

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Assoziation von Varianten im 5-HT_{2A}-Rezeptor
zur somatosensorischen Funktion
bei Patienten mit neuropathischem Schmerz**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Carolin Diesch
aus Kiel

Kiel (2016)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Herdegen

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.10.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Neuropathischer Schmerz	1
1.1.1 Ätiologie	2
1.1.2 Symptome, klinische Zeichen und Mechanismen	3
1.1.3 Diagnostik neuropathischer Schmerzen	5
1.1.4 Therapie neuropathischer Schmerzen	6
1.2 Duale Funktion des Serotoninsystems bei Neuropathie	7
1.2.1 Verteilung und Lokalisation des 5-HT _{2A} -Rezeptors	10
1.2.2 Aufbau, Funktion und Regulation des 5-HT _{2A} -Rezeptors	11
1.2.3 Genetische Variabilität	13
1.3 Aufgabenstellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Patienten und Probanden	17
2.1.1 Patientenkollektiv	17
2.1.2 Probandenkollektiv	18
2.2 Ethik	18
2.3 Studienort	19
2.4 Quantitativ sensorische Testung	19
2.4.1 Bestimmung der thermischen Schwellen	20
2.4.2 Bestimmung der mechanischen Empfindungsschwelle	21
2.4.3 Bestimmung der mechanischen Schmerzschwelle	21
2.4.4 Bestimmung der mechanischen Schmerzsensitivität und Allodynie	21
2.4.5 Bestimmung des Wind-up Phänomens	22
2.4.6 Bestimmung der Vibrationsschwelle	22
2.4.7 Bestimmung der Druckschmerzschwelle	23
2.4.8 Untersuchungsareale	23
2.4.9 Cluster	23

2.5 Genotypisierung	24
2.5.1 DNA-Isolation	24
2.5.2 Die Polymerase Kettenreaktion	25
2.5.3 Die Agarose Gelelektrophorese	28
2.5.4 Die Pyrosequenzierung	30
2.6 Statistik	34
3. Ergebnisse	36
3.1 Genotypverteilung der 5-HT _{2A} -Rezeptorvarianten	36
3.1.1 Allel- und Genotypverteilung bei Patienten und gesunden Probanden	36
3.1.2 Genotypverteilung bei Cluster I, Cluster II und gesunde Probanden	37
3.2 Phänotypverteilung der 5-HT _{2A} -Rezeptorvarianten	38
3.2.1 Einfluss der 5-HT _{2A} -Polymorphismen auf die Schmerzempfindung	38
3.2.1 Cluster I (n= 121; hypersensibel)	39
3.2.2 Cluster II (n= 120; hyposensibel)	40
3.2.2. 5-HT _{2A} -Rezeptorvarianten und mechanische Hyperästhesie	43
3.2.2.1 5-HT _{2A} 102C>T und mechanische Schmerzschwelle (MPT)	44
3.2.2.2 5-HT _{2A} 102C>T und mechanische Schmerzsensitivität (MPS)	49
4. Diskussion	51
4.1 Einfluss der Polymorphismen auf die Schmerzempfindung	51
4.2 Einfluss der Polymorphismen auf den Schmerzphänotyp	55
4.2.1 Die Bedeutung der getesteten Seite	55
4.2.2 Die Bedeutung der Clusteranalyse	59
4.2.3 Die Bedeutung der Genotypen	60
4.3 Beschränkungen dieser Studie	62
4.4 Schlussfolgerung	63
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	66

Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ALL	Dynamic Mechanic Allodynia (Dynamisch mechanische Allodynie)
CDT	Cold Detection Threshold (Kälteempfindungsschwelle)
CPT	Cold Pain Threshold (Kälteschmerzschwelle)
DAG	Diacylglycerol
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
GABA	Gamma-hydroxy Buttersäure
gDNA	genomische DNA
HPT	Hot Pain Threshold (Hitzeschmerzschwelle)
IP	Inositol Phosphat
MDT	Mechanical Detection Threshold (Mechanische Empfindungsschwelle)
MPS	Mechanical Pain Sensitivity (Schmerzsensitivität)
MPT	Mechanical Pain Threshold (Mechanische Schmerzschwelle)
NA	Noradrenalin
QST	Quantitativ Sensorische Testung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PHS	Paradoxical Heat Sensation (Paradoxe Hitzeempfindungen)
PK	Proteinkinase
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PPT	Pressure Pain Threshold (Druckschmerzschwelle)
rs	Referenznummer des Single Nucleotide Polymorphismus

SSRI	Selektive Serotonin Reuptake Inhibitors
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TSL	Thermal Sensory Limen (thermische Unterschiedsschwelle für wechselnde warme und kalte Stimuli)
VDT	Vibration Detection Threshold (Vibrationsempfindungsschwelle)
WDT	Warm Detection Threshold (Wärmeempfindungsschwelle)
WUR	Wind-up-Ratio

1. Einleitung

Ein bedeutendes Symptom vieler Erkrankungen ist der Schmerz. In der Neurologie sind es vor allem chronisch neuropathische Schmerzen, die die Therapeuten immer noch in vielerlei Hinsicht rätseln lassen. Besonders dann, wenn eine Erkrankung nicht kausal therapierbar ist, bzw. ihrer Natur nach progredient oder irreversibel ist wie z.B. das Chronisch regionale Schmerzsyndrom (CRPS) oder die Trigeminalneuralgie (Schaible 2007). Neuropathische Schmerzen sind anfallsartig einschließende starke Schmerzen, die häufig als brennend oder stechend von den Patienten beschrieben werden. Laut des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz sind circa fünf Millionen Menschen in Deutschland von chronischen Nervenschmerzen betroffen und viele dadurch stark in ihrer Lebensqualität eingeschränkt. Patienten mit chronischen Nervenschmerzen machen etwa 40% in allgemeinen Schmerzambulanzen aus. Oft steht der Therapeut vor der Entscheidung in wie weit der Schmerz organisch und in wie weit er psychisch bedingt ist. Schmerz als Symptom verliert im Verlauf seine physiologische Bedeutung und wird zunehmend zu einer eigenständigen chronischen Krankheit. Eine Differenzierung neuropathischer Schmerzen gegenüber der Nozizeptorschmerzen ist nicht immer möglich, jedoch von erheblicher Bedeutung für die Behandlungsstrategie. Nozizeptorschmerzen entstehen nach Gewebstrauma bei intakten neuronalen Strukturen, während neuropathische Schmerzen durch die Verletzung oder Erkrankung des Nervensystems bedingt sind. Sind beide Formen des Schmerzes vertreten so nennt man ihn „Mixed pain“ (Baron 2000, Baron and Treede 2007, Treede, Jensen et al. 2008).

1.1 Neuropathische Schmerzen

Neuropathische Schmerzen sind definiert als die Folge einer Schädigung, Verletzung oder Störung des somatosensorischen Systems (Treede and Baron 2008, Haanpaa, Attal et al. 2011). Das nozizeptive System besteht aus den Schmerzrezeptoren (Nozizeptoren) der Peripherie, den damit verbundenen Nervenzellen mit Axonen langsamer Leitungsgeschwindigkeiten (A δ - und C-Fasern), eines projizierenden Neurons auf spinaler Ebene vom Hinterhorn über den spinothalamischen Trakt zum

Thalamus, sowie den supraspinalen Zielstrukturen wie der somatosensorische Kortex *SI* und *SII*, der *Gyrus cinguli*, die *Insula* und der *präfrontale Kortex*.

Der Schmerzreiz, der in einer bewussten Empfindung endet, beinhaltet komplexe Schaltkreise, die in vier Komponenten der körperlichen Wahrnehmung gegliedert werden können: sensorisch-diskriminativ, affektiv (emotional), vegetativ (autonom) und motorisch (Suzuki, Rahman et al. 2004).

1.1.1 Ätiologie

Neuropathische Schmerzen sind keine eigenständige Erkrankung, sondern entstehen auf der Basis von Erkrankungen, Traumen oder Noxen, die eine Läsion im peripheren oder zentralen Nervensystem hervorrufen wie zum Beispiel *Herpes Zoster* Infektionen, Diabetes, Chemotherapeutika, Amputationen, Rückenmarksverletzungen oder Schlaganfall. Die klinische Einteilung erfolgt anhand der Lokalisation der Nervenläsion in peripher und zentral. Unter dem Begriff periphere Neuropathien werden unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung alle traumatisch, inflammatorisch, metabolisch oder toxischen Schädigungen peripherer Nerven zusammengefasst. Sie werden in fokalen und multifokalen Befall unterteilt. Zentrale Neuropathien oder zentraler Schmerz bezeichnet den Schmerz nach einer Schädigung neuronaler Strukturen im Bereich der Neuraxis vom Rückenmark bis zum Kortex (Baron 2000). Das CRPS bildet eine gesonderte Kategorie (Baron 2006, Baron, Binder et al. 2010).

Tabelle 1: Einteilung einiger neuropathischer Syndrome

Peripher fokale oder multifokal	Peripher generalisiert	Zentral	„Mixed Pain“
Polyneuropathie	Diabetes mellitus	Schlaganfall	Chronische Rückenschmerzen
Akuter Herpes Zoster, Postzosterische Neuralgie	HIV-Neuropathie	Multiple Sklerose	Tumorschmerzen bei Infiltration neuronaler Strukturen
Trigeminusneuralgie	Alkohol-Neuropathie	Rückenmarksverletzung	
Posttraumatische Neuropathie	Cisplatin-Neuropathie	Schädel-Hirn-Trauma	
CRPS I, II	Morbus Fabry	Syringomyelie	

Zu den Risikofaktoren, die zu Chronifizierung neuropathischer Schmerzen führen, zählen das Alter, das Geschlecht, eine allgemein erhöhte Schmerzempfindlichkeit vor der Läsion und die Dauer der Schmerzpersistenz.

1.1.2 Symptome, klinische Zeichen und Mechanismen

Obwohl es kein pathognomonisches Symptom für neuropathische Schmerzen gibt werden sie häufig als Ruheschmerz wie lang anhaltende brennende Schmerzen, anfallsartige einschießende Schmerzen oder mechanisch evozierte Schmerzen, z.B. Schmerz auf Bestreichen der Haut, beschrieben.

Definitionsgemäß steht Ästhesie in der Neurologie für die Empfindungswahrnehmung von Reizen während Algesie für die schmerzhaftige Wahrnehmung von Reizen steht. Klinisch teilt man die Schmerzsymptome zunächst in Hyperästhesien (Positivsymptome) und Hypästhesien (Negativsymptome) ein. Während bei der Zuordnung der Positivsymptome zu ihrem auslösenden Mechanismus noch viele Unklarheiten herrschen, sind die Negativsymptome auf den verminderten peripher oder zentral afferenten Input zurückzuführen (Rolke 2009, Truini, Garcia-Larrea et al. 2013). Typische Vertreter von Positivsymptomen bei neuropathischen Schmerzen sind Allodynie und Hyperalgesie. Allodynie drückt die Empfindung von Schmerzen bei einem normalerweise nicht schmerzhaften Stimulus aus während Hyperalgesie eine verhältnismäßig zu starke Schmerzantwort auf einen leicht schmerzhaften Reiz beschreibt. Beide Phänomene können durch verschiedene Stimuli thermisch wie mechanisch ausgelöst werden.

In einer präklinischen Studie über das Reiz-Antwort-Verhältnis im Rückenmark konnte nachgewiesen werden, dass die afferente Aktivität peripher verletzter Fasern eine lang anhaltende Erregung in Rückenmarksneuronen auslöst (Woolf 2011). Diese Sensibilisierung der Rückenmarksneurone wiederum steht in Zusammenhang mit den klinischen Manifestationen von Allodynie, die eine verminderte Erregungsschwelle der spinalen Neurone widerspiegelt, und Hyperalgesie, die primär durch eine erhöhte Antwortbereitschaft der spinalen Neurone ausgelöst wird oder sekundär durch eine Expansion des rezeptiven Feldes bedingt ist (Ossipov, Lai et al. 2000, Schaible 2007, Treede and Baron 2008, Maier, Baron et al. 2010).

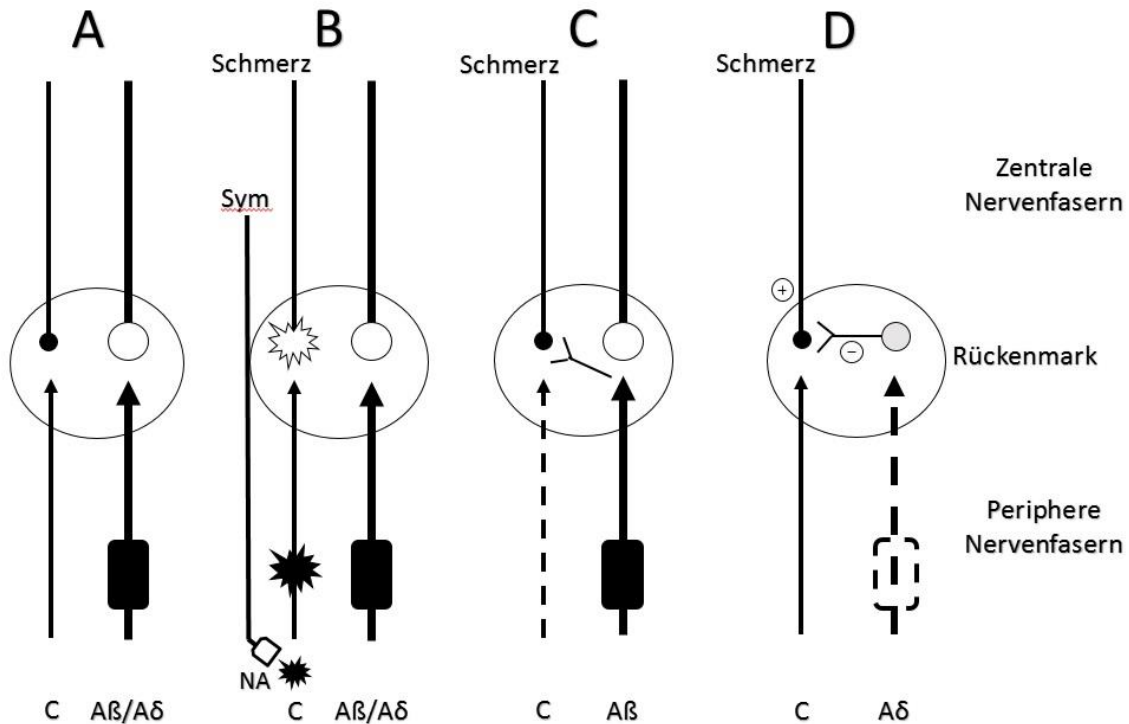


Abbildung 1: Entstehungsmechanismen neuropathischer Schmerzen (Schema)

A: Normale Verhältnisse. C-, A δ - und A β -Fasern projizieren auf sekundär afferente Hinterhornneurone.
B: Periphere und zentrale Sensibilisierung mit sympathisch-afferenter Interaktion. Partiiell geschädigte C-Nozizeptoren werden in ihrer ektopen Nervenaktivität durch sympathisch postganglionäre Fasern (Sym= sympathisch) über einen noradrenergen Mechanismus (NA= Noradrenalin) unterhalten (Stern an der C-Faser). Folge ist eine pathologische Ruheaktivität, die zu einer zentralen Sensibilisierung und einer funktionell wirksamen Umwandlung synaptischer Interneurone an sekundär afferenten Hinterhornneuronen (Stern, zentral) führen kann.
C: Synaptische Reorganisation im zentralen Nervensystem. Aufgrund von primär afferenter Nervendegeneration nach peripheren Nervenläsionen können synaptische Kontakte an zentralen nozizeptiven Neuronen reduziert sein. Die freien Kontakte werden durch Auswachsen zentraler Endigungen intakter myelinisierter A β -Fasern neu besetzt. Hierdurch kann eine Stimulierung der nozizeptiven Bahnen über niederschwellige A β -Berührungsreize erfolgen.
D: Zentrale Disinhibition und Kältehyperalgesie. Durch selektive Schädigung von kältesensiblen A δ -Fasern (Kaltreiz) entfällt die zentrale Hemmung über Interneurone der C-Fasern (Kälteschmerz). Dementsprechend werden alle Kältereize über die nozizeptiven Bahnen weitergeleitet, woraus eine Kältehyperalgesie resultiert. In Anlehnung an Baron 2000

Jüngste Studien untersuchten die Zusammenhänge einiger Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen und seiner klinischen Manifestationen. Sie belegen einen gut reproduzierbaren Zusammenhang zwischen der Nadelreizhyperalgesie, der dynamisch mechanischen Allodynie und zentraler Sensibilisierung (Treede and Magerl 2000) sowie der Hitze- und Druckhyperalgesie mit peripherer Sensibilisierung (Rolke, Baron et al. 2006, Rolke 2009). Neuropathisch bedingte Ruheschmerzen, wie kontinuierlich brennende Schmerzen, parästhetische Schmerzen oder anfallsartig einschließende Schmerzen, können auf mehreren pathologischen Mechanismen

beruhen. Die molekularen Veränderungen nach einer Nervenläsion sind begleitet von der Ausschüttung chemischer Substanzen (z.B.: Bradykinin, Serotonin, Noradrenalin, Zytokine), der Hochregulierung von Kanälen und Rezeptoren (z.B.: Natrium, Kalzium, Serotonin, TRP) und der Induktion verschiedener Gene, die für die Zelladaptation unter Stressbedingungen verantwortlich sind. Zelluläre Veränderungen an irritierten peripheren Nerven, regenerierenden Nervenassprossungen oder denervierten zentralen Nerven, wie Spontanaktivität, erniedrigte Reizschwelle, verstärkte Antwort auf überschwellige Reize, phänotypische Wechsel und Rekrutierung stiller Nozizeptoren weisen noch keine klare Korrelation mit spezifischen Schmerzsymptomen auf. Im Hinterhorn des Rückenmarks verändern sich die Eigenschaften neuronaler Strukturen durch eine Reorganisation von synaptischen Verknüpfungen und die verstärkte Weiterleitung nozizeptiver Reize durch molekulare phänotypische Wechsel der Projektionsneurone wie in Abbildung 1C beschrieben. Außerdem kann eine Hemmung der zentral absteigenden Inhibition sowie eine Verstärkung der zentral absteigenden Potenzierung stattfinden (Woolf 2004, Finnerup, Sindrup et al. 2007, Baron, Binder et al. 2010, Ossipov, Dussor et al. 2010).

