 eine kostenneutrale Projektverlängerung bis zum 31.03.2024 beantragt und seitens des ZG bewilligt.

Wegen der protrahierten Optimierung der Differenzierung von iPSC zu iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren wurde zur Kompensation bzw. als fall back Strategie eine heterologe Expression von Natriumkanal NaV1.7 Varianten in HEK293 Zellen begonnen, erfolgreich implementiert (vergl. Punkt 3. zu codon-optimierter cDNA) und bereits erste Varianten biophysikalisch auf dem HTS-System charakterisiert. Details sowie eine Darstellung des Mehrwertes ist weiter oben bei den Inhalten dargestellt.

2. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die geplanten Ziele waren innerhalb der Projektlaufzeit nur teilweise erreichbar, da (i) das Großgerät nicht fristgerecht geliefert werden konnte, (ii) die externe Reprogrammierung der iPSCs länger dauerte und (iii) die Optimierung der Differenzierung der iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren wesentlich zeitaufwendiger war. Details wurden bereits oben dargestellt. Trotz dieser Probleme konnte das Hauptziel umgesetzt werden und iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren von sechs Patienten auf dem HTS System Qube untersucht werden, nachdem diese für HTS nutzbar gemacht werden konnten. Hierdurch kann man feststellen, dass nun ein Workflow zur *in vitro* Untersuchung von patienteneigenen Zellen mittels automatisiertem Patch-Clamp etabliert wurde, der in den folgenden Monaten, wegen der bereits vorhandene Ressourcen, noch den Abschluss aller Projektziele ermöglichen wird. Somit haben sich die Erfolgsaussichten nicht verändert, allerdings zeitlich verschoben. Das Projekt wird nun teilweise aus core-funding Mitteln finanziert. Die durchgeführten umfangreicheren Optimierungen der Differenzierungen der iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren bzw. die Optimierung der Zellpräparation dieser Zellen für die HTS-Analysen waren zwingend erforderlich, um das Ziel der effizienten Nutzbarmachung dieser Zellen für Hochdurchsatz-Elektrophysiologie zu ermöglichen.

3. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses - auch 4. konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Arbeiten für P2T stellen einen wesentlichen Schritt in Richtung Realisierung von personalisierter Medizin für chronische Schmerzpatienten dar. Mittelfristig ist geplant den P2T Ansatz zu Automatisieren und so einer Kommerzialisierung zuzuführen. Dazu sind wir im Gespräch mit dem Fraunhofer IPT, die die Betreiber der StemCellFactory in Nordrhein-Westfalen sind. Zusammen mit dem IPT schreiben wir aktuell an einem Antrag bei der Zukunftsagentur Rheinisches Revier, um die Verwertung der P2T Ergebnisse voranzutreiben.

4. Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen erfolgten

Uns sind keine neuen FE-Ergebnisse bekannt geworden, die unser Projekt gefährdet hätten und würden. Es gibt neue Publikationen zu Stammzell-abgeleiteten Neuronen (eine aus unserer Arbeitsgruppe (Kalia et al., 2024), eine externe (Ghovanloo et al., 2023)) auf einem Hochdurchsatz-Elektrophysiologie Gerät, die unser Vorhaben allerdings technisch eher weiterbringen, da sie zwar eine ähnliche Technik, nicht aber dieselbe Fragestellung bearbeiten. Die externe Publikation wurde bereits bei den Inhalten weiter oben dargestellt. Hauptunterschied, ist, dass in der externen Arbeit von Ghovanloo und Kollegen statt humanen, von Patienten stammenden, iPSC-abgeleiteten Nozizeptoren (wie bei uns), ausschließlich primär präparierte DRG-Neurone von Mäusen untersucht wurden. Hier gehen unsere Untersuchungen hinsichtlich des Potentials für künftige Präzisionstherapien weit darüber hinaus.

5. geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Bereits veröffentlicht:

Vergleich zweier Differenzierungsmethoden von iPSC zu sensorischen Neuronen und deren Qualitätskontrolle (Expression des wesentlichen Natriumkanals Nav1.7):

- Kalia, A. K., Rösseler, C., Granja-Vazquez, R., Ahmad, A., Pancrazio, J. J., Neureiter, A., Zhang, M., Sauter, D., Vetter, I., Andersson, A., Dussor, G., Price, T. J., Kolber, B. J., Truong, V., Walsh, P., & Lampert, A. (2024). How to differentiate induced pluripotent stem cells into sensory neurons for disease modelling: A functional assessment. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03696-2>
- Liu Y., Balaji R., Szymanski de Toledo M., Ernst S., Hautvast P., Kesdoğan A., Körner J., Zenke M., Neureiter A., Lampert A. (2024). The pain target Nav1.7 is expressed late during human iPS cell differentiation into sensory neurons as determined in high-resolution imaging. *Pflugers Arch - Eur J Physiology, Sensory Physiology*, 476. <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02945-w>

Geplante Veröffentlichung:

- Kodon-Optimierung von Nav1.7 als Tool für Hochdurchsatz-Screening von Patientenspezifischen Schmerz-relevanten Kanalmutationen
- Charakterisierung und Medikamenten Screening von Neuropathie-Patienten-abgeleiteten sensorischen Neuronen.

Referenzen:

- Bertelli, S., Barbieri, R., Pusch, M., & Gavazzo, P. (2019). Gain of function of sporadic/familial hemiplegic migraine-causing SCN1A mutations: Use of an optimized cDNA. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*, 39(4), 477–488. <https://doi.org/10.1177/0333102418788336>
- DeKeyser, J.-M., Thompson, C. H., & George, A. L. (2021). Cryptic prokaryotic promoters explain instability of recombinant neuronal sodium channels in bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100298. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100298>

- Ghovanloo, M.-R., Tyagi, S., Zhao, P., Kiziltug, E., Estacion, M., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2023). High-throughput combined voltage-clamp/current-clamp analysis of freshly isolated neurons. *Cell Reports Methods*, 3(1), 100385. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100385>
- Kalia, A. K., Rösseler, C., Granja-Vazquez, R., Ahmad, A., Pancrazio, J. J., Neureiter, A., Zhang, M., Sauter, D., Vetter, I., Andersson, A., Dussor, G., Price, T. J., Kolber, B. J., Truong, V., Walsh, P., & Lampert, A. (2024). How to differentiate induced pluripotent stem cells into sensory neurons for disease modelling: A functional assessment. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03696-2>
- Liu, Y., Balaji, R., de Toledo, M. A. S., Ernst, S., Hautvast, P., Kesdoğan, A. B., Körner, J., Zenke, M., Neureiter, A., & Lampert, A. (2024). The pain target NaV1.7 is expressed late during human iPS cell differentiation into sensory neurons as determined in high-resolution imaging. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 476(6), 975–992. <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02945-w>
- Schrenk-Siemens, K., Pohle, J., Rostock, C., Abd El Hay, M., Lam, R. M., Szczot, M., Lu, S., Chesler, A. T., & Siemens, J. (2022). Human Stem Cell-Derived TRPV1-Positive Sensory Neurons: A New Tool to Study Mechanisms of Sensitization. *Cells*, 11(18), 2905. <https://doi.org/10.3390/cells11182905>