

A zebrafish model of small-fiber neuropathy

Citation for published version (APA):

Eijkenboom, I. (2019). *A zebrafish model of small-fiber neuropathy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. ProefschriftMaken Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20190222ie>

Document status and date:

Published: 01/01/2019

DOI:

[10.26481/dis.20190222ie](https://doi.org/10.26481/dis.20190222ie)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Patiënten met dunnevezel neuropathie (DVN) hebben last van een lengte afhankelijke neuropathische pijn. Deze pijn wordt veroorzaakt door het disfunctioneren en de degeneratie van de dun gemyeliniseerde A δ en de niet gemyeliniseerde C-fibers (**Hoofdstuk 1**). Deze pijn symptomen kunnen spontaan zijn (bijv. brandend, diep). Maar ook veroorzaakt worden door onschuldige stimuli (bijv. lichte aanraking of druk, warm en koud water). De diagnose DVN wordt gesteld aan de hand van het typisch klinisch beeld horend bij deze aandoening en een afwijkende temperatuurgevoeligheid gemeten met temperatuurdrempel onderzoek en/of een verminderd aantal dunne vezels in de huid bepaald in een huidbiopt. Genetische varianten in *SCN9A*, *SCN10A* en *SCN11A* die resulteren in een *Gain-of-function* van het kanaal en daardoor de gevoeligheid van de sensorische neuronen veranderen worden beschouwd als een van de onderliggende oorzaken. Tot op heden zijn er geen data van genotype-fenotype correlatie studies en is het nog altijd onbekend welk gedeelte van het klinisch beeld kan worden verklaard door varianten in deze 3 genen. Dit laatst genoemde vereist ook het bestuderen van de pathofysiologische mechanismes zowel *in vitro* als *in vivo*. Aangezien de huidige methodes voor het classificeren van genetische varianten in deze 3 genen niet een voldoende en efficiënte doorvoer hebben, een ideaal model hiervoor zou bij voorkeur dus een gemiddelde of hoge doorvoer hebben voor het testen van genetische varianten, onderzoeken we of de zebravis een geschikt model zou zijn die aan deze eisen zouden kunnen voldoen. Daarnaast kan dergelijk model gebruikt worden voor het testen van andere mogelijke oorzaken van de ziekte.

De specifieke doelen van deze thesis zijn:

- 1. Het bepalen van de variant frequentie van *SCN9A*, *SCN10A* en *SCN11A*, in een grote cohort met 1139 patiënten met DVN. Daarnaast zal er onderzocht worden of er verbanden bestaan tussen karakteristieke symptomen van DVN en het dragen van genetische varianten in een van deze 3 genen.**
- 2. Het opzetten van assays in de zebravis die overeenkomen met belangrijke klinische aspecten van DVN en waardoor het dus mogelijk wordt om genetische varianten met dit zebravis model te testen.**
- 3. Het toepassen van deze assays voor het testen van andere mechanismen die mogelijk een rol kunnen spelen in de ontwikkeling van DVN.**