1.1.3 Diagnostik neuropathischer Schmerzen

Die Diagnostik der neuropathischen Schmerzen erfolgt anhand von Anamnese (inklusive Fragebögen und Schmerztagebuch), klinischer Untersuchung, Bedside Tests, Fragebögen, Hautbiopsien, Messung evozierter Potenziale und anderer apparativer Verfahren. Mitunter kann auch eine Hautbiopsie angezeigt sein. Mechanismen-basierte Diagnostik wie die quantitativ sensorische Testung (QST), die zur Zeit nur in Studien verwendet wird, basiert auf der Annahme, dass die Erniedrigung oder Erhöhung von Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen auf zu Grunde liegende neurobiologische Pathologien hinweisen kann. Diese Methode dokumentiert ein Sensibilitätsprofil an das sich im besten Fall eine mechanismen-orientierte, patienten-individualisierte Therapie anschließen kann. Allerdings ist dieses Konzept umstritten, da ein klinisches Zeichen durch mehrere verschiedenartige Mechanismen bedingt sein oder ein Mechanismus zur Entstehung mehrerer klinischer Symptome beitragen kann.

Eine sichere Diagnose „neuropathischer Schmerz“ besteht laut der Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG) der International Association for the Study of Pain (IASP), wenn

1. eine plausible neuroanatomische Verteilung (peripher/zentralen Innervationsterritorium entsprechend) besteht,
2. anamnestische Hinweise auf eine somatosensorische Läsion oder somatosensorisch schädigende Erkrankung besteht und
3. ein klinisch bzw. apparativer Nachweis von 1. und 2. erfolgt ist.

Genetische Untersuchungen gehören aktuell nicht zur allgemeinen Diagnostik der neuropathischen Schmerzen, könnten jedoch bei therapie-resistenten Patienten einen guten Ansatz für die Auswahl von Medikamentengruppen bieten (wie später ausführlicher dargestellt).

1.1.4 Therapie neuropathischer Schmerzen

Die heute verfügbare Therapie neuropathischer Schmerzen gestaltet sich häufig schwierig, da sie aufgrund einer großen Symptomheterogenität eine individuelle Therapieplanung erfordert. Nach einer sicheren Diagnosestellung sollten zunächst kausale Therapieoptionen ausgeschöpft werden (z.B. OP eines Engpasssyndroms). Sind diese unzureichend oder nicht verfügbar, gibt es eine Bandbreite an medikamentösen Optionen, die wenn möglich Komorbiditäten und Komedikationen berücksichtigen sollte. Die Medikamente richten sich unter anderem gegen Ionenkanäle um die verstärkte neuronale Erregung zu blocken sowie eine Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin, um das absteigende schmerzhemmende System zu stärken. Derzeit gibt es vier verschiedene pharmakologisch wirksame Gruppen in der Therapie der ersten Wahl bei neuropathischen Schmerzen. Hierzu gehören Trizyklische Antidepressiva (z.B. Amitriptylin), Serotonin-Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer (z.B. Duloxetin), Antikonvulsiva (z.B. Gabapentin) und Capsaicin bzw. Lidocain-Pflaster. Starke Schmerzen erfordern häufig eine Kombinationstherapie mit Opioidanalgetika (z.B. Tramadol, Morphin ret.). Das Gespräch mit dem Patienten über die Therapieziele ist unerlässlich, da eine Schmerzfreiheit oft nicht erreicht werden kann und

Enttäuschungen über eine unzureichende Wirkung möglicherweise zusätzlich zu einer Verstärkung der Schmerzen führt. Ziel der medikamentösen Therapie ist die Reduktion der Schmerzen auf einen Wert unter drei auf der numerischen Schmerzskala (1-10; 1= geringster Schmerz, 10= schwerstmöglicher Schmerz). Ursprünglich wurde die stark variierende Ansprechrate medikamentöser Therapieoptionen durch unterschiedliche Bioverfügbarkeit, abweichende Schmerzreizintensitäten und individuell voneinander abweichende Schmerzempfindung begründet. Jüngste Studien zeigen jedoch die Einflussnahme von kandidatengenassoziierten Polymorphismen auf die individuelle Empfindung von Schmerzintensität und den Bedarf der Schmerzmedikamente (Aoki, Hayashida et al. 2010). Ca. 20–40 % der Patienten sprechen unzureichend auf die Pharmakotherapie an (< 30 % Schmerzreduktion, sog. Non-Responder) oder leiden an nicht tolerierbaren Nebenwirkungen (Attal, Cruccu et al. 2010, Dworkin, O'Connor et al. 2010, Finnerup, Sindrup et al. 2010). Besonders für diese Patientengruppen ist die Versorgung mit interdisziplinären Behandlungsverfahren wie z.B. die transkutane elektrische Nervenstimulation, psychotherapeutische Verfahren, physikalische und Ergotherapie von großer Bedeutung (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Gordon and Love 2004). Dank neuer molekularer Forschungsmethoden rücken alternative therapeutische Ansätze wie Gentherapie und Stammzelltherapie in den Fokus klinischer Studiendesigns. Sie bieten einen neuen Aspekt den Schmerz in seinen diversen Entstehungsmechanismen zu verstehen und zu therapieren (Raju, Englander et al. 2014).

1.2 Duale Funktion des Serotoninsystems bei Neuropathie

Seit der molekularen Identifikation von Serotoninrezeptorsubtypen, spielen sie eine wichtige Rolle bezüglich ihres dualen Wirkens im Prozess der Schmerzempfindung. Diese kann nach heutigen Erkenntnissen einerseits somatosensorisch-neuronaler und andererseits psychischer Herkunft sein. Der Neurotransmitter Serotonin (5-Hydroxytryptamin= 5-HT) entfaltet sein vielseitiges Wirkungspotenzial über mehr als 15 Rezeptorsubtypen bei der Regulierung von Schmerzen und anderen Körperfunktionen. Er wurde schon früh als Neurotransmitter im Rahmen des absteigenden hemmenden Schmerzkontrollsystems mit der Schmerzverarbeitung in

Verbindung gebracht. Mittlerweile ist bekannt, dass serotoninerge Projektionen aus dem Hirnstamm (*Nucleus Raphe Magnus, Locus coeruleus*) nicht nur schmerzhemmende, sondern auch schmerzverstärkende Impulse in das Rückenmark entsenden (Millan 2002). Intrathekal verabreichtes Serotonin kann pro- oder antinozizeptive Wirkungen entfalten, abhängig von der verabreichten Dosis, dem verwendeten Schmerzmodell und der aktivierten Serotoninrezeptorsubtypen (s. Abbildung 2).

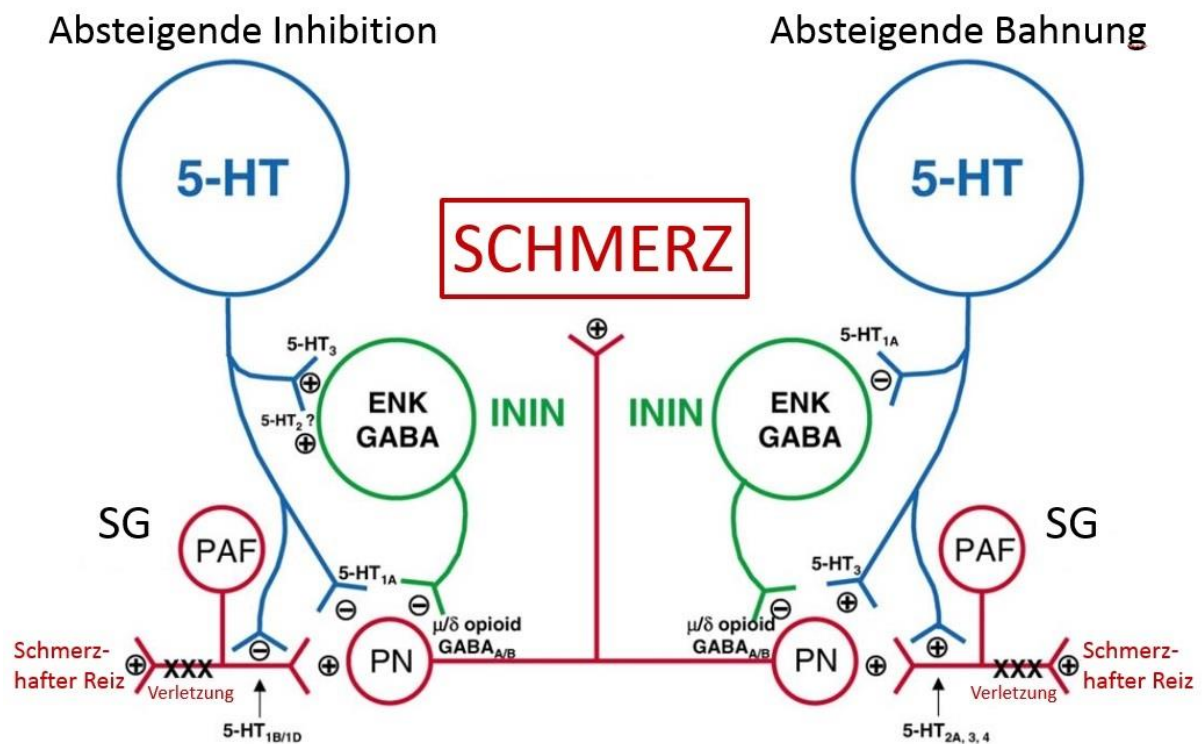


Abbildung 2: Lokalisation ausgewählter 5-HT-Rezeptoren und ihre duale Modulation von Schmerzreizen im Hinterhorn

Auf der linken Seite sind die Mechanismen von serotoninergen Neuronen in der absteigenden Schmerzhemmung aufgeführt während auf der rechten Seite die der absteigenden Schmerzverstärkung dargestellt sind. Serotonin agiert über seine Rezeptoren an den Axonterminalen von Primärafferenzen (PAF, primary afferent fibres), projizierenden Neuronen (PN) und inhibitorischen Interneuronen (ININ). Enkephalin (ENK) und Gamma-hydroxy-butyrische-Säure (GABA) sind die Transmitter der ININ und spielen eine Schlüsselrolle in der Antinozizeption. Sie werden durch serotoninerge Bahnen im Hinterhorn in der absteigenden Schmerzhemmung ausgeschüttet, in der Schmerzverstärkung inhibiert. Angesteuerte 5-HT_{1A} und 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren weisen einen hemmenden Charakter auf die neuronale Aktivität auf, während 5-HT₂, 5-HT₃ und 5-HT₄-Rezeptoren die zelluläre Aktivität verstärken. Der Subtyp des 5-HT₂-Rezeptors auf den ININ (A, B oder C) ist nicht angegeben, da dieser nach aktueller Studienlage bisher nicht bekannt ist. Abkürzungen: SG= Spinalganglion, 5-HT= Serotonin [Modifiziert in Anlehnung an die Abbildung 7 Millan 2002]

Die Chronifizierung des Schmerzes nach Millan ist eine von Primärafferenzen getriggerte und erhaltene Sensibilität von erregenden Interneuronen und Projektionsneuronen im Hinterhorn des Rückenmarks. Die Wirkung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren wird durch eine Nervenläsion oder Entzündung verstärkt. Sie leisten über die Sensibilisierung von projizierenden Neuronen sowie über das absteigende schmerzverstärkende System aus dem Hirnstamm ihren Beitrag zur Erhaltung von Schmerzen.

Pronozizeptive Studiendaten zu Serotonin wurden mittels spinaler Serotonindepletion (durch intrathekale Injektion von 5,7 di-hydroxytryptamin) in einem neuropathischen Schmerzmodell erhoben. Es zeigte sich ein vermindertes Schmerzverhalten der Versuchstiere auf mechanische Reize (Rahman, Suzuki et al. 2006). Weitere pronozizeptive Eigenschaften von Serotonin wie Erhöhung der synaptischen Reizübertragung und Sensibilisierung nozizeptiver Strukturen konnten ebenfalls anhand von schmerzbezogenen Symptomen wie Hyperalgesie und Allodynie in experimentellen Tierversuchen dargestellt werden (Sommer 2006, Berger, Gray et al. 2009). Selektive 5-HT_{2A} Rezeptorantagonisten wie Ketanserin und Sarpogrelat verminderten die Schmerzsymptomatik bei intraperitonealer oder lokaler Injektion (Nitanda, Yasunami et al. 2005, Sasaki, Obata et al. 2006, Rahman, Bannister et al. 2011). Interessant sind auch die Daten aus dem Experiment von Bardin et al. (1997), der die Effekte des 5-HT in Abhängigkeit des angewandten Stimulus und Schmerznachweises untersuchte. Er konnte zeigen, dass Versuchstiere nach intrathekaler Gabe von Serotonin eine höhere Schmerzempfindlichkeit bei mechanischen Stimuli aufwiesen, eine Auswirkung auf chemische oder thermische Reize jedoch zunächst ausblieb. Erst höhere Dosen des intrathekal verabreichten Serotonins lösten eine ähnlich starke Schmerzreaktion auf chemisch oder thermische Reize bei den Versuchstieren aus, wie bei einer mechanischen Stimulation in Verbindung mit niedrig dosiertem intrathekal verabreichtem Serotonin (Bardin, Bardin et al. 1997). Im Gegensatz hierzu stehen die antinozizeptiven Studiendaten von serotonininduzierter Analgesie. In Studien mit neuropathischen Tiermodellen konnte eine Verminderung der für den neuropathischen Schmerz spezifischen thermischen Hyperalgesie und Allodynie sowie die GABA-induzierte Hemmung der Weiterleitung von Schmerzreizen im Rückenmark bei intrathekaler Applikation von 5-HT_{2A} spezifischen Agonisten gezeigt werden (Sasaki, Obata et al. 2003, Honda, Uchida et al. 2006, Iwasaki, Otsuguro et al. 2013). Die Beteiligung der unterschiedlichen

Serotoninrezeptorsubtypen in der Schmerzverarbeitung ist bis heute aufgrund ausgeprägter genetischer Homologien, vor allem in der 5-HT₂ Rezeptorgruppe, und kontroverser Studienergebnisse in vielen Bereichen noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurde sich intensiv mit 5-HT_{2A}-Rezeptorvarianten in Bezug auf Schmerzempfindung bei neuropathischen Schmerzpatienten beschäftigt. Der Rezeptor ist auf vielen Strukturen und Ebenen des neuronalen Schmerznetzwerkes lokalisiert und es sprechen zahlreiche Studien für die pronozizeptive 5-HT-Wirkung dieses Rezeptorsubtyps (Okamoto, Imbe et al. 2002, Bockaert, Claeysen et al. 2006, Van Steenwinckel, Brisorgueil et al. 2008, Aira, Buesa et al. 2010).

1.2.1 Verteilung und Lokalisation des 5-HT_{2A}-Rezeptors

5-HT_{2A}-Rezeptoren befinden sich peripher, spinal und supraspinal in Nervengewebe, skelettaler und glatter Muskulatur (Gefäße und Uterus) sowie an Thrombozyten. Betrachtet man die Verteilung des 5-HT_{2A}-Rezeptorsubtypes mittels In-situ-Hybridisierungen, Immunohistochemie und Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktionen im Nervensystem genauer, so zeigen sich vermehrte membranständige Ansammlungen an peripheren und zentralen Enden von unmyelinisierten C-Fasern (Millan 2002, Sommer 2004), im Spinalganglion (Supornsilpchai, le Grand et al. 2010), im spinalen Hinter- und Vorderhorn, sowie supraspinal im Kortex. Hier tritt der Rezeptor besonders häufig präfrontal, entorrhinal (Gedächtnis), im limbischen System, in den Basalganglien, im Thalamus und in den Hirnstammkernen auf (Okamoto, Imbe et al. 2002, Bockaert, Claeysen et al. 2006, Van Steenwinckel, Noghero et al. 2009).

Darüber hinaus gibt es eine große Anzahl an intrazellulären 5-HT_{2A}-Rezeptoren (Gavarini, Becamel et al. 2004). Für eine tragende Rolle im Prozess der Schmerzverarbeitung spricht das Vorkommen des Rezeptors vor allem auf den C-Fasern, in den Spinalganglien nozizeptiver Neurone sowie im Hinterhorn des Rückenmarkes.

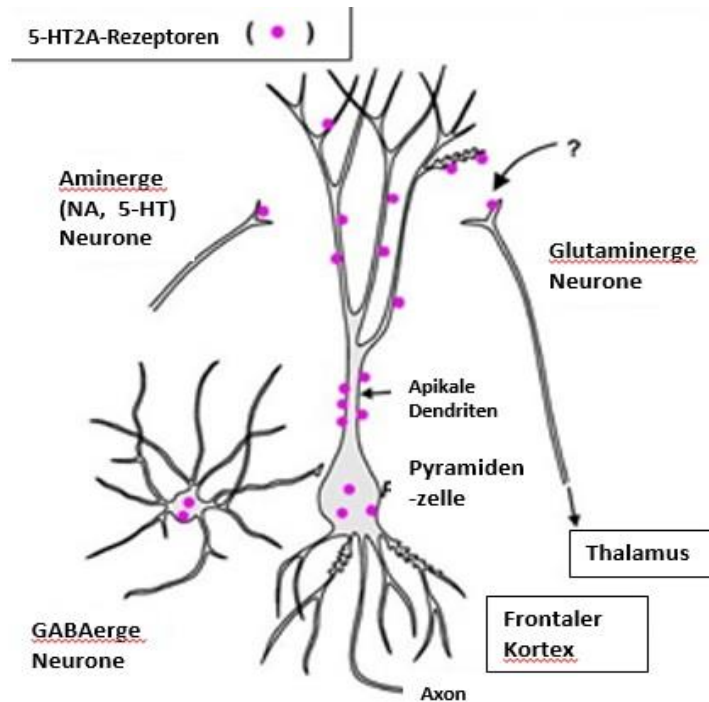


Abbildung 3: Lokalisationen der 5-HT2A-Rezeptoren.

Regionale und zelluläre Lokalisationen der 5-HT2A-Rezeptoren auf Nervenzellen. Sie zeigen eine Verteilung auf Zellkörpern, Dendriten oder Axonterminalen hier am Beispiel von serotoninerger oder Neurotransmitter-beinhaltenen Neuronen im Frontalkortex. In Anlehnung an Bockaert (2006)

1.2.2 Aufbau, Funktion und Regulation des 5-HT2A-Rezeptors

Der 5-HT2A-Rezeptor wurde ursprünglich über Bindungsassays von [3H]S-piperone identifiziert. Trotz seiner niedrigen Affinität zu Serotonin fällt er in die Klassifikation der Serotoninrezeptoren, da er viele pharmakologische Ähnlichkeiten mit den anderen Serotoninrezeptortypen, besonders mit der Subgruppe der 5-HT2-Rezeptoren aufweist. Der Rezeptorsubtyp 2A ist wie fast alle 5-HT-Rezeptoren ein metabotroph G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben Transdomänen.

Wie in Abbildung 4 dargestellt wird nach Stimulierung des Rezeptors über Liganden eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die über das Gq/11-Protein läuft und dabei die Phospholipase C β (PLC β) aktiviert.

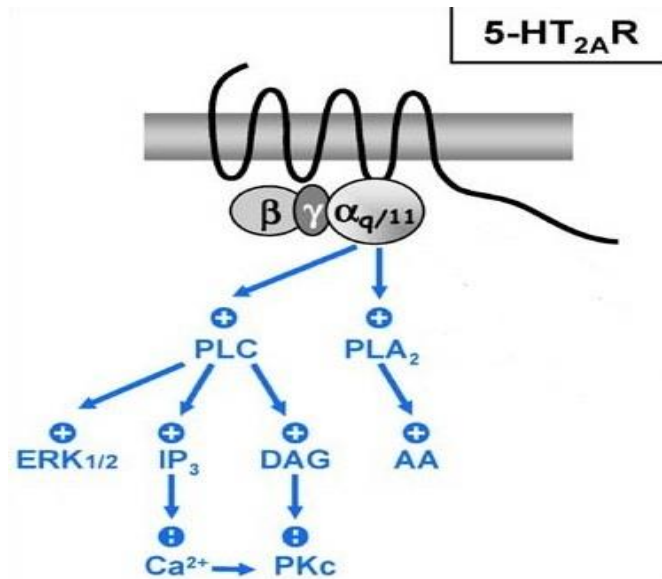


Abbildung 4: 5-HT_{2A}-Rezeptor Signalkaskaden und Effektoren

Die Signaltransduktion des 5-HT_{2A}-Rezeptors erfolgt intrazellulär über Gq-Protein gekoppelte Rezeptoren und aktiviert die PLC und PLA₂-Signalwege. PL= Phospholipase (C und A₂), ERK= Extracellular-signal Regulated Kinase, IP= Inositol Triphosphat, DAG= Diacylglycerol, PK= Proteinkinase. In Anlehnung an Bockaert (2006)

Diese wiederum bewirkt eine Ansammlung von Inositol Triphosphat und die intrazelluläre Erhöhung von Kalzium. Dadurch kommt der erregende Charakter des Rezeptors zustande, der über die Erhöhung von intrazellulärem Kalzium eine Erregung der Nervenzelle bewirkt und konsekutiv kommt es zu einer Freisetzung von Neurotransmittern aus den Nervenendigungen (Raymond, Mukhin et al. 2001). Studentechnisch und pharmakologisch relevante selektive Antagonisten sind Ketanserin, Mianserin und S-piperone. Die physiologische Wirkweise des Rezeptors hängt von seiner Lokalisation ab und reicht von der Kontraktion glatter Muskulatur, Thrombozytenaggregation, erhöhter Gefäßpermeabilität bis zur Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit durch die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und Hemmung der Posthyperpolarisation (Villalobos, Beique et al. 2005, Bockaert, Claeysen et al. 2006, Hannon and Hoyer 2008). Pathophysiologisch verursacht der Rezeptor die Potenzierung von Entzündung und Schmerz durch die Erhöhung der Gefäßpermeabilität für Entzündungsfaktoren und die verstärkte Weiterleitung des Schmerzreizes über sensibilisierte periphere und spinale Nervenfasern (C-Fasern und Hinterhornneurone) (Bockaert, Claeysen et al. 2006, Aira, Buesa et al. 2010). Außerdem erfolgt die Transformation stummer glutaminerger Synapsen in der Peripherie (Pierce, Xie et al. 1996, Okamoto, Imbe et al. 2002, Van Steenwinkel,

Brisorgueil et al. 2008) und die Potenzierung der nozizeptiven Wirkung von Entzündungsmediatoren wie Noradrenalin und Prostaglandin E2 (Doi-Saika, Tokunaga et al. 1997, Tokunaga, Saika et al. 1998, Sommer 2004). Dies kann die Entwicklung einer zentralen Sensibilisierung und damit die Begünstigung einer Chronifizierung des Schmerzes bewirken.

Aira et al. (2010) untersuchten die Rolle des Rezeptors in den supraspinalen und spinalen Schmerzmodulationskreisen, die von großer Bedeutung für die Entwicklung pathologischer Schmerzen ist. Sie stellten fest, dass nach Läsion des N. ischiadicus die Funktion des 5-HT_{2A}-Rezeptors grundlegend verändert war. Auf Rückenmarksebene fand nach peripherer Nervenläsion eine übermäßige Stimulation mehrerer 5-HT-Rezeptoren durch Serotonin statt. Während die 5-HT₄-Rezeptoren durch die Serotoninausschüttung desensibilisiert wurden, zeigten sich die 5-HT_{2A}-Rezeptoren auf glutaminergen reizverstärkenden Interneuronsynapsen aktiviert. Beide Mechanismen tragen einen wesentlichen Anteil zur spinalen Übererregung und erhöhten Schmerzempfindung bei. Ferner liegen Hinweise vor, dass der Rezeptor eine signifikante Rolle unter Entzündungsbedingungen bei der Entstehung von thermischer Hyperalgesie spielt (Okamoto, Imbe et al. 2002, Sommer 2004).

Die Regulation des Rezeptors erfolgt atypisch, denn Agonisten sowie Antagonisten erzeugen eine Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors wohingegen Entzündungsmoleküle eine Externalisierung und Hochregulierung bewirken (Raymond, Mukhin et al. 2001, Van Oekelen, Luyten et al. 2003, Bockaert, Claeysen et al. 2006). Diese Regulation ist für die Reizweiterleitung als auch die Wirkweise von Antipsychotika von großer Bedeutung, da nach dem Rückgang der Entzündung Selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer (SSRI= selektive serotonin reuptake inhibitors) eine geringere Wirkung erzielen.

1.2.3 Genetische Variabilität

Bisher weniger beachtet, ist die Identifikation von genetischen Varianten des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens mitsamt dessen Auswirkungen auf Proteinebene. Es könnte einen weiteren Baustein zur Aufklärung der in weiten Teilen noch unklaren Verbindung zwischen dem molekularen Pathomechanismus und dem klinischen Krankheitsbild von Schmerzsyndromen darstellen. Wie oben schon erwähnt, wägte man die

Ansprechrate von Patienten auf Medikamente damals hauptsächlich als eine Funktion der Bioverfügbarkeit von Medikamenten und der individuellen Schmerzanfälligkeit. Die Erklärung auf die zum Teil sehr individuelle Variabilität der Rezeptorexpression sowie dessen Funktion und Vernetzung bei der Schmerzempfindung fehlte. Mit Hilfe der neuen Analyseverfahren auf molekular-genetischer Ebene konnten Vermutungen von involvierten Molekülen, Hormonen und Rezeptoren und deren durch genetische Variation bedingten Veränderungen in Struktur und Funktion bestätigt oder verworfen werden. Die Bedeutung genetischer Variabilität bezüglich der Anfälligkeit und Ausprägung somatosensorischer Symptome bei neuropathischen Schmerzpatienten ist größtenteils noch unbekannt. Binder et al. (2011) untersuchten in einer Pilotstudie Genvarianten von TRP-Kanälen (englisch= transient receptor potential channels) in Hinblick auf die Ausprägung von thermischer und mechanischer Hypersensibilität. Das Ergebnis der Studie war eine Assoziation der Rezeptorvarianten mit thermischer Hyperalgesie, die allerdings begrenzt auf neuropathische Schmerzpatienten mit einer intakten peripheren Innervation war. Tierexperimentelle Forschung und Daten von humanen Surrogatmodellen unterstützen die Vermutung einer Involvierung verschiedener Serotoninrezeptorsubtypen in der Entstehung und Erhaltung neuropathischer Schmerzen. Dabei nimmt vor allem der 5-HT_{2A}-Rezeptor, der in wichtigen Schaltzentralen der Schmerzweiterleitung wie dem Hinterhorn, den Hirnstammkernen und dem Thalamus liegt, eine wichtige Stellung ein (Aira, Buesa et al. 2010, Rahman, Bannister et al. 2011). Es wird angenommen, dass die Hochregulierung des Rezeptors in C-Fasern, im Spinalganglion und im Hinterhorn des Rückenmarkes Teil des phänotypischen Wechsels bei neuropathischen Schmerzen ist und zur Empfindung einiger neuropathischer Schmerzsymptome führen kann (Nitanda, Yasunami et al. 2005, Sasaki, Obata et al. 2006). Studien zufolge korrelierte die 5-HT_{2A}-Rezeptor Expression mit der Ausprägungsintensität von mechanischer Hyperalgesie und Allodynie. -/-5-HT_{2A}-Rezeptor knock-out Mäuse wiesen nach peripherer Nervendestruktion mittels 2,3-dideoxycytidine im Gegensatz zu homologen +/-5-HT_{2A}-Rezeptor Mäusen keine Anzeichen für mechanische Hyperalgesie nach Schmerzreizen auf, wohingegen heterogene +/- 5-HT_{2A}-Rezeptor Mäuse in abgeschwächter Form auf Schmerzreize nach Nervenverletzung reagierten (Van Steenwinckel, Brisorgueil et al. 2008).

Das humane 5-HT_{2A}-Rezeptorgen, 1990 von Julius et al. als 5-HTD-Rezeptor identifiziert, liegt auf dem Chromosom 13q14-q21 (Julius 1990). Durch Splicing

ergeben sich die folgenden drei Genvarianten: 2A, 2B und 2C. Der 5-HT_{2A} Rezeptor, ca. 63kb und drei Exone groß, überlappt in seiner mRNA zu 45% mit dem 5-HT_{2B} und zu 49% mit dem 5-HT_{2C} Rezeptor (Raymond, Mukhin et al. 2001).

Die erhöhte Expression von 5-HT_{2A}-Rezeptoren wurde im Zusammenhang mit der Pathogenese verschiedenster Schmerzformen wie neuropathische Schmerzen, Fibromyalgie, chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie Migräne gebracht (Pata, Erdal et al. 2004, Diatchenko, Nackley et al. 2007, Aoki, Hayashida et al. 2010, Naito, Ishii et al. 2010). Obwohl die Literatur bezüglich der 5-HT_{2A}-Rezeptorvarianten und Schmerz sehr inkongruent ist, finden sich einzelne Studien zu den Einzelstrangpolymorphismen (SNP= single nucleotide polymorphism) 102C>T (rs6313), 452C>T(rs314) und -1438A>G(rs6311) in Assoziation mit der somatosensorischen Funktion bei Schmerzen. Dabei zeigen der -1438A>G SNP der Promotorregion und der 102C>T SNP in Exon 1 ein starkes Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium= LD) (Aoki, Hayashida et al. 2010). Ferner ist der 452C>T Polymorphismus der einzige, der einen Aminosäurenwechsel in der Proteinstruktur des Rezeptors bei den unterschiedlichen Genotypen nach sich zieht. Es wird entweder Histamin oder Tyrosin in die Proteinstruktur eingebaut. Eine Bedeutung dieses Aminosäurewechsels in Bezug auf eine veränderte Rezeptorexpression oder -funktion konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Auch die Recherche über 102C>T SNP ergab bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Ergebnisse über eine signifikant veränderte mRNA-Expression oder *in vivo* Funktion des Rezeptors. In einer Studie mit Integration von funktioneller Genomik und dem Strukturgleichungsmodell bei Patienten mit chronischem Erschöpfungssyndrom konnte der Einfluss des -1438A>G Polymorphismus auf die Transkriptionsfaktorenbindung am Promotor sowie dessen Methylierung nachgewiesen werden. Somit besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der homogenen A-Allelausprägung des -1438A>G Polymorphismus und der Rate der 5-HT_{2A}-Rezeptor Transkription (Falkenberg, Gurbaxani et al. 2011). Der Einfluss von Genotypvarianten des 5-HT_{2A}-Rezeptors in Bezug auf die Ausprägung von Schmerzempfindung wird in der Literatur vor allem den 102T/T und -1438A/A Genotypen bei der Entstehung und Erhaltung chronischer Schmerzen zugeschrieben (Pata, Erdal et al. 2004, Diatchenko, Nackley et al. 2007, Nicholl, Holliday et al. 2011).

Aoki et al. (2010) beschrieben in einer Studie den postoperativen Schmerzmedikamentbedarf im Zusammenhang mit dem 102C>T SNP (single

nucleotide polymorphism) an 135 Patienten mit T/T, T/C und C/C Genotypen nach großen Abdominaleingriffen. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit dem T/T Genotyp einen signifikant erhöhten postoperativen Schmerzmittelverbrauch aufwiesen. Diese Ergebnisse waren jedoch geschlechtsspezifisch. Während Frauen mit besagtem Polymorphismus einen signifikant erhöhten Bedarf an postoperativer Schmerzmedikation hatten, zeigte sich diese Signifikanz bei den Männern mit gleichem Polymorphismus nicht. Weitere schmerzassoziierte Studien weisen auf Einflüsse des 102C>T SNPs bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Fibromyalgie hin (Pata, Erdal et al. 2004, Buskila 2007, Nicholl, Holliday et al. 2011). Aufgrund des stark ausgeprägten Kopplungsungleichgewichtes zwischen den 102C>T und -1438A>G Polymorphismen finden sich in den Studien zu 102C>T SNPs auch häufig eine kongruente Assoziation mit dem -1438 A>G SNP des Promotors. Dahingegen existieren bisher kaum Studien über den Zusammenhang des 452C>T Polymorphismus mit Schmerzerkrankungen. Dieser Polymorphismus taucht primär bei Malfunctionen kognitiver Verarbeitungsprozesse und in Assoziation mit psychiatrischen Erkrankungen wie Depression und Schizophrenie auf (Quednow, Kuhn et al. 2008, Petit, Quesseveur et al. 2014).