De eerste pathogene varianten in *SCN9A* als oorzaak van DVN werden gerapporteerd in 2012. Deze studie beschreef een kleine cohort van 28 DVN patiënten. Sinds toen zijn ook varianten in *SCN10A* en *SCN11A* gerapporteerd als oorzaak van DVN. Ons doel was inzicht verschaffen in de variant frequentie van *SCN9A*, *SCN10A* en *SCN11A* in onze DVN patiënt populatie en het identificeren of bepaalde karakteristieke symptomen vaker voor komen bij dragers van genetische varianten in een van deze 3 genen (**Hoofdstuk 2**). Tussen September 2009 en januari 2017 zijn patiënten met DVN in het academisch ziekenhuis in Maastricht gescreend voor varianten in *SCN9A*, *SCN10A* en *SCN11A*. De aandoening DVN is gedefinieerd door een karakteristiek klinisch beeld in combinatie met een verminderde zenuwdichtheid in een huidbiopt en/of afwijkende waarde bij het temperatuur drempel onderzoek. Daarnaast zijn de dikke vezels in deze patiënten niet aangedaan. Genetische varianten geïdentificeerd in deze genen worden geclassificeerd volgens de richtlijnen beschreven door de *Association for Clinical Genetic Science* en eerder gepubliceerde aanbevelingen van Waxman. In onze studie zijn variant frequenties bepaald voor *SCN9A*, *SCN10A* and *SCN11A* (**Hoofdstuk 2**). Als volgt zijn DVN patiënten gegroepeerd op basis van de aanwezigheid van genetische varianten en zijn de klinische karakteristieken vergeleken. Van de 1139 DVN patiënten waren er 132 (11,6%) drager van 73 verschillende mogelijke pathogene varianten, waarvan 50 varianten nog niet beschreven zijn en 22 in meer dan 1 patient gevonden zijn. De variant frequentie was als volgt: 5,1% ($n=58/1139$) in *SCN9A*, 3,7% ($n=42/1139$) in *SCN10A*, en 2,9% ($n=33/1139$) in *SCN11A*. Alleen erytromelalgie en door warmte geïnduceerde pijn kwamen significant vaker voor in patiënten drager van een natriumkanal gen variant. Van de patiënten die naast DVN nog een andere aandoening hadden zijn er 15,1% die ook drager zijn van een genetische variant in een van deze 3 natriumkanalen. Deze aandoeningen waren onder andere: glucose intolerantie, immunologische aandoeningen, vitamine B12 deficiëntie, een voorgeschiedenis van chemotherapie, diabetes mellitus, alcohol misbruik en een monoklonale gammopathie van onbekende betekenis. Echter, het aantal patiënten per groep was niet groot genoeg voor het bestuderen van eventuele relaties tussen deze aandoeningen en de natrium kanaal varianten. Wij adviseren om bij alle DVN patiënten genetische screening van *SCN9A*, *SCN10A* en *SCN11A* te overwegen, onafhankelijk van klinische kenmerken of onderliggende aandoeningen. De identificatie van meer potentiële pathogene varianten geeft ons de mogelijkheid om correlaties te bestuderen tussen de natrium kanaal varianten en de andere onderliggende oorzaken. Dit helpt ons om beter de ziekte te begrijpen en patiënten met een dergelijke

aandoening die een hoog risico lopen om een neuropathie te ontwikkelen te identificeren. Een nadeel is ook dat het aantal varianten met een onzekere klinische significantie toe zal nemen. De identificatie van specifieke *hotspots* in deze genen, de aanwezigheid van dezelfde potentiële pathogene varianten in DVN patiënten of segregatie analyse kan dit probleem oplossen voor sommige van deze varianten. Echter, de huidige methodes om pathogeniciteit aan te tonen, zoals elektrofysiologie, zijn niet altijd (financieel) mogelijk of kunnen het hoge aantal varianten geïdentificeerd in deze patiënten niet bijhouden. Daarom is er behoefte aan een (*in vivo*) model dat in een hoge of medium doorvoer deze varianten kan testen.