Zu welchem Ausmaß Varianten des 5-HT_{2A}-Rezeptors die Proteinexpression und oder die Funktionalität des Rezeptors verändern kann, bleibt bei bisheriger Studienlage weites gehend unklar. Derzeit gibt es wenige zuverlässige Daten, die den drei Polymorphismen -1438A>G (rs6311), 102C>G (rs6313) und 452C>G (rs6314) in der interindividuellen Variation von Schmerzempfindung bei neuropathischen Schmerzen bei Menschen eine klare Rolle zuweisen können.

1.3 Aufgabenstellung

In dieser Studie galt es herauszufinden, ob 5-HT_{2A} Rezeptorvarianten der 102 C>T, 452 C>T und -1438 A>G SNPs

1. einen Einfluss auf die allgemeine Schmerzempfindung haben
2. einen Einfluss auf die Ausprägung somatosensorischer Symptome bei neuropathischen Schmerzpatienten haben
3. einen Einfluss auf einen Chronifizierungsmechanismus von Schmerzen haben

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Probanden

Es nahmen insgesamt 371 (241 QST) Patienten und 253 Kontrollprobanden an der Studie teil.

2.1.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen unserer Studie fand die Rekrutierung von 371 kaukasischen, nicht miteinander verwandten Patienten statt. Dies erfolgte in Kooperation mit dem Deutschen Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz (DFNS, http://www.neuro.med.tu-muenchen.de/dfns/e_index.html).

Tabelle 2: Demografische Daten der Patienten

Merkmale	Alle Patienten	Cluster I	Cluster II	p-Wert CI vs. CII
Anzahl	371	121	120	
Alter (Jahren)	56,4± 14,4	52,2± 13,7	56,6± 13,8	<0.02
Geschlecht (% weiblich)	57,7	56,1	49,1	0.34
Krankheitsdauer (Jahre)	43,9± 71,9	39,1± 78,6	35,1± 47,4	0.63
Schmerzintensität (NRS)	6,0± 2,0	6,0± 2,0	6,0± 2,0	1.00
Neurologische Syndrome				
Polyneuropathie (n (%))	101 (27,2)	24 (19,8)	41 (35,0)	<0.02
CRPS (n (%))	87 (23,5)	40 (33,1)	29 (24,1)	0.17
Trigeminus Neuralgie (n (%))	57 (15,4)	28 (23,1)	7 (5,8)	<0.0001
Postherpetische Neuralgie (n (%))	35 (9,4)	7 (5,8)	14 (11,6)	0.16
Periphere Nervenverletzung (n (%))	34 (9,2)	13 (10,7)	14 (11,6)	0.98
Andere Neuropathien (n (%))	33 (8,9)	5 (4,2)	8 (6,1)	0.56
Zentrale Neuropathie (n (%))	24 (6,5)	4 (3,3)	7 (5,8)	0.53

Die Werte sind als Mittelwert± einfache Standardabweichung, Prozentzahlen oder als Absolutwerte angegeben. Die Schmerzintensität der letzten 4 Wochen wurde mittels der Numerischen Rating Skala erhoben (NRS 0= kein Schmerz, 10= schwerster vorstellbarer Schmerz)

Im Durchschnitt waren die Patienten 56,4± 14,4 Jahre alt und zu 57,7 % weiblich. Die Schmerzintensität des chronischen Schmerzleiden betrug 6,0± 2,0 auf der

numerischen Schmerzskala (0-10, wobei 0 für kein Schmerz und 10 für den stärksten vorstellbaren Schmerz steht).

Am stärksten vertreten unter den neuropathischen Schmerzpatienten waren Patienten, die unter Polyneuropathie litten (27,2 %), dicht gefolgt von CRPS-Patienten (23,5 %).

In der weiterführenden Clusteranalyse flossen die Daten von insgesamt 241 Patienten ein. Hier zeigte sich bezüglich der Altersverteilung ein signifikanter Unterschied zwischen Cluster I und Cluster II. In Cluster I ($52,2 \pm 13,7$) waren die Patienten durchschnittlich um 4 Jahre jünger als in Cluster II ($56,6 \pm 13,8$). Weiterhin stellte sich eine Verteilungsauffälligkeit in Bezug auf die neurologischen Syndrome innerhalb der Cluster dar. Es zeigte sich, dass Trigemini-Patienten signifikant häufiger in Cluster I vertreten waren und Polyneuropathie-Patienten deutlich mehr in Cluster II.

2.1.2 Probandenkollektiv

Die Akquisition des Probandenkollektivs von 253 gesunden Probanden erfolgte aus dem DNA-Probandenpool des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Dieses setzte sich aus 173 weiblichen Probanden mit einem Durchschnittsalter von $26,8 \pm 6,9$ Jahren und 80 männlichen Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von $28,4 \pm 7,0$ Jahren zusammen.

2.2 Ethik

Eine befürwortende Zustimmung bezüglich des Studienprotokolls fand durch die zuständige Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Kiel sowie durch die lokalen Ethikkomitees der teilnehmenden Zentren nach gründlicher Begutachtung statt. Von den teilnehmenden Versuchspersonen gaben alle ihr informiertes und schriftliches Einverständnis. Die Studie fand im Einklang mit den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki statt.

2.3 Studienort

Als Studienort dienten die Räume des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel.

2.4 Quantitativ sensorische Testung

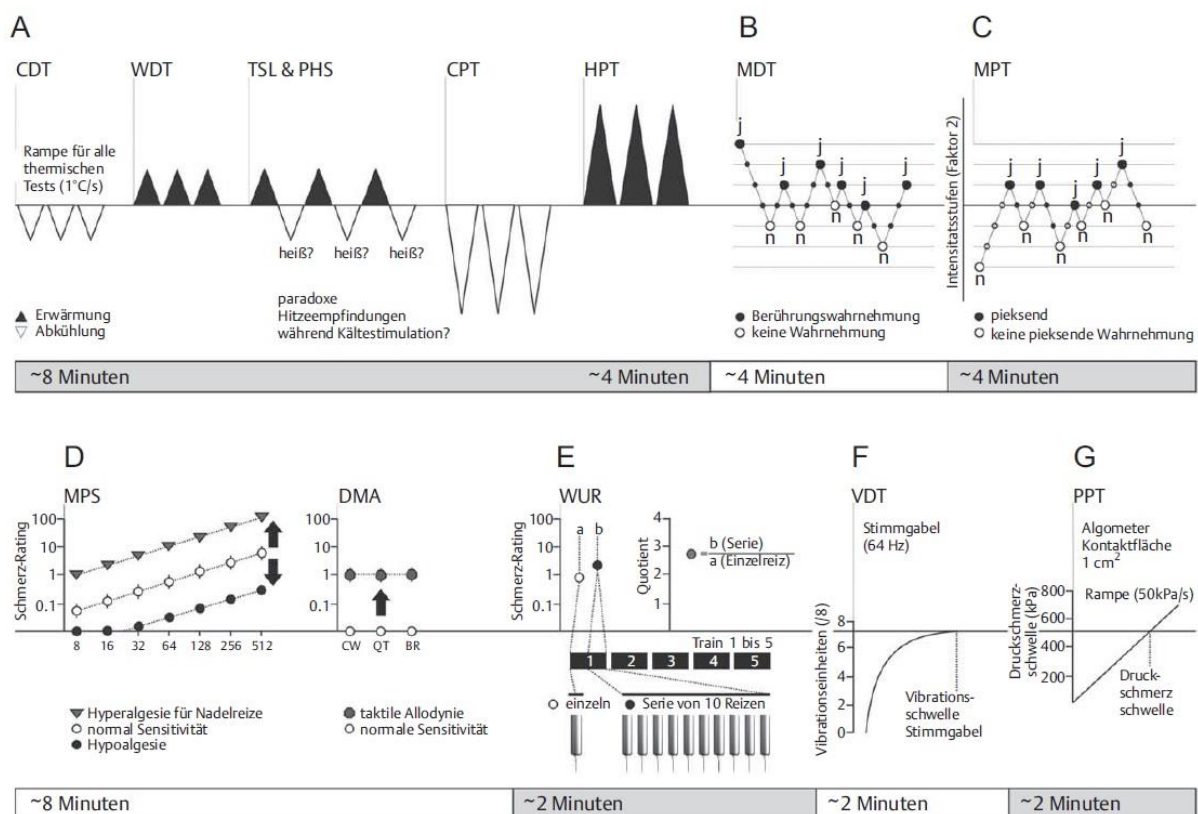


Abbildung 5: QST-Batterie der Testparameter im Verlaufsprotokoll

Es werden 13 Parameter in sieben Testprozeduren (A-G) erfasst.

A. Thermische Testung: Es werden Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen für kalte, warme und heiße Stimuli erhoben: CDT= Kaltschwelle (Funktion der C-Fasern); WDT= Warmschwelle (Funktion der A δ -Fasern); PHS= Zahl der paradoxen Hitzeempfindungen; TSL= thermische Unterschiedsschwelle für wechselnde warme und kalte Stimuli; CPT= Kaltschmerzschwelle (Funktion der C-Fasern); HPT= Hitzeschmerzschwelle (Funktion der C-Fasern).

B. Mechanische Schwellenwerttestung: MDT= Mechanischer Schwellenwert (Funktion der A β -Fasern)
 C. Mechanischen Schmerzschwellenwerttestung: MPT= Mechanischer Schmerzschwellenwert (Funktion der A δ -Fasern)

D. Reiz-Antwort-Testung: MPS= Mechanische Schmerzsensitivität oder Pinpricksensitivität (Funktion der A δ -Fasern); ALL= dynamisch mechanische Allodynie (Funktion der A δ -Fasern bei Pinprick-Stimuli und A β -Fasern bei Wattestimuli); Abkürzungen: CW= Wattebausch, QT= Q-Tip, BR= Pinsel

E. Wind-up-Phänomen Testung: WUR= Wind-up-Ratio

F. Vibrationsschwellenwert Testung: VDT= Vibrationsschwellenwert (Funktion der A β -Fasern)

G. Druckschmerzschwelle: PPT= Druckschmerzschwelle (wahrscheinlich Funktion der muskulären C- und A δ -Fasern). In Anlehnung an Rolke (2009)

Die phänotypische Charakterisierung der Patienten erfolgte über das geschulte Personal der neurologischen Teilnahmezentren mit Hilfe der quantitativ sensorischen Testung (QST) in Form von 13 thermischen und mechanischen Stimuli (Rolke, Baron et al. 2006). Als QST wird eine standardisierte Erweiterung der klinisch-neurologischen Sensibilitätsprüfung bezeichnet, die überwiegend in Studienprotokollen angewendet wird. Es werden klar definierte Reize auf die Haut oder tiefer liegendes Gewebe aufgebracht, um die Wahrnehmungs-, Schmerz-, oder Schmerztoleranzschwellen zu bestimmen. Dabei ist es möglich alle somatosensiblen Submodalitäten der Hautnervenfunktionen (C-, A δ und A β -Fasern) zu erfassen. Ferner bietet es einen Weg pathologische Nervenfunktionen bei neuropathischen Schmerzpatienten zu diagnostizieren und die vorherrschenden Pathomechanismen entweder der peripher oder der zentral veränderten Schmerzverarbeitung zuzuordnen. Ziel der Testung ist die Erkennung und Dokumentation von individuellen Sensibilitätsprofilen im Sinne sensorischer Ausfälle (Funktionsverluste) oder sensorischer Überempfindlichkeiten (Funktionszunahme im Rahmen von Hyperalgesie und Allodynie).

2.4.1 Bestimmung der thermischen Schwellen

Die Bestimmung der thermischen Schwellen erfolgte mit dem Thermal Sensory Analyzer II (TSA II Medoc Inc., Ramat Ishai, Israel/ TSA 2001-II, MEDOC, Israel, <http://healthsciences.qmuc.ac.uk/labweb/Equipment/TSA-2001.htm>). Der TSA II ist ein computergestütztes Gerät zur quantitativen Erfassung der Funktion von dünn myelinisierten A-Fasern sowie von unmyelinisierten C-Fasern.

Teil der Erhebung waren die QST-Werte für die Schwellenwerte von Kälte- und Wärmeempfindung (CDT und WDT), die thermische Unterschiedsschwelle (TSL) mittels alternierender Warm- und Kaltreize, mögliche dabei auftretende paradoxe Hitzeempfindungen (PHS) und die thermischen Kälte- und Hitzeschmerzschwellen (CPT und HPT). Der jeweilige QST-Wert dieser Parameter stellte den Temperaturdurchschnitt aus drei Testdurchläufen arithmetisch gemittelt dar.

2.4.2 Bestimmung der mechanischen Empfindungsschwelle

Bei der Bestimmung der mechanischen Empfindungsschwelle (MDT) wurden standardisierte von Frey Haare (OptiHair2, von Frey Filaments, MARSTOCKnervtest, Deutschland) verwendet, charakterisiert durch eine Kontaktfläche von $<1 \text{ mm}^2$ und einer runden Spitze, um die Nozizeptoren der Haut nicht zu aktivieren.

Bei der Anwendung übte jede Faser beim Biegen standardisiert taktile Reize von 0,25 mN- 512 mN aus. Die Bestimmung des QST-Wertes der mechanischen Empfindungsschwelle erfolgte in fünf Serien auf- im Wechsel mit fünf Serien absteigender Druckintensitäten und anschließender geometrischer Mittelung der Werte.

2.4.3 Bestimmung der mechanischen Schmerzschwelle

Als mechanische Schmerzschwelle (MPT= mechanical pain threshold) gilt die erstmalige Empfindung einer stechenden Qualität. Zur Testung diente hier ein Set von sieben Nadelreizstimulatoren (Pinprick punctate probes, Mainz), die mit definierten Reizintensitäten von 8 mN- 512 mN und einer Kontaktfläche von 0,2 mm Durchmesser appliziert wurden. Der QST-Wert für die MPT ergab sich aus dem geometrischen Mittelwert von fünf überschwelligen und fünf unterschwelligen Testwerten.

Dieser Test ist spezifisch für die Bestimmung einer Nadelreizhypoalgesie.

2.4.4 Bestimmung der mechanischen Schmerzsensitivität und Allodynie

Die Bestimmung der mechanischen Schmerzsensitivität (MPS= mechanical pain sensitivity) erfolgt mit dem gleichen Set stumpfer, standardisierter Nadelreizstimulatoren, die zur Erhebung des MPT verwendet wurden. Die Empfindung der balancierten Reihenfolge an Nadelreizen bewertete der Proband nach jeder Berührung auf einer Skala zwischen 0-100 (0= kein Schmerz, 100= der maximal vorstellbare Schmerz). Der QST-Wert für die MPS definierte sich aus dem arithmetischen Mittel aller numerischen Bewertungen der applizierten Nadelreize.

Dieser Test dient der Bestimmung der Nadelreizhyperalgesie.

Die Testung auf mechanisch dynamische Allodynie (DMA) erfolgte mit streichenden nicht schmerzhaften taktilen Reizen in Form eines Wattebausches (3 mN), eines Q-Tips (100 mN) und eines Pinsels (200-400 nM) (Somedic, Schweden). Diese Empfindungen bewertete der Proband ebenfalls auf einer Schmerzskala von 0-100. Der QST-Wert für die dynamisch mechanische Allodynie ergab sich aus dem Mittelwert der Ergebnisse der drei applizierten Reize.

2.4.5 Bestimmung des Wind-up Phänomens

Das Wind-up Phänomen ist die schmerzhafte Verstärkung eines Reizes, der durch eine mehrfache, kurz hintereinander erfolgte Applikation der gleichen Intensität charakterisiert ist. Der QST-Wert drückt das Verhältnis der Empfindung eines einzelnen applizierten Nadelreizes (128 mN über dem Gesicht oder 256 mN über Hand oder Fuß) zu einer Reihe von zehn kurz hintereinander applizierten Reizen der gleichen Intensität (1/s innerhalb einer Fläche von 1 cm²) aus. Die Bewertung der Reize erfolgt ebenfalls über die Schmerzskala von 0-100. Diese Erhebung erfolgte an fünf verschiedenen Hautarealen der gleichen Körperregion mit fünfmaliger Wiederholung. Der Durchschnittswert der Nadelreizfolge wurde durch den Durchschnittswert der einzelnen Stimulation geteilt. Das Ergebnis bildete die Wind-up Ratio oder das Wind-up Verhältnis (WUR).

2.4.6 Bestimmung der Vibrationsschwelle

Die Testung der Vibrationsschwelle (VDT= Vibration detection threshold) fand mit Hilfe einer Stimmgabel nach Rydell-Seiffer (64 Hz, 8/8 Skala) statt. Bei aufsteigender Frequenz wurde die Stimmgabel schwingend auf eine knöcherne Prominenz (Wangenknochen, Processus styloideus ulnae oder Malleolus medialis) gesetzt bis der Patient keine Vibration mehr verspürte. Der QST-Wert der Vibrationsempfindungsschwelle setzte sich aus dem arithmetischen Mittel von dreimaliger Testung des Vibrationsschwellenwertes zusammen.

2.4.7 Bestimmung der Druckschmerzschwelle

Der letzte der sieben Tests diente zur Erhebung der Druckschmerzschwelle (PPT= pain pressure threshold) oder des sogenannten Tiefendruckschmerzes.

Hierfür kam ein Druckalgometer (FDN200, Wagner Instruments, Greenwich, CT, USA) zur Verwendung, der mit einem Druck von bis zu 20 kg/cm³ (~2000 kPa) auf einem Testareal von 1 cm² Haut über definierten Muskeln (M. masseter, Thenarprominenz, Fußsohle) appliziert wurde.

Der QST-Wert der Druckschmerzschwelle ist der arithmetische Mittelwert aus den Ergebnissen einer Serie von drei Wiederholungen aufsteigender Reizintensitäten mit einem Anstieg von 50 kPa/s (~0.5 kg/cm²s).

2.4.8 Untersuchungsareale

Das schmerzhafteste Hautareal in der betroffenen Körperregion fungierte als Testareal und die zugehörige kontralaterale Seite als Kontrollareal. Im Falle von Polyneuropathie oder anderen symmetrischen neuropathischen Schmerzbedingungen wurde nur das klinisch am schwersten betroffene Gebiet evaluiert.

2.4.9 Cluster

Mittels hierarchischer Clusteranalyse konnten die Patienten, von denen ein kompletter QST-Datensatz existierte (n= 241), anhand ihrer Reaktionsprofile in zwei Cluster aufgeteilt werden. Dies erfolgte aus den Daten von elf QST-Testparametern nach z-Transformation (s. Statistik) (Binder, May et al. 2011). Demnach enthielt das Cluster I Patienten mit z-Werten maßgeblich mit Werten über null, die für eine allgemein erhöhte Sensibilität auf applizierte Reize sprechen. Bei Cluster II Patienten hingegen wurden im Vergleich prädominant negative z-Werte gemessen, die für eine allgemein verminderte Sensibilität auf die applizierten Reize stehen [Binder et al. 2011].

2.5 Genotypisierung

2.5.1 DNA-Isolation

Die Isolation der untersuchten genomischen DNA (gDNA) (whole genomic DNA) aus venösen Blutproben der Patienten und Kontrollprobanden beinhaltete fünf Schritte. Hierfür diente das Qiagen Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

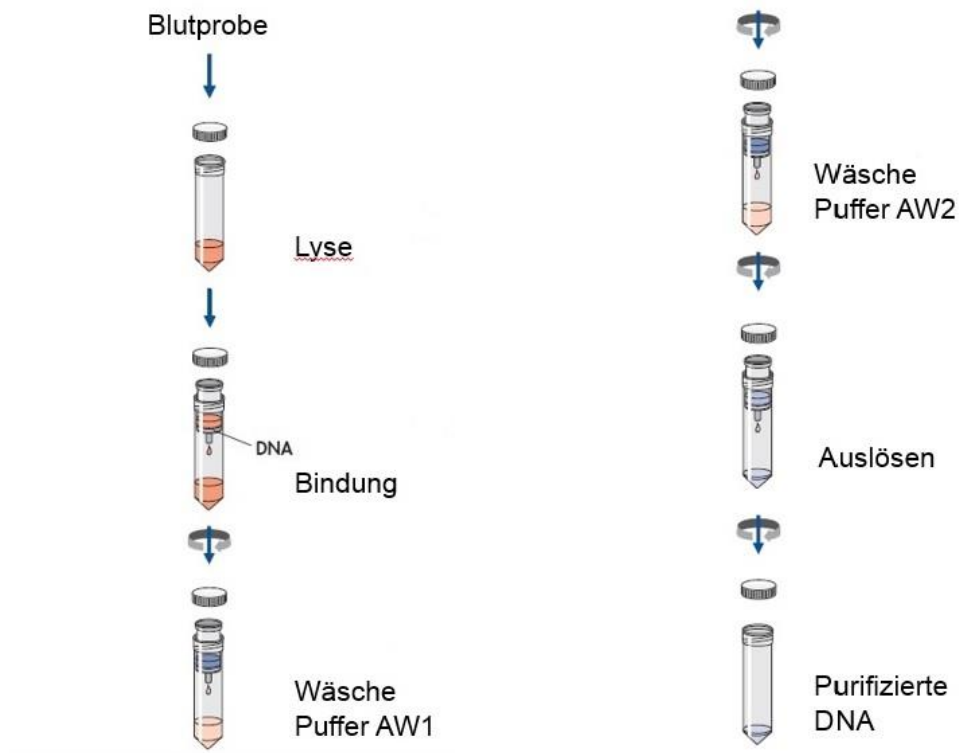


Abbildung 6: DNA-Extraktion aus einer Blutprobe mittels Qiagen Puregene Blood Kit

Die Spinmethode der DNA-Extraktion beinhaltet die Schritte der Lyse, Bindung der DNA an den Qiagenzylinderfilter, zwei Purifizierungsschritten und dem Auslösen der purifizierten DNA aus dem Filter. In Anlehnung an QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook (Qiagen 02.2015)

Die Extraktion der DNA aus 5 ml Blut erfolgte zunächst über eine Lyse mit Hilfe von 500 µl Qiagen Protease und 6 ml Buffer AL für zehn Minuten bei 70° C im Inkubator. Die Bindung der DNA an den Qiagenzylinderfilter im zweiten Schritt bestand aus einer dreiminütigen Zentrifugation mit 5 ml 100 % Ethanol. Nach Dekantierung des Überschusses schloss sich die erste Wäsche mit 5 ml Buffer AW1 und nach einer weiteren Zentrifugation für eine Minute bei 5000 rpm die zweite Wäsche mit 5 ml Buffer AW2 an. Anschließend erfolgte eine dritte Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 rpm. Nach erneuter Dekantierung des Überschusses fand das Auslösen der nun

purifizierten DNA aus dem Qiagenzylinderfilter unter Zugabe von zweimal 600 µl destilliertem Wasser mit einer zwischengeschalteten Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten und anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 5000 rpm statt (s. Qiagenhandbuch <http://www.algimed.by/download/EN-QIAamp-DNA-Blood-MidiMaxi-Handbook.pdf>). Der Nachweis und die Messung der Gesamtkonzentration der extrahierten gDNA erfolgte spektrophotometrisch über einen Nanotropf. Die gDNA der Patienten stammte aus dem Institut für Neurologie des medizinischen Universitätszentrums Rechts der Isar, Technische Universität München, während die gDNA der Probanden im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein akquiriert und isoliert wurde. Alle gDNA Proben wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.2 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) diente der systematischen und selektiven in-vitro Amplifikation von DNA- oder RNA-Segmenten von zehn bis vierzig Kilobasen (kb) Länge (Mullis, Faloona et al. 1986). In sich wiederholenden Zyklen, durchgeführt von programmierbaren Hitzeblöcken, auch Thermozykler genannt, fand die thermische Denaturierung des zu amplifizierenden doppelsträngigen DNA-Abschnittes, die Primeranlagerung sowie die enzymatische Synthese der DNA-Matrize statt.

Nach einer vorbereitenden Erhitzung zur Strangtrennung der zu vervielfältigenden DNA begann der erste geschlossene Zyklus der PCR. Die Zyklen liefen immer nach dem gleichen Schema ab:

1. DNA-Denaturierung: thermisch durch Erhitzung des PCR-Gemisches bis 94°C
2. Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrizen: Zwei Arten von Primer lagerten sich bei optimaler Temperatur am 3' Ende der komplementären denaturierten Einzelstrang-DNA an. Die Hybridisierungstemperatur war primerspezifisch und richtete sich nach der Zusammensetzung der Nukleotide (15-20 Basen).
3. DNA-Elongation: Bei optimaler Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase von 72°C verlängerte das Enzym ausgehend von den am 3' Ende an die DNA-Matrize angelagerten Primern den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt in Richtung 5' Ende. Es entstand eine exponentielle Vervielfältigung aus 2 hoch Zyklenanzahl.

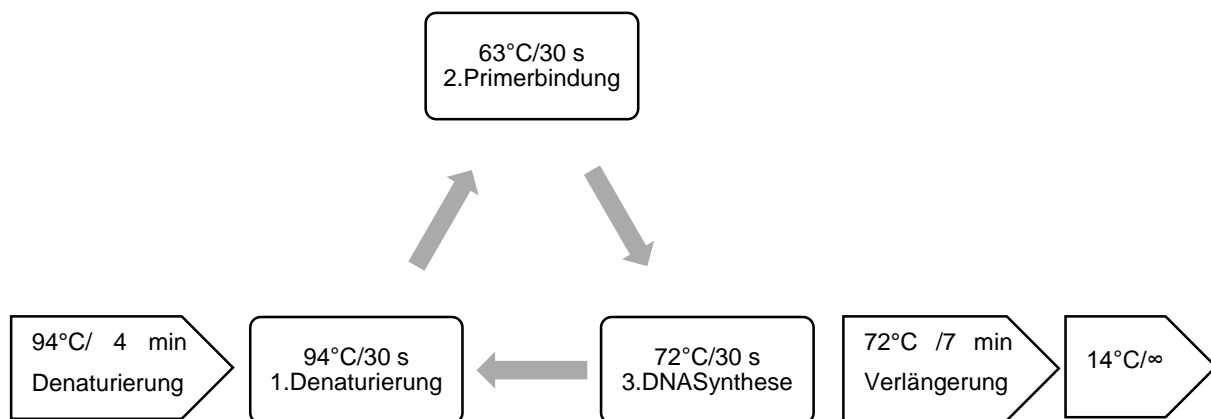


Abbildung 7: Der Polymerase-Kettenreaktionsablauf im Thermozykler

Die Polymerasekettenreaktion besteht nach einer primären Denaturierungsphase aus drei sich zyklisch wiederholenden Hauptvorgängen: 1. Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, 2. Primerbindung bei 63°C für 30 Sekunden und 3. DNA-Synthese bei 72°C für 30 Sekunden. Nach 50 abgelaufenen Hauptzyklen schließt sich die Verlängerung der DNA-Synthese für 7 Minuten an. Bis zur Entnahme der Proben ruhen die neu synthetisierten Proben bei 14°C.

Das Ende der PCR-Prozedur bildete ein abschließender Syntheseabschnitt bei 72°C für 7 min. Die Lagerung der neu replizierten DNA-Stränge erfolgte bei 14°C bis zur Entnahme aus dem Thermozykler. Die Primer waren zusammengesetzt aus synthetischen Oligonukleotiden, die die Bindung der DNA-Polymerase am gesuchten DNA-Segment über die Bereitstellung einer freien Hydroxygruppe ermöglichten. Das in dieser Studie verwendete Primerdesign stammte aus der Erstellungssoftware des Pyrosequenziergerätes (Biotage, Uppsala, Schweden). Bei der Erstellung der Primer wurde darauf geachtet, Hybridisierungen mit den anderen hinzugefügten Primern durch eine Wiederholungssequenz von mehr als vier gleicher Nukleotidfolgen zu vermeiden, da sie im Zweifelsfall zu einer fehlerhaften Primerbindung führen können (Ye, Coulouris et al. 2012). Die Charakteristika der für diese Studie verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Durch die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase des Archebakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), Enzym-Halbwertszeit beträgt ca. 9 Minuten bei einer Temperatur von 97,5°C, konnte der Temperaturanstieg bis auf 72° C im Denaturierungsschritt die Polymerase nicht beschädigen. So war keine Unterbrechung des geschlossenen Wiederholungszykluses durch Neuzugabe des Enzyms von Nöten. Die Zyklen liefen vollautomatisiert ab. Als Substrat der enzymatischen DNA-Synthese fungierten

synthetische Nukleotide. Da beide Einzelstränge des zu amplifizierenden DNA-Stranges als Vorlage dienten, vermehrte sich die Anzahl der gewünschten Kopien exponentiell (Saiki, Gelfand et al. 1988, Lawyer, Stoffel et al. 1993).

Tabelle 3: Primerinformationen der drei 5-HT2A Einzelstrangpolymorphismen für PCR und Pyrosequenzierung

SNP	Primer Name	Primer Sequenz
-1438A>G rs6311	5-HT2A	F5'-AGTATGTCCTCGGAGTGCTGTGA R5'-TGTTGGCTTTGGATGGAAGTG S5'-TTGGATGGAAGTGCC
102C>T rs6313	5-HT2A	F5'-TTAAATGATGACACCAGGCTCTAC R5'- AGGTTGGTTTCGATTTTCAGAGTC S5'- ATCAGAAGTGTTAGCTTCTC
452C>T rs6314	5-HT2A	F5'-GACTGCTCAATGGTTGCTCTAGG R5'- CACGGCAACTAGCCTATCACACAC S5'-TTAGAAGCCTCTTCAGAAT

SNP= engl. single nucleotide polymorphism, F= Forward, R= Reward, S= Sequenzierung

Für den Ablauf der Polymerase Kettenreaktion in dieser Studie wurden 1 µl aliquotierte gDNA mit den gesuchten zu amplifizierenden SNPs (s. Tab. 4), 25 µl PCR Mastermix (Biotage, Uppsala, Schweden), zusammengesetzt aus 17,6 µl destilliertem Wasser, 2,5 µl 10x PCR Pufferlösung ohne Magnesium (200 mM Tris-HCL, pH 8,4; 500 mM KCl), 2,5 µl dNTPs, 1,25 µl Magnesium Chlorid, 0,5 µl Forward- und 0,5 µl Rewardprimer und 0,15 µl Taq-Polymerase (Invitrogen, Deutschland) verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit Hilfe des Thermozyklers von GeneAmp9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Dieser arbeitete mit dem oben beschriebenen PCR-Reaktionsgemisch und 1 µl aliquotierter DNA verteilt in Arbeitsplatten mit 96 Vertiefungen. Der Nachweis der neu produzierten Stränge erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

Tabelle 4: 5-HT2A-Einzelstrangpolymorphismus (SNP) Charakteristika

Gen	Rs-Nummer	DNA Position	mRNA Position	Aminosäure
5-HT2A	rs6311	Promotor (-1438 A>G)	Promotor	
	rs6313	102 C>T	C236T	Ser34Ser
	rs6314	452 C>T	C1488T	His452Tyr

rs: reference SNP ID Number= Referenznummer des single nucleotide polymorphismus; mRNA: messenger RNA; A: Adenin; G: Guanin; C: Cytosin; T: Thymin; Ser: Serin; His: Histidin; Tyr: Tyrosin

Tabelle 5: Auflistung der Reagenzien für die PCR Reaktion von 1 µl DNA

Komponenten	Volumen [µl]	Konzentration
Destilliertes Wasser	17,6	
10X PCR Puffer –Mg	2,5	
dNTPs	2,5	2,5 mM
MgCl ₂	1,25	50 mM
Primer F	0,5	10 mM
Primer R	0,5	10 mM
Taq-Polymerase	0,15	
DNA	1	30-100 ng/ml
Gesamt	26	

µl: Mikroliter; mM: mmol; PCR: Polymerasekettenreaktion; Mg: Magnesium; dNTPs: Desoxyribonukleosidtriphosphate; MgCl₂: Magnesiumchloride; F: Forward; R: Reward; DNA: Desoxynucleinsäure

2.5.3 Die Agarose Gelelektrophorese

Das Verfahren der Agarose Gelelektrophorese ist eine biochemisch und molekularbiologische Methode um mit Hilfe von DNA-Strängen bekannter Größe und Masse DNA-Stränge von unbekannter Größe und Masse zu bestimmen. Dies geschieht mit Hilfe von Agarosepolymeren, die je nach Konzentration ein klein- oder großporiges Gel ergeben, das wie ein Sieb für die DNA-Moleküle wirkt.

In dieser Studie wurde 2%ige Agarose (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) verwendet, die vier Minuten bei 900 Watt in der Mikrowelle aufkochte und danach mit Ethidium Bromid (EtBr) versetzt wurde.