De zebravis is een uitstekend model organisme voor neurologische ziekten dit mede door de vele overeenkomsten in neuro-anatomische opbouw tussen de zebravis en zoogdieren. Daarnaast is de zebravis een perfect model voor het testen van genetische varianten met een onzekere klinische significantie. Om te achterhalen of de zebravis een geschikt model is voor het testen van varianten in deze natrium kanalen hebben we als eerst de natrium kanalen in de zebravis bestudeerd. Dit hebben we gedaan door verschillende *in silico* analyses uit te voeren. In hoofdstuk 3 beschrijven we de overeenkomsten tussen de humane natriumkanalen en de zebravis natriumkanalen. Op basis van functioneel bewijs, expressie data en evolutionaire vergelijkingen, hebben we de hypothese opgesteld dat *scn8aa* of *scn1aa* soortgelijke functies kunnen bezitten als humaan *SCN9A*. Omdat we een test hebben opgezet waarmee we de temperatuur gevoeligheid van zebravis embryo's kunnen bepalen en dus symptomen van DVN kunnen aantonen (**Hoofdstuk 4**), hebben we zebravis embryo's met varianten die een *loss-of-function* van *scn1aa/scn8aa* veroorzaken getest. Deze experimenten hebben aangetoond dat *scn8aa* mutanten een significant verminderde reactie op verhoogde temperaturen hebben. Dit hebben we niet waargenomen voor mutanten met een *scn1aa loss-of-function* variant. Echter, was het niet mogelijk om het verlies te compenseren met humaan WT-*SCN9A*. Dit zou kunnen betekenen dat een ander humaan natrium kanaal, zoals *SCN8A*, hiervoor wel zou kunnen compenseren of dit toont juist aan dat er geen eenduidige 1:1 relatie bestaat tussen zebravis en de humane natrium kanalen, wat ook gesuggereerd werd door onze evolutionaire vergelijkingen. Een manier om dit verder te ontrafelen is door onderzoek te doen naar eiwitten die interacties aangaan met humaan *SCN9A* en dit te vergelijken met de eiwitten die interacties aangaan met *scn1aa* of *scn8aa*. Omdat we de orthologen van *SCN9A* niet konden identificeren, sluit dit het maken van transgene zebravismodellen uit. Echter, betekent dit niet dat humaan *SCN9A* niet functioneel zou kunnen zijn in de zebravis. Daarom

hebben we ervoor gekozen om humaan *SCN9A* en genetische varianten tot overexpressie te brengen in zebravis embryo's en de effecten te testen in onze DVN zebravis assay (**Hoofdstuk 4**). Deze assay bestaat uit 2 testen die overeenkomen met klinische aspecten van patiënten met DVN (**Doel 2**). Als eerste test bestuderen we de zenuwdichtheid en gebruiken we de transgene *sensory:GFP* zebravis lijn, waarbij alle sensorische neuronen met GFP gemarkeerd zijn. Als tweede test bepalen we de temperatuurgevoeligheid van de zebravis larven. Voor deze gedragsexperimenten hebben we een temperatuur gecontroleerd watercompartiment ontwikkeld. Dit stelt ons in staat om de gedragsreactie op temperatuurveranderingen te kwantificeren. Door deze 2 testen te gebruiken, hebben we aangetoond dat zebravis embryo's die tijdelijk de pathogene menselijke *SCN9A* p. (I228M) of p. (G856D) variant tot overexpressie brengen, beide een significant verminderde dichtheid van de dunne zenuwvezels hebben. Bovendien vertoonden larven die de p. (I228M) variant tot overexpressie brachten een significante toename in activiteit geïnduceerd door de temperatuursverandering. Aangezien deze kenmerken sterk lijken op de klinische kenmerken van DVN, suggereren onze gegevens dat tijdelijke overexpressie van mutant menselijk mRNA een model biedt voor DVN in de zebravis.

Dit ziekte model (**Hoofdstuk 4**) zou kunnen gebruikt worden voor het bestuderen van de pathofysiologie en voor het testen van therapeutische interventies. Bovendien, illustreren onze gegevens het potentieel van het gebruik van de zebravis als een model voor het testen van de pathogeniciteit van varianten die bij DVN-patiënten zijn geïdentificeerd (**Hoofdstuk 2**). Alhoewel, deze data veel belovend zijn is dit model nog niet toepasbaar in de diagnostiek. Er moeten eerst nog een aantal aanvullende tests worden uitgevoerd. Allereerst moeten meer bekende pathogene varianten (Tabel 1) worden getest. Dit zal de nauwkeurigheid om de pathogeniciteit met ons model te voorspellen aantonen, dit eventueel op basis van een of beide testen. Ten tweede, moeten niet-pathogene varianten worden opgenomen in de analyses dit zal informatie verschaffen over het aantal vals positieve-positieve uitkomsten. Aangezien het injecteren van WT-*SCN9A* cDNA niet de zenuwdichtheid en de temperatuurgevoeligheid verandert, lijkt dit veelbelovend. Als deze tests correct worden gevalideerd, kunnen varianten met onzekere klinische significantie worden getest om hun pathogeniciteit te bepalen. Deze zullen in eerste instantie moet worden opgevolgd door aanvullende tests om pathogeniciteit te bevestigen of uit te sluiten. In dit stadium hebben we

ons voornamelijk gericht op *SCN9A*, het eerste spanningsafhankelijke natriumkanal gelinkt aan DVN, een vergelijkbare opzet is mogelijk voor de twee andere natriumkanalen (*SCN10A* en *SCN11A*) die ook DVN veroorzaken. We hebben een lijst met (pathogene) varianten opgenomen die in ons model kunnen worden getest (Tabel 1). Het gebruik van transgene zebrafismodellen is een andere mogelijkheid. Zoals beschreven in deze thesis is het als gevolg van de evolutionaire verschillen tussen de menselijke en zebrafissen natriumkanalen echter nog niet mogelijk om de menselijke variant in een zebrafis natriumkanal na te bootsen. Als alternatief zou het menselijke gen kunnen worden geïntroduceerd in het zebrafisgenoom, maar problemen met (weefsel-) specifieke expressieniveaus zouden kunnen blijven bestaan. Het is ook tijdrovend en zou voor elke variant ten minste zes maanden kunnen duren. Dit is niet realistisch in de diagnostiek. Dus op dit moment beschouwen we overexpressie van menselijke spanningsafhankelijke natriumkanal varianten in zebrafis embryo's als de beste potentiële strategie om de pathogeniciteit te bepalen. Omdat pathogene varianten zich verschillend manifesteren bij mensen kan dit ook het geval zijn bij de zebrafis. Hoewel dit in eerste instantie een andere zorg van onze strategie lijkt kan het ook helpen bij het identificeren van aanvullende risicofactoren, triggers of beschermende factoren, die verschillend aanwezig zijn bij mensen en zebrafissen. Dit zou op termijn kunnen bijdragen aan nieuwe doelen voor preventie of therapie. Bovendien zou dit aanvullende inzichten kunnen verschaffen in de betrokken pathofysiologische mechanismen.

Tabel 1. Varianten in *SCN9A*, *SCN10A* en *SCN11A* die gebruikt zouden kunnen worden om het DVN model te valideren.

SCN9A varianten, Chr 2, GRCh37, NM_002977.3		Classificatie volgens de Waxman recommendations	Ref.
<i>c. positie</i>	<i>p. positie</i>		
c.1867G>A	p.(Asp623Asn)	Pathogene variant	(Faber et al., 2012a, Ahn et al., 2013)
c.2159T>A	p.(Ile720Lys)	Pathogene variant	(Faber et al., 2012a)
c.4596G>A	p.(Met1532Ile)	Waarschijnlijk Pathogene variant	(Faber et al., 2012a)
c.876C>T	p.(Thr292Thr)	SNP	-
c.1469G>A	p.(Ser490Asn)	SNP	-
SCN10A varianten, Chr3, GRCh37,NM_006514.2			
<i>c. positie</i>	<i>p. positie</i>		
c.4984G>A	p.(Gly1662Ser)	Pathogene variant	(Faber et al., 2012b)
c.3674T>C	p.(Ile1225Thr)	Waarschijnlijk Pathogene variant	-
c.3910G>A	p.(Ala1304Thr)	Waarschijnlijk Pathogene variant	(Faber et al., 2012b)
c.5116A>G	p.(Ile1706Val)	Waarschijnlijk Pathogene variant	(Huang et al., 2013)
c.2450G>A	p.(Arg817Gln)	SNP	-
c.2465C>T	p.(Ala822Val)	SNP	-
SCN11A varianten, Chr 3, GRCh37, NM_014139.2			
<i>c. positie</i>	<i>p. positie</i>		
c.1142T>C	p.(Ile381Thr)	Waarschijnlijk Pathogene variant	(Huang et al., 2014)
c.2095G>A	p.(Gly699Arg)	Waarschijnlijk Pathogene variant	(Han et al., 2015)
c.3473T>C	p.(Leu1158Pro)	Waarschijnlijk Pathogene variant	(Huang et al., 2014)
c.2522G>A	p.Arg814Gln	SNP	-
c.5124A>G	p.Glu1708Glu	SNP	-

c. positie, locatie cDNA; p. positie, locatie in eiwit; Ref, referenties. SNP, single nucleotide polymorphism. Classificatie volgens de Waxman recommendations (Waxman et al., 2014)

Zoals gedefinieerd in **doel 3**, hebben we onze assay gebruikt om andere mogelijke oorzaken die een rol in de ontwikkeling van DVN zouden kunnen spelen te onderzoeken (**Hoofdstuk 5**). Genetische varianten in genen die een belangrijke rol spelen in de *mitochondrial dynamics* (*fusion* en *fission*) zijn de oorzaak van verschillende perifere neuropathieën. Dit heeft er ons toe gezet om de volgende hypothese te formuleren: defecten in genen betrokken bij de *mitochondrial dynamics* kunnen resulteren in fenotypische aspecten van DVN. Dit hebben we onderzocht door twee genen die een belangrijke rol in *mitochondrial dynamics* spelen uit te schakelen met morfolino's in de zebrafish. Onze eerste kandidaat was *gdap1* (mogelijk *fission* en *motility*) en de tweede kandidaat was *opa1* (*fusion*). Na het uitschakelen van deze genen hebben we de effecten bestudeerd met onze assays (**Hoofdstuk 4**). Het uitschakelen van *gdap1* resulteerde in zebrafish embryo's met een verminderde dichtheid van sensorische neurieten. Bovendien vertoonden deze embryo's een verlaagde temperatuur gerelateerde activiteit. Daarentegen had een knockdown van *opa1* geen invloed op zowel de dichtheid van sensorische neurieten als de temperatuur gerelateerde activiteit. Echter, alleen het uitschakelen van *opa1* had een effect op de morfologie van het mitochondriële netwerk. Omdat we de mitochondriën in de neuronen niet konden visualiseren, is het mogelijk dat veranderingen in het mitochondriële netwerk onopgemerkt bleven.

Onze data duiden erop dat de knockdown van *GDAP1* de ontwikkeling van sensorische neurieten beïnvloedt, maar het is nog onduidelijk of een defect in *mitochondrial fission* het pathofysiologische mechanisme is. Ondanks dat we geen effect na het uitschakelen van *mitochondrial fusion* waarnamen, stellen we toch voor dat genen die betrokken zijn bij *mitochondrial dynamics* moeten worden gescreend op varianten bij patiënten met DVN. Onze data tonen aan dat defecten in *GDAP1* een mogelijke rol kunnen spelen in de ontwikkeling van DVN. Gebaseerd op data van de literatuur stellen we 2 mechanisme voor die onze waarnemingen mogelijk kunnen verklaren en hierbij uitgaande dat *mitochondrial fission* verstoord is. Als eerst kan een knockdown van *GDAP1* resulteren in een verminderde *mitochondrial fission*, welke een trigger is voor differentiatie. Dit stimuleert waarschijnlijk zelfvernieuwing van neuronale stamcellen waardoor er een beperkte differentiatie is van deze cellen. Deze toename in zelfvernieuwing en dus een beperkte transitie naar een *committed progenitor state* was eerder waargenomen in neuronale stamcellen waarin *fission* uitgeschakeld is. Een ander mechanisme zou het onvermogen kunnen zijn om mitochondria

te transporteren. Een defect in *fission* resulteert namelijk in mitochondria die langwerpig zijn. Dit transport defect heeft als gevolg dat er lokale energietekorten ontstaan die de vorming en de uitgroei van sensorische neurieten beïnvloeden. Daarnaast zijn er interacties tussen *GDAP1*, het cytoskelet en *trafficking* geassocieerde eiwitten aangetoond wat verder aantoont dat het uitschakelen van *gdap1* kan resulteren in een meer complex transport defect. Bovendien zijn er in cellen met een knockout van *GDAP1* minder mitochondria gecolocaliseerd met het endoplasmatisch reticulum, de plek waar *mitochondrial fission* plaats vindt. In **hoofdstuk 5** hebben we *Mitotracker Orange* gebruikt om de mitochondriële netwerken te visualiseren in *gdap1 morphants*. De experimenten met deze compound hebben ons geleerd dat deze niet door de huid heen dringt. Waardoor het dus alleen mogelijk was om de mitochondriële netwerken van de huid aan te kleuren. In deze cellen observeerden we geen effecten na het uitschakelen van *gdap1*. Een benadering om dit in de toekomst te bestuderen zou zijn om de *gdap1* morfolino's te injecteren in embryo's van een transgene lijn waarbij de mitochondriën in sensorische neuronen aan gekleurd zijn. Dit kan worden bereikt door onze *sensory:GFP* driver line te kruisen met de reporter lijn *MitoFish*. Deze transgene lijn is gemaakt door de groep van professor Misgeld. Deze experimenten moeten zich focussen op de mitochondriële netwerken in de somata van de sensorische neuronen of het aantal individuele mitochondriën in de neurieten. Hierbij wordt verwacht dat de *gdap1* morphants tubulaire mitochondriële netwerken hebben in de somata en een verminderd aantal mitochondria in de sensorische neurieten. De bevindingen gepresenteerd in **hoofdstuk 5** hebben duidelijk aangetoond dat we met onze assays andere mechanismen kunnen bestuderen die mogelijk een rol kunnen spelen in de ontwikkeling van DVN. De brede toepasbaarheid van ons panel heeft veel voordelen. Het zou ons ook kunnen helpen om de onderliggende oorzaken van de vele DVN gevallen die idiopathisch blijven te ontrafelen.

Referenties

- AHN, H. S., VASYLYEV, D. V., ESTACION, M., MACALA, L. J., SHAH, P., FABER, C. G., MERKIES, I. S., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G. 2013. Differential effect of D623N variant and wild-type Na(v)1.7 sodium channels on resting potential and interspike membrane potential of dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, 1529, 165-77.
- FABER, C. G., HOEIJMAKERS, J. G., AHN, H. S., CHENG, X., HAN, C., CHOI, J. S., ESTACION, M., LAURIA, G., VANHOUTTE, E. K., GERRITS, M. M., DIB-HAJJ, S., DRENTH, J. P., WAXMAN, S. G. & MERKIES, I. S. 2012a. Gain of function Nav1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol*, 71, 26-39.
- FABER, C. G., LAURIA, G., MERKIES, I. S., CHENG, X., HAN, C., AHN, H. S., PERSSON, A. K., HOEIJMAKERS, J. G., GERRITS, M. M., PIERRO, T., LOMBARDI, R., KAPETIS, D., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G. 2012b. Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19444-9.
- HAN, C., YANG, Y., DE GREEF, B. T., HOEIJMAKERS, J. G., GERRITS, M. M., VERHAMME, C., QU, J., LAURIA, G., MERKIES, I. S., FABER, C. G., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G. 2015. The Domain II S4-S5 Linker in Nav1.9: A Missense Mutation Enhances Activation, Impairs Fast Inactivation, and Produces Human Painful Neuropathy. *Neuromolecular Med*, 17, 158-69.
- HUANG, J., HAN, C., ESTACION, M., VASYLYEV, D., HOEIJMAKERS, J. G., GERRITS, M. M., TYRRELL, L., LAURIA, G., FABER, C. G., DIB-HAJJ, S. D., MERKIES, I. S., WAXMAN, S. G. & GROUP, P. S. 2014. Gain-of-function mutations in sodium channel Na(v)1.9 in painful neuropathy. *Brain*, 137, 1627-42.
- HUANG, J., YANG, Y., ZHAO, P., GERRITS, M. M., HOEIJMAKERS, J. G., BEKELAAR, K., MERKIES, I. S., FABER, C. G., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G. 2013. Small-fiber neuropathy Nav1.8 mutation shifts activation to hyperpolarized potentials and increases excitability of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 33, 14087-97.
- WAXMAN, S. G., MERKIES, I. S., GERRITS, M. M., DIB-HAJJ, S. D., LAURIA, G., COX, J. J., WOOD, J. N., WOODS, C. G., DRENTH, J. P. & FABER, C. G. 2014. Sodium channel genes in pain-related disorders: phenotype-genotype associations and recommendations for clinical use. *Lancet Neurol*, 13, 1152-60.