Tabelle 6: Komponenten der Agarose-Gelelektrophorese

Komponenten	Volumen
2% Agarose-Gel	
Agarose	3 g
TE-Puffer	150 ml
Ethidium Bromide	15 µl
Material für die Elektrophorese	
PCR-Produkt	7 µl
Blue Juice	3 µl
DNA-Leiter	10 µl
TBE-Puffer	

TE= TRIS+EDTA; PCR= Polymerasekettenreaktion, DNA= Desoxyribonukleinsäure; TBE=TRIS-Borsäure-EDTA

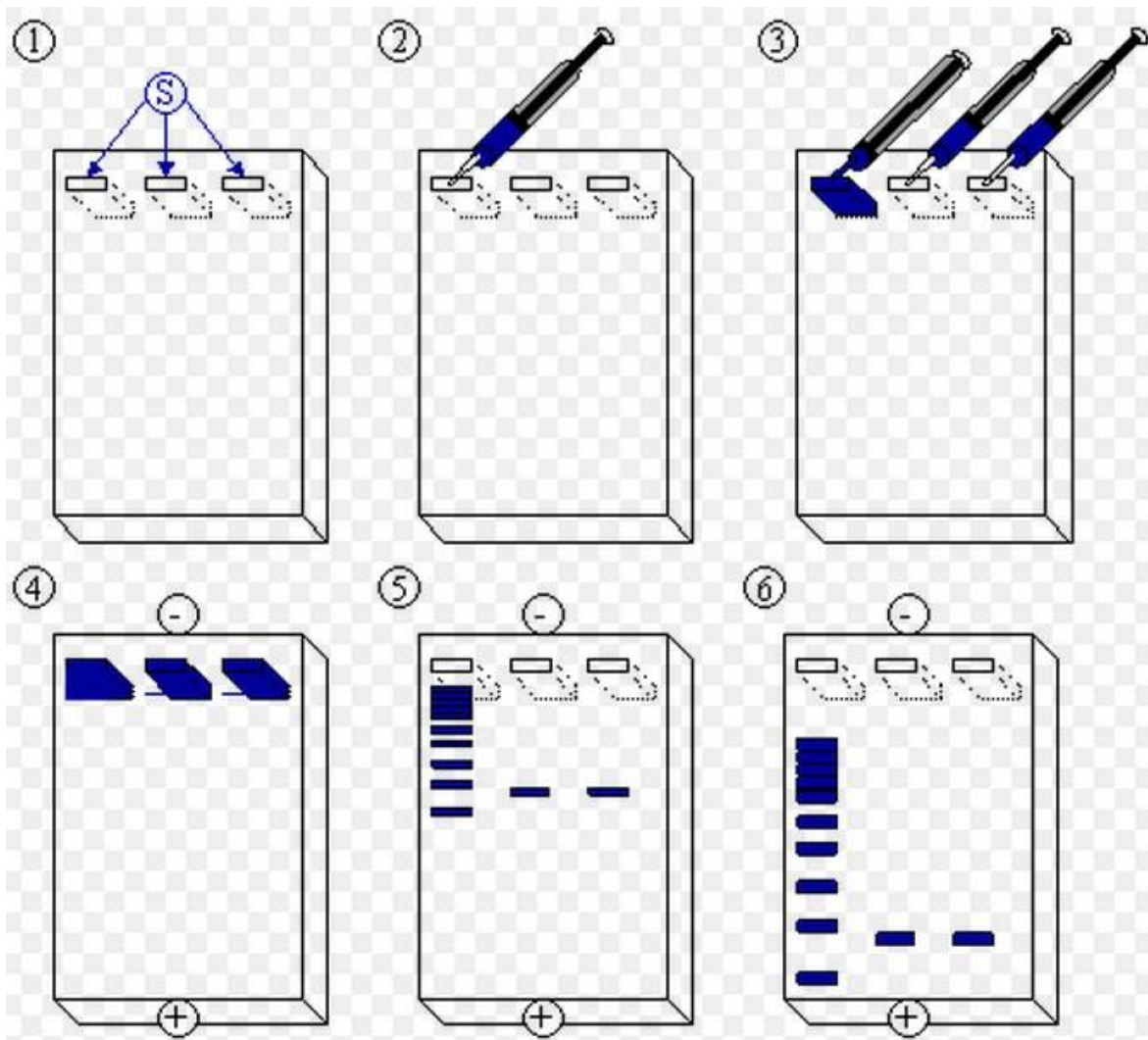


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Elektrophorese

1. Die Taschen für die Proben (S= engl. Samples)
 2. Beladen der Geltaschen mit der DNA-Leiter
 3. Beladen der Geltaschen mit den blaugefärbten DNA-Proben aus der Polymerasekettenreaktion
 4. Erzeugung eines elektrischen Feldes
 5. Wandern der DNA-Moleküle je nach Länge durch die Poren des Gels
 6. Endergebnis der DNA-Leiter zum Vergleich der Größe der amplifizierten DNA-Proben
- Quelle: Dr. Magnus Manske (Manske 18.02.2003, zitiert am 03.08.2016)

Zum Abkühlen und Verfestigen stand das Gemisch in einer vorgegebenen Form mit einem Kamm für die Taschen der DNA-Segment-Proben bei Raumtemperatur. Sobald das Gel eine feste Struktur erreicht hatte, konnte es in einer an den Strom anschließbaren Kammer platziert und mit EtBr-TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer übergossen werden, sodass es vollkommen bedeckt war. Die DNA-Proben, versetzt mit einer blauen Farbe (Blue Juice, Invitrogen, Deutschland) wurden in die nach Kammentfernung vorgefertigten Taschen pipettiert. Durch den Stromanschluss entstand ein elektrisches Feld mit einem Plus- und Minuspol an den jeweiligen Enden des Gels. Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle wanderten nun durch die

Poren des Gels in Richtung des Pluspols, wobei die kleineren Moleküle schneller durch die Poren des Gels wanderten. Im zeitlichen Verlauf erfolgte dadurch eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe. Die Geschwindigkeit der Moleküle hing darüber hinaus von der Feldstärke, der Nettoladung und dem Reibungskoeffizienten ab. Zum Vergleich fungierte eine DNA-Leiter mit Segmenten von bekannter Größe. Insgesamt dauerte die Aufteilung der DNA-Stränge in der Gelelektrophorese 30 Minuten bei 120 Volt. Das EtBr diente dazu die DNA-Segmentbanden im Kopiervorgang auf Fotopapier sichtbar zu machen. Es lagerte sich in den Zwischenräumen der DNA-Basen an und veränderte somit deren Adsorptionsspektrum. Bei der Dokumentation der Gelelektrophorese mit Hilfe des Kodak-Entwicklungsgerätes (Kodak, Stuttgart, Deutschland) erfolgte nach ultravioletter Lichtbestrahlung (260-360 nm) des Gels die Abbildung der Banden auf Fotopapier. Die DNA fluoresziert bei 590 nm Wellenlänge wobei die Intensität proportional zur DNA-Konzentration ist.

2.5.4 Die Pyrosequenzierung

Die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge der 5-HT_{2A}-Rezeptor Polymorphismen (SNPs) in den amplifizierten PCR-Proben erfolgte mit Hilfe der Pyrosequenzierungsmethode (Pyrosequencing AB, Schweden). Diese Methode der DNA-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip der Sanger-Methode, die zur Ermittlung der Sequenz mittels einer DNA-Polymerase den DNA-Gegenstrang synthetisiert, auch „sequencing-by-synthesis“ genannt (Sanger, Nicklen et al. 1977, Ronaghi, Karamohamed et al. 1996, Gharizadeh, Nordstrom et al. 2002). Da die Methode der Pyrosequenzierung einen begrenzten Leserahmen von ca. 1000 Basenpaaren aufweist, dient sie im Wesentlichen der Genotypisierung von SNPs. Das Verfahren basiert auf der Erkennung von Pyrophosphat (PPi), einem Nebenprodukt der DNA Synthese. In einer komplexen enzymatischen Folge wird das PPi zu ATP umgewandelt, das wiederum Energie für das Enzym Luciferase und dessen Umwandlungsreaktion von Luciferin zu Oxyluciferin bereitstellt. Dabei entsteht Licht, dessen Intensität sich proportional nach der Menge an inkorporierten Nukleotiden richtet und von einem Detektor wahrgenommen wird. Vorher bekannte SNP Daten werden währenddessen mit den Neuen abgeglichen und interpretiert. Der Vorgang geschieht vollautomatisiert und kann im sogenannten Pyrogramm mitverfolgt werden.

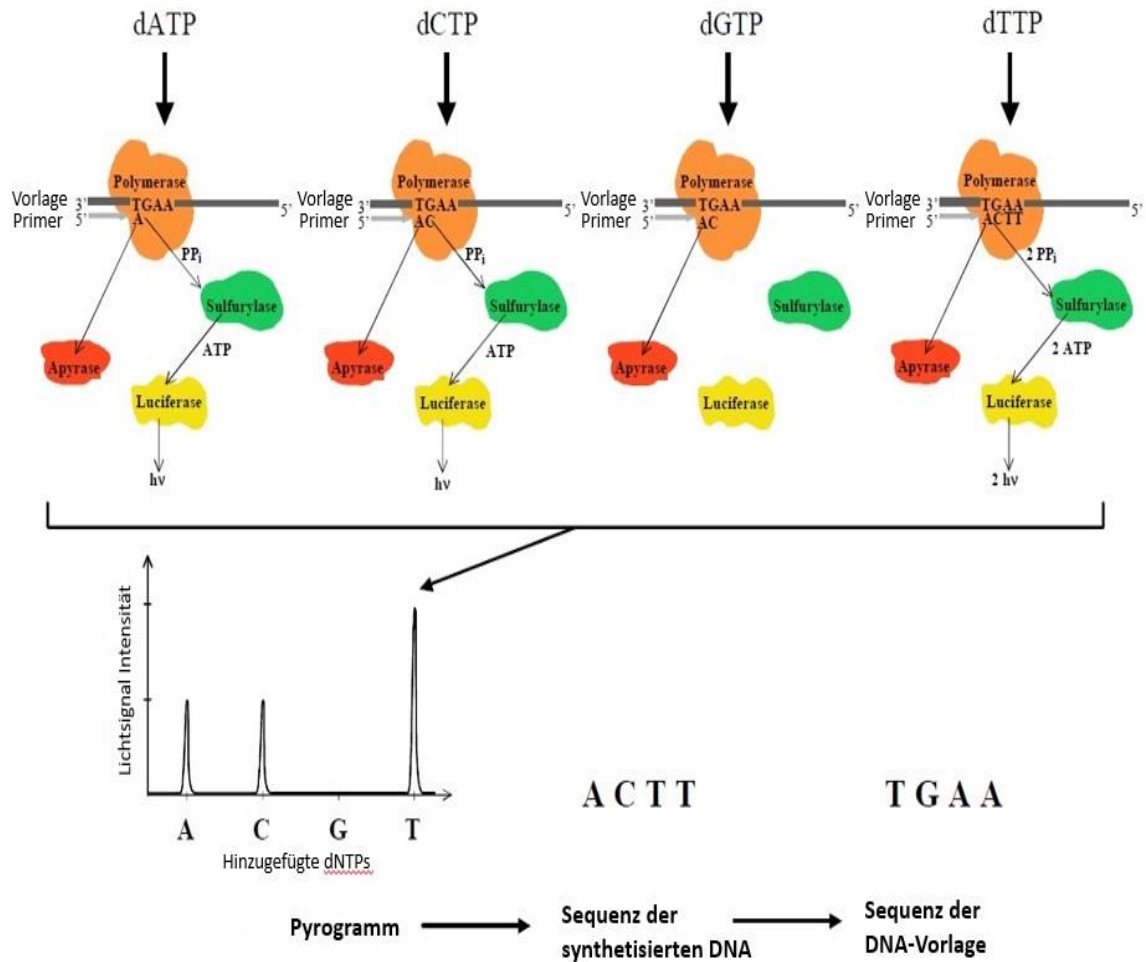


Abbildung 9: Schematische Repräsentation der Pyrosequenzierung

Im Falle einer komplementären Bindung des hinzugefügten dNTPs (Deoxynukleotidtriphosphats) an den Matrizenstrang, baut die Klenow Polymerase diese in den wachsenden DNA-Strang ein, wobei Pyrophosphat (PP_i) frei wird. Die ATP-Sulfurylase wandelt das PP_i in ATP um, das wiederum als Substrat für das lichtproduzierende Enzym Luziferase dient. Das produzierte Licht wird von einer CCD-Kamera (charged coupled device) detektiert und als Beweis für eine stattgefundenen Nukleotidinkorporation gewertet. Die Intensität des Lichtes korreliert mit der Anzahl der inkorporierten Nukleotide. In Anlehnung an Ahmadian, Ehn und Hober 2006 (Ahmadian, Ehn et al. 2006)

Die Vorbereitung zur Sequenzierung erforderte in einem ersten Schritt die Bindung von 10 µl DNA des amplifizierten PCR-Produktes, der als Matrizenstrang diente, an 3 µl Streptavidin bedeckte Sepharose-Kügelchen, die als Adapter mit komplementärer Adaptersequenz fungierten. Der zweite Schritt beinhaltete die Reinigung mit einem Gemisch aus 30 µl Ultrapurem Wasser und 37 µl Bindungspuffer (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden). Danach saugte die Vakuumpumpe der Vacuum Prep Workstation das Gemisch auf und hinterließ die Sepharose-Kügelchen mit der immobilisierten DNA im dafür vorgesehenen Filter. Die Herauslösung und Denaturierung der DNA-Doppelhelix an den Sepharose Kügelchen erfolgte durch die

Versetzung mit drei Substanzen: 1. mit 75% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) für fünf Sekunden, 2. mit Denaturierungspuffer (Biotage, Uppsala, Schweden) für fünf Sekunden und 3. mit Reinigungspuffer (Biotage) für zehn Sekunden. Der Reinigungspuffer diente der Neutralisierung der biotinylierten DNA. Für das weitere Vorgehen stand nun einzelsträngige DNA in einer Platte mit 96 Vertiefungen, die die Größe eines Sepharose-Kügelchens maßen, zur Verfügung. Pro Vertiefung kamen 11 µl Bindungspuffer und 1 µl Sequenzierungsprimer hinzu. Nach einer zweiminütigen Inkubation in einem Heizblock bei 80°C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur war der Prozess der Primerbindung an den Matrizenstrang vollzogen.

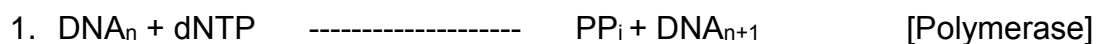
Tabelle 7: Komponenten der DNA Aufbereitung für die Pyrosequenzierung

Komponente	Volumen [µl]
Master-Mix für das PCR-Produkt	
Ultrapures Wasser	30
Bindungspuffer	37
Streptavidin Sepharose Kügelchen	3
PCR Produkt	10
Gesamt	80
Master-Mix für die Pyrosequenzierung	
Bindungspuffer	11
Sequenzierungsprimer	1
Einzelstrang-DNA	
Gesamt	12

PCR= Polymerasekettenreaktion

Für den korrekten Ablauf der anschließenden Pyrosequenzierung waren drei Bestandteile von Bedeutung: erstens das Enzymsystem, zweitens die Nukleotide und drittens die Substrate für die Reaktion. Der Kopf des Pyrosequenzers bestand aus vier Kartuschen für die Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin sowie zwei Kartuschen für die Enzyme und Substrate. Für die richtige Konzentration der Nukleotide lag eine Verdünnung von 1:1 mit dem TE-Puffer vor. Nach dem Einsetzen der Kartuschen und der Sequenzierplatte erfolgte der Start der

Pyrosequenzierungssoftware (Biotage). Diese berechnete das Volumen der beteiligten Enzyme: Klenow Polymerase (*Escherichia coli* DNA Polymerase I, Van Draanen et al. 1992), ATP Sulphurylase (*Sacchamycetes cerevisiae*, Nyrenand Lundin 1985), Luciferase (*Phoitus pyralis*, DeLuca und Mc Elroy 1984) und Apyrase (*Solanum tuberosum*, Traverso-Cori et al. 1965), der Substrate: Adenosine 5' Phosphosulphat (APS) und Luciferin sowie der vier Nukleotide. Die vier Reaktionen, die zyklisch im Pyrosequenzierungsgerät abliefen, waren folgende:



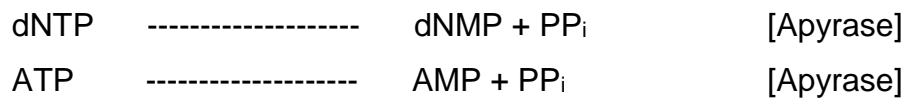
Die DNA Polymerisation fand statt, wenn das beigemischte Nukleotid komplementär an die vorhandene DNA-Matrize passte und die DNA-Polymerase es in den wachsenden DNA-Strang einbaute. Dabei entstand eine zur Anzahl der in den komplementären DNA-Strang eingebauten Nukleotide äquivalente Menge an freiem PP_i. Nukleotide wurden für den ersten Schritt einzeln mit der Polymerase in das Reaktionsgemisch pipettiert.



Konnte das hinzupipettierte Nukleotid im ersten Schritt eingebaut werden, produzierte das nun hinzugefügte Enzym ATP-Sulfurylase aus dem neu entstandenen anorganischen PP_i zusammen mit dem Substrat APS ATP.



Mit Hilfe des in der zweiten Reaktion produzierten ATP konnte in einer dritten Reaktion nach Addierung des Enzyms Luciferase Licht (560nm) generiert werden. Dieses wurde von einer CCD-Kamera (engl.= charged coupled device) aufgenommen. Das Lichtsignal entstand jedoch nur nach Inkorporation eines Nukleotids im ersten Reaktionsschritt und verhielt sich proportional zu der Menge an eingebauten Nukleotiden.



Handelte es sich bei dem hinzugefügten Nukleotid nicht um das passende komplementäre Nukleotid, so baute das Enzym Apyrase vor erneuter Zugabe einer weiteren der vier DNA-Basen in einer vierten Reaktion das nicht eingebaute Nukleotid sowie das APS ab. Der Abbau dieser Substrate zwischen den einzelnen Basenadditionen war notwendig, da es sonst zu erhöhten Komplikationen bei der synchronisierten DNA-Synthese kommen konnte. Darüber hinaus diente der enzymatische Abbau nach jedem Zyklus der Ergebnisspezifität, da das aufgenommene Lichtsignal beim Pipettieren eines bestimmten Nukleotids nur von dem Einbau dieses spezifischen Nukleotids herrühren sollte.

2.6 Statistik

Alle deskriptiven Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse aller Daten erfolgte mit Hilfe der SPSS Software 17.0. Statcalc (Version 6) wurde verwendet, um die Odds Ratio zu berechnen.

Die Berechnung der Allel- und Genotypfrequenzen der Patienten- und Kontrollkohorte, sowie Unterschiede in dichotomisierten QST-Werten in Beziehung zu den Zielpolymorphismen erfolgte mit dem Chi-Square Test und Yates-korrigiertem Chi-Square Test.

Die Unterschiede der QST-Parameter (Mittelwerte der Z-Werte) in Abhängigkeit der Genotypen wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse der dominant-rezessiv-Modelle mittels des t-Tests berechnet. Die Analyse von drei Variablen, die Auswirkung der SNP-Ausprägung in Assoziation zu den QST-Parametern, wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Testes und des Jonckheere-Terpstra-Testes untersucht.

Der Kruskal-Wallis-Test diente der Bestimmung des Unterschiedes der Reaktionsmuster der drei Ausprägungsformen eines SNP in Bezug auf jeden einzelnen QST-Parameter.

Der Jonckheere-Terpstra-Test bestimmte die statistische Signifikanz der Tendenz einer Mutation eines oder zweier Allele im Zusammenhang mit den einzelnen QST-Parametern.

Zusätzlich betrachtete der Mann-Whitney U-Test die Unterschiede der drei Variablen auf jeweils nur einer getesteten Seite (Test- oder Kontrollseite) in Bezug zu den QST-Parametern.

Die Korrektur für multiples Testen fand mit einem Wert von 100,000 Permutationen statt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wird als statistisch signifikant gewertet.

Die Werte der QST-Parameter waren alle bis auf CPT, HPT, VDT und PHS logarithmisch transformiert und als z-Werte berechnet mit Ausnahme von DMA und PHS, die in Originalwerten angegeben wurden (DMA 0-100 numerische Rating Skala und PHS 0-3). Z-Werte über „0“ zeigten einen Funktionszuwachs (Hyperalgesie, Allodynie) während z-Werte unter „0“ einen Funktionsverlust (Hypoesthesie, Hypoalgesie) erkennen ließen. Pathologische Werte wurden anhand von normativen Daten bestimmt (95% Konfidenzintervall= z-Wert von 0 ± 1.96) (Rolke, Baron et al. 2006). Darüber hinaus erfolgte eine Umwandlung der QST-Werte MPT, MPS, WUR und DMA in dichotomisierte Werte (1= pathologische Hypersensibilität, -1= pathologische Hyposensibilität).

Die Cluster Einteilung entstand mittels der Wards Methode wie an anderer Stelle beschrieben (Binder, May et al. 2011).

3. Ergebnisse

3.1 Genotypverteilung der 5-HT2A-Rezeptorvarianten

3.1.1 Allel- und Genotypverteilung bei neuropathischen Schmerzpatienten und gesunden Probanden

Zunächst wurde untersucht, ob 5-HT2A Rezeptorpolymorphismen (SNPs) als Einflussfaktor auf die allgemeine Schmerzempfindung und auf den Chronifizierungsprozess bei neuropathischen Schmerzen wirken. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt. Es handelt sich dabei um die Allel- und Genotypfrequenzen der drei ausgewählten 5-HT2A Rezeptorvarianten, 102C>T, 452C>T und -1438A>G, von 241 neuropathischen Schmerzpatienten und 253 gesunden Probanden.

Tabelle 8: Allelfrequenzen der 5-HT2A-Rezeptorvarianten bei Patienten und Probanden

Gen	Rs-Nummer	DNA Position	mRNA Position	Aminosäure	Allel	Pat.	Ktr.	p-Wert
5-HT 2A	rs6311	Promotor -1438A>G	Promotor		A			n.s.
					G	43,4	40,0	
	rs6313	102C>T	C236T	Ser34Ser	C	43,3	40,5	n.s.
					T			
rs6314	452C>T	C1488T	His452Tyr	C			n.s.	
				T	10	10,1		

Pat.= Patienten; Ktr.= Kontrollprobanden; n.s.= nicht signifikant; Die p-Werte wurden mit dem χ^2 Test berechnet.

Tabelle 9: Genotypverteilung der 5-HT2A Rezeptorvarianten in neuropathischen Schmerzpatienten verglichen mit gesunden Probanden

Gen	Rs-Nummer	DNA Position	mRNA Position	Aminosäure	Genotyp	Hap-Map	Pat.	Ktr.	p-Wert
5-HT 2A	rs6311	Promotor -1438A>G	Promotor		AA	31,7	32,3	35,6	n.s.
					AG	46,7	48,7	47,2	
					GG	21,7	19,0	16,9	
					CC	31,7	32,0	37,1	
rs6313	102C>T	C236T	Ser34Ser	CT	46,7	49,4	44,8	n.s.	
				TT	21,7	18,6	18,1		
				CC	85,0	81,1	82,3		
				CT	15,0	18,5	15,3		
rs6314	452C>T	C1488T	His452Tyr	CT	15,0	18,5	15,3	n.s.	
				TT	0,0	0,4	2,4		

Pat.= Patienten; Ktr.= Kontrollprobanden; n.s.= nicht signifikant; Die p-Werte wurden mit dem χ^2 Test berechnet.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Allel- und Genotypprävalenz der 102 C>T, 452 C>T und -1438 A>G Varianten zwischen neuropathischen Schmerzpatienten, gesunden Kontrollprobanden und den HapMap Projektdaten festgestellt werden. Alle untersuchten Genotypfrequenzen befinden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium.

3.1.2 Genotypverteilung bei Cluster I, Cluster II Patienten und gesunden Probanden

In einer weiterführenden Analyse untersuchten wir die Genotypverteilung in zwei gewählten Subgruppen, Cluster I und Cluster II, der neuropathischen Schmerzpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Diese stellte sich ebenfalls unauffällig dar. Die phänotypisch voneinander abweichenden Cluster I und Cluster II-Subgruppen wurden gemäß einer hierarchischen Clusteranalyse von Binder et al. 2011 anhand ihrer sensorischen QST-Profile eingeteilt (s. 2.1.1 Patientenkollektiv).

Tabelle 10: Genotypverteilung Cluster I vs Cluster II

Gen	rs-Nummer	DNA Position	mRNA Position	Aminosäure	Genotyp	Frequenz				p-Wert
						Cluster I		Cluster II		
						N	%	N	%	
5-HT 2A	rs6311	Promotor -1438A>G	Promotor		AA	13	19.1	16	23.9	n.s.
					AG	31	45.6	35	52.2	
					GG	24	35.3	16	23.9	
					CC	13	19.4	14	21.2	
5-HT 2A	rs6313	102C>T	C236T	Ser34Ser	CT	30	44.8	36	54.6	n.s.
					TT	24	35.8	16	24.2	
					CC	49	75.4	54	80.5	
5-HT 2A	rs6314	452C>T	C1488T	His452Tyr	CT	16	24.6	12	18.0	n.s.
					TT	0	0	1	1.5	
					CC	0	0	0	0	

Die p-Werte wurden mit dem χ^2 Test berechnet.

Tabelle 11: Genotypverteilung Cluster I und Probanden

Gen	rs-Nummer	DNA Position	mRNA Position	Aminosäure	Genotyp	Frequenz				p-Wert
						Cluster I		Kontrollen		
						N	%	N	%	
5-HT 2A	rs6311	Promotor -1438A>G	Promotor		AA	13	19.1	42	16.9	n.s.
					AG	31	45.6	117	47.2	
					GG	24	35.3	89	35.9	
	rs6313	102C>T	C236T	Ser34Ser	CC	13	19.4	44	18.4	
					CT	30	44.8	108	45.2	
					TT	24	35.8	87	36.4	
rs6314	452C>T	C1488T	His452Tyr	CC	49	75.4	204	82.3		
				CT	16	24.6	38	15.3		
				TT	0	0	6	2.4		

Die p-Werte wurden mit dem χ^2 Test berechnet.

Tabelle 12: Genotypverteilung Cluster II und Probanden

Gen	rs-Nummer	DNA Position	mRNA Position	Aminosäure	Genotyp	Frequenz				p-Wert
						Cluster II				
						N	%	N	%	
5-HT 2A	rs6311	Promotor -1438A>G	Promotor		AA	16	23.9	42	16.9	n.s.
					AG	35	52.2	117	47.2	
					GG	16	23.9	89	35.9	
	rs6313	102C>T	C236T	Ser34Ser	CC	14	21.2	44	18.4	
					CT	36	54.6	108	45.2	
					TT	16	24.2	87	36.4	
rs6314	452C>T	C1488T	His452Tyr	CC	54	80.5	204	82.3		
				CT	12	18.0	38	15.3		
				TT	1	1.5	6	2.4		

n.s.= nicht signifikant; Die p-Werte wurden mit dem χ^2 Test berechnet.

3.2 Phänotypverteilung der 5-HT_{2A}-Rezeptorvarianten bei neuropathischen Schmerzpatienten

3.2.1 Einfluss der 5-HT_{2A}-Polymorphismen auf die Schmerzempfindung bei neuropathischen Schmerzpatienten

Bezüglich der Frage, ob ein Einfluss der Polymorphismen 102 C>T, 452 C>T und -1438 A>G auf die Ausprägung von klinisch messbaren Zeichen des neuropathischen Schmerzes (QST-Parameter) bei Patienten besteht, erfolgte eine Analyse mittels des Kruskal-Wallis- und Jonckheere-Terpstra-Testes. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 13-16 dargestellt.

Die dreizehn QST-Parameter spiegelten die somatosensorische Funktion von C, A δ und A β -Fasern neuropathischer Schmerzpatienten auf der vom Schmerz betroffenen (Testseite) sowie der nicht schmerzhaften Gegenseite (Kontrollseite) wieder. Die spezifische Repräsentation der afferenten Nervenfasern durch QST-Parameter war folgendermaßen aufgeteilt: WDT, TSL, CPT und HPT repräsentierten die Funktion der C-Fasern, CDT, MPT, MPS, WUR und PPT die Funktion der A δ -Fasern und MDT sowie VDT die Funktion der großkalibrigen A β -Fasern. Unter Anwendung der hierarchischen Clusteranalyse wurden die Patienten für die Auswertung zunächst in zwei phänotypisch voneinander unterschiedliche Subgruppen Cluster I und Cluster II eingeteilt (Binder et al. 2011, Abb. 2). Das Cluster I bildete die Gruppe der Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Nervenfunktion, das Tendenzen zu verstärkten somatosensorischen Reaktionen aufwies, während das Cluster II aus Patienten mit einer allgemein verminderten Reaktion der getesteten Nervenfasern entsprechend einem Verlust der Funktion von großen und kleinen Nervenfasern bestand.

3.2.1 Cluster I (n= 121; hypersensibel)

In der Analyse von Cluster I Patienten zeigte sich keine statistische Evidenz für eine Assoziation zwischen den drei SNPs 102C>T, 452C>T und -1438A>G des 5-HT2A Rezeptorgens und den getesteten thermischen und mechanischen QST-Parametern. Sämtliche p-Werte waren nicht signifikant.

Tabelle 13: Cluster I, 5-HT2A-Rezeptorvarianten und thermische QST-Parameter

Gen	SNP (DNA Pos.)	Stat.	Quantitativ sensorische Testparameter										
			CDT		WDT		TSL		CPT		HPT		
			Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	
5- HT2 A	102C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	452C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	-1438A>G	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Pos.= Position; Stat.= Statistische Analyse; KW= Kruskal-Wallis-Test; JT= Jonckheere-Terpstra-Test; Test= Testseite; Ktr.= Kontrollseite. Der Kruskal-Wallis-Test und Jonckheere-Terpstra-Test wurden für den Vergleich der elf QST-Parameter mit den ausgewählten Genotypen der 5-HT2A Rezeptorpolymorphismen verwendet. Es bestehen keine signifikanten Korrelationen zwischen dem 5-HT2A SNPs und den thermischen QST-Parametern.

Tabelle 14: Cluster I, 5-HT2A-Rezeptorvarianten und mechanische QST-Parameter

Gen	SNP (DNA Pos.)	Stat.	Quantitativ sensorische Testparameter												
			MDT		MPT		MPS		WUR		VDT		PPT		
			Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	
5- HT2 A	102C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	452C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	-1438A>G	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

DNA Pos.= DNA Position; Stat.= Statistische Analyse; KW= Kruskal-Wallis-Test; JT= Jonckheere-Terpstra-Test; Test= Testseite, Ktr.= Kontrollseite. Der Kruskal-Wallis-Test und Jonckheere-Terpstra-Test wurden für den Vergleich der elf QST-Parameter mit den ausgewählten Genotypen der 5-HT2A Rezeptorpolymorphismen verwendet. Es bestehen keine signifikanten Korrelationen zwischen den 5-HT2A SNPs und den mechanischen QST-Parametern.

3.2.2 Cluster II (n= 120; hyposensibel)

In der Analyse der Cluster II Patienten fand sich im Gegensatz zu Cluster I Patienten eine signifikante Assoziation. Diese bestand zwischen der 102C>T Variante des 5-HT2A-Rezeptorgens mit dem QST Parameter der mechanischen Schmerzschwelle (MPT; KW: $p=0.004$; JT: $p= 0.001$ nach Korrektur für multiples Testen; Tab. 16, Abb. 10). Eine zunächst ebenfalls signifikant auffällige Assoziation im 102C>T Polymorphismus des 5-HT2A Rezeptorgens mit dem QST-Parameter MPS (KW: $p= 0.017$; JT: $p= 0.046$) verlor nach der Korrektur für multiples Testen seine Signifikanz. Ebenso verhielt es sich mit den signifikanten Assoziationen der 102C>T Variante und den QST-Parametern der Kälteerkennungsschwelle (CDT), der Kälteschmerzschwelle (CPT), der mechanischen Detektionsschwelle (MDT) sowie der signifikanten Assoziationen der 452C>T Variante mit dem QST-Parameter der Hitzeschmerzschwelle (HPT) der Kontrollseite und der -1438A>G Variante mit den QST-Parametern CDT, CPT, MDT, MPT und MPS.

Um den Einfluss des 102C>T SNPs des 5-HT2A Rezeptors auf die QST-Parameter der Testseite zu verdeutlichen, wurden die Daten für Cluster I und Cluster II Patienten in Abbildung 10 und 11 grafisch dargestellt. Die gemessenen QST-Werte wurden als z-Wert dargestellt (s. 2.6 Statistik zur Berechnung des z-Wertes). Der z-Wert null war definiert als die Durchschnittsreaktion der vom DFNS getesteten gesunden Probanden und bedeutete eine physiologische Nervenfasernfunktion.

Tabelle 15: Cluster II: 5-HT2A-Rezeptorvarianten und thermische QST-Parameter

Gen	SNP (DNA Pos.)	Stat.	Quantitativ sensorische Testparameter										
			CDT		WDT		TSL		CPT		HPT		
			Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	
5-HT2A	102C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	452C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.045
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.013
	-1438A>G	KW	0.022	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.026	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	0.021	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Pos.= Position; Stat.= Statistische Analyse; KW= Kruskal-Wallis-Test; JT= Jonkheere-Terpstra-Test; Ktr.= Kontrollseite; n.s.= nicht signifikant. Der Kruskal-Wallis-Test und Jonckheere-Terpstra-Test wurden für den Vergleich der elf QST-Parameter mit den ausgewählten Genotypen der 5-HT2A Rezeptorpolymorphismen verwendet. Signifikanten Assoziationen: 452C>T und HPT der Kontrollseite sowie -1438A>G, CDT und CPT der Testseite. Es zeigten sich keine Signifikanzen nach Bonferroni Korrektur.

Tabelle 16: Cluster II: 5-HT2A-Rezeptorvarianten und mechanische QST-Parameter

Gen	SNP (DNA Pos.)	Stat.	Quantitativ sensorische Testparameter											
			MDT		MPT		MPS		WUR		VDT		PPT	
			Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.	Test	Ktr.
5-HT2A	102C>T	KW	n.s.	n.s.	0.004	n.s.	0.017	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	0.001	n.s.	0.046	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	452C>T	KW	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	-1438A>G	KW	0.022	n.s.	0.026	n.s.	0.023	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		JT	0.021	n.s.	0.013	n.s.	0.038	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Pos.= Position; Stat.= Statistische Analyse; KW= Kruskal-Wallis-Test; JT= Jonkheere-Terpstra-Test; Ktr.= Kontrollseite; n.s.= nicht signifikant. Der Kruskal-Wallis-Test und Jonckheere-Terpstra-Test wurden für den Vergleich der elf QST-Parameter mit den ausgewählten Genotypen der 5-HT2A Rezeptorpolymorphismen verwendet. Signifikanten Assoziationen: Zwischen dem 5-HT2A SNP 102C>T, MPT und MPS der Testseite sowie -1438A>G, MDT, MPT und MPS der Testseite. Nach Bonferroni-Korrektur blieb die Signifikanz der Assoziation zwischen 102C>T und dem QST-Parameter MPT auf der Testseite bestehen.

Je weiter die Werte ins Positive reichten, desto stärker empfand der Patient den gesetzten Reiz am untersuchten Areal. Befanden sich die Werte unter null, so entsprach das einer vergleichsweise verminderten Reizwahrnehmung im getesteten Areal. 1.96 und -1.96 repräsentierten die Grenzen des 95%-Konfidenzintervalls der Normalverteilung, dementsprechend sind in den dargestellten Diagrammen die Grenzen von 2 und -2 eingetragen.

Die signifikante Assoziation im Bereich der mechanischen Testparameter bei Cluster II Patienten ist gekennzeichnet durch einen Pfeil (MPT). Hier zeigte sich anhand der Analyse des Kruskal-Wallis-Testes, dass homozygote TT-Allelträger im Durchschnitt signifikant höhere z-Werte präsentierten als die homozygoten CC-Träger. Alle z-Werte der verschiedenen Genotypausprägungen befanden sich für den Parameter MPT im positiven Bereich innerhalb des Konfidenzintervalls.

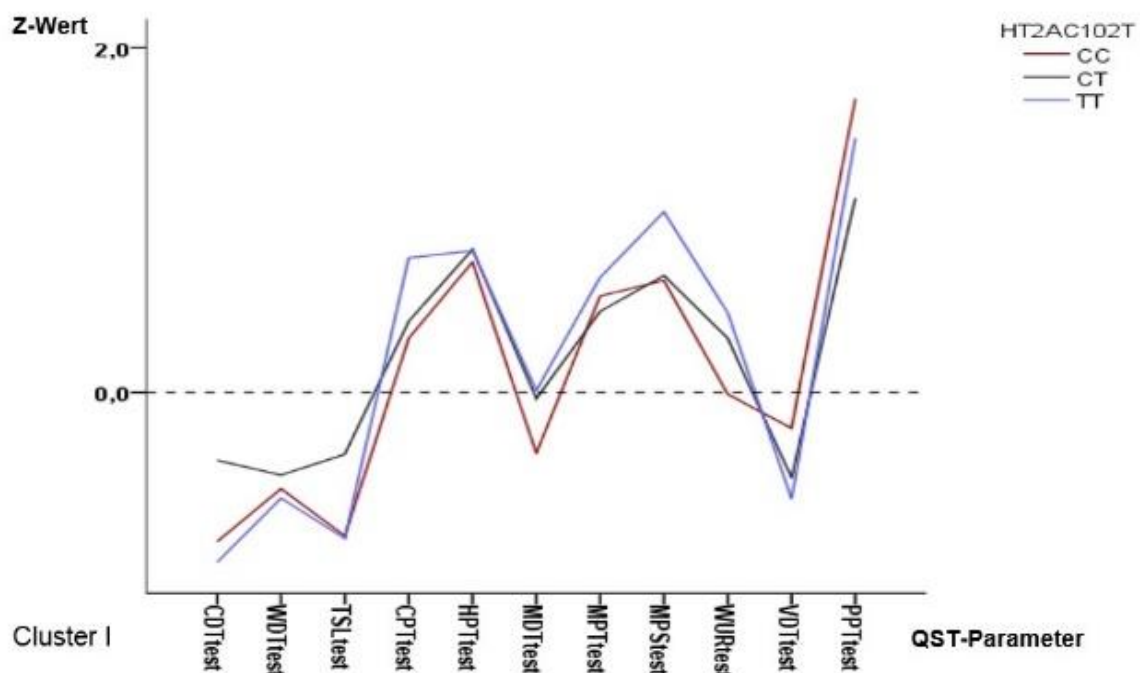


Abbildung 10: Der Einfluss der 5-HT2A 102C>T Rezeptorvariante auf die QST-Parameter in Cluster I Patienten

Darstellung der Auswirkung der 5-HT2A-Variante 102C>T in Bezug auf das somatosensorischen QST-Profil in Cluster I Patienten. Die Werte für WDT-HPT spiegeln die Funktion der C-Fasern, MPT-WUR+ PPT und CDT die Funktion der A δ -Fasern und MDT+ VDT die Funktion der A β -Fasern wieder. Signifikante Reaktionsunterschiede zeigten sich nach Bonferroni Korrektur in Cluster II Patienten nicht.

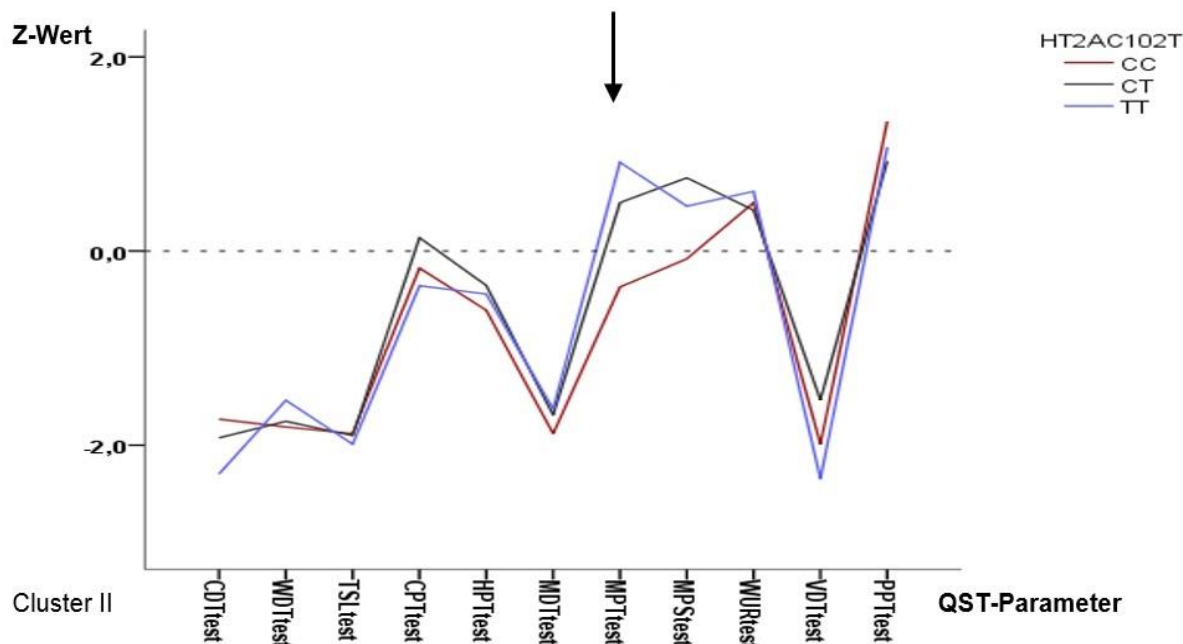


Abbildung 11: Der Einfluss der 5-HT2A 102C>T Rezeptorvariante auf die QST-Parameter in Clusterpatienten

Darstellung der Auswirkung der 5-HT2A-Variante 102C>T in Bezug auf das somatosensorischen QST-Profil in Cluster II Patienten. Die Werte für WDT-HPT spiegeln die Funktion der C-Fasern, MPT-WUR+PPT und CDT die Funktion der A δ -Fasern und MDT+VDT die Funktion der A β -Fasern wieder. Signifikante Reaktionsunterschiede zeigten sich nach Bonferroni Korrektur in der Testung des mechanischen Schmerzschwellenwertes (MPT). Der homozygote TT-Allelträger zeigte eine signifikant stärkere Schmerzreaktion, als der homozygote CC-Träger.

3.2.2. 5-HT2A-Rezeptorvarianten und mechanische Hyperästhesie

Zudem wurden die 5-HT2A-Rezeptorvarianten auf deren Einfluss bei der Entwicklung der zentralen Sensibilisierung geprüft. Hinweise für das Vorliegen einer zentralen Sensibilisierung können eine reduzierte mechanische Schmerzschwelle (MPT), eine erhöhte mechanische Schmerzsensitivität (Nadelreizhyperalgesie (MPS)), der Nachweis dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) oder eine erhöhte Wind-up Ratio (WUR) sein (Treede and Magerl 2000).

In Tabelle 17 sind die signifikanten Assoziationen zwischen den 5-HT2A Rezeptorvarianten und möglichen Korrelaten der zentralen Sensibilisierung (WUR, MPT, MPS und DMA) bei Cluster I und II Patienten zusammengefasst.

Tabelle 17: Signifikante Assoziationen zwischen 5-HT2A Rezeptorvarianten und mechanischen Reizen von Cluster I und II Patienten

Cluster	SNP	Mechanische QST-Parameter			
		WUR ¹	MPT ¹	MPS ¹	DMA ²
Cluster I N= 121	102C>T	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	452C>T	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	-1438A>G	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Cluster II N= 120	102C>T	n.s.	0,004/0,001*	0,017/0,046	n.s.
	452C>T	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	-1438A>G	n.s.	0,026/0,013	0,023/0,038	n.s.

WUR= Wind-Up-Ratio, MPT= mechanische Schmerzschwelle, MPS= mechanische Schmerzsensitivität, DMA= Dynamisch mechanische Allodynie; N= Anzahl. ¹ Berechnung mittels nicht-parametrischer Tests (Kruskal-Wallis-Test, Jonckheere-Terpstra Test; Mann-Whitney-U-Test), ² Berechnung mittels χ^2 -Test; * Dieser Wert blieb auch nach der Korrektur für multiple Vergleiche signifikant.

3.2.2.1 5-HT2A 102C>T und mechanische Schmerzschwelle (MPT)

Während es bei Cluster I Patienten, wie schon erwähnt, keine signifikanten Assoziationen mit QST-Parametern gab, konnte im zweiten Cluster die signifikante Assoziation zwischen 5-HT2A 102C>T und dem QST-Parameter für mechanische Schmerzschwelle ($p=0,001$ nach Korrektur für multiples Testen) identifiziert werden.

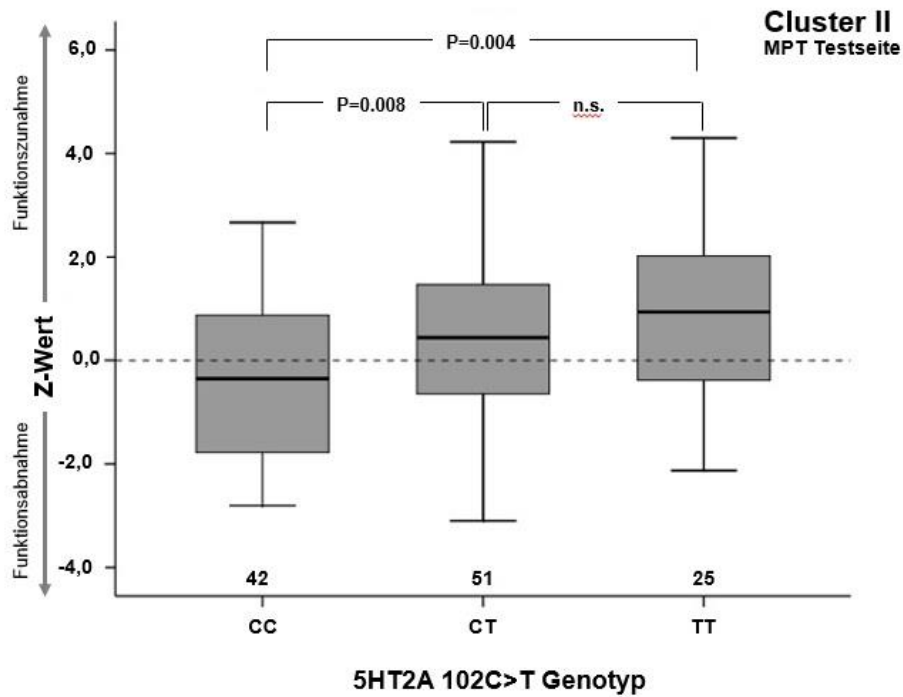
In der detaillierten Betrachtung der Reaktionsmuster von Cluster II Patienten auf der Testseite in Bezug auf die Nadelreizschmerzschwelle in Abhängigkeit ihres Genotyps zeigte sich eine klare Verteilung der z-Werte in Korrelation mit dem Vorliegen eines T-Allels. Patienten mit dem homozygoten TT-Genotyp wiesen in dieser Studie zu 5/6 eine Funktionszunahme der bei MPT getesteten A δ -Faser auf. Dies spiegelt sich in Abbildung 12A mit einer Z-Wert-Verteilung überwiegend oberhalb der Nulllinie wieder. Der Median liegt bei circa 1 im Konfidenzintervall und das obere Quartil des Boxplots der homozygoten T-Allelträger erstreckt sich leicht über die obere Grenze des Konfidenzintervalls von +1,96. Die Extremwerte beschränken sich im Funktionsabnahmebereich auf das Konfidenzintervall (-1,96) und reichen im Bereich der Nervenfunktionszunahme über +4 hinaus. Die heterozygote CT-Gruppe weicht in ihrer Reaktionsweise nicht signifikant von der TT-Gruppe ab. In Abbildung 12A liegt der Median ebenfalls im positiven Bereich. Lediglich die Extremwerte sind deutlich weiter gestreut von -3 bis über +4. Im Gegensatz dazu präsentierten Patienten mit der Wildtypausprägung (C/C) im Vergleich zu den Genotypen mit einem T-Allel eine signifikant verminderte Reaktionsbereitschaft auf den gesetzten Nadelreiz. Bei Betrachtung der Abbildung 12A und B erkennt man, dass der Median des CC-

Genotyps unterhalb der Nulllinie liegt, dementsprechend die meisten Reaktionen im Bereich der Hypästhesie angesiedelt sind. Das obere Quartil zeigt an, dass jedoch auch CC-Allelträger mit Hyperästhesie auf den Nadelreiz reagiert haben, da sich der Boxplot bis zu 1/3 in den Funktionszunahmebereich der A δ -Fasern oberhalb der Nulllinie erstreckt.

Insgesamt gesehen waren die gemessenen Schwellenwerte des schmerzhaft mechanischen Reizes signifikant niedriger für Träger der Variantenausprägung als für Wildtypträger. In dieser Untersuchung zeigte sich eine Abhängigkeit der Empfindung schmerzhafter mechanischer Stimuli vom T-Allel im Sinne einer Verstärkung der mechanischen Hyperästhesie bei Varianten. Diese präsentierten demzufolge einen Großteil ihrer Phänotypen im Bereich der Hypersensitivität im Gegensatz zur Verteilung der Wildtypen, die hauptsächlich mit ihrer Reaktion im Bereich der Hyposensitivität aufzufinden waren.

Nach Anwendung des dominant-rezessiv-Modells imponiert dieser Unterschied noch deutlicher. Es zeigte sich unverkennbar eine Hyperreagibilität bei Trägern des varianten Allels (Abb. 12B).

A)



B)

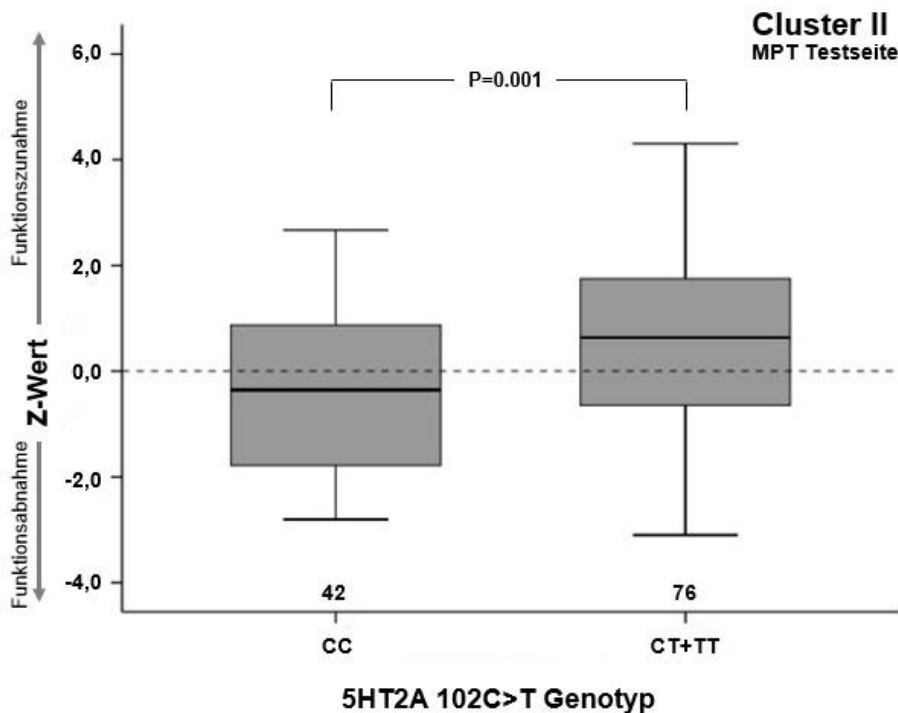


Abbildung 12 (A+B): Assoziation des 5-HT-2A 102 C>T Genotyps von Cluster II Patienten mit der mechanischen Schmerzschwelle (MPT)

A) Es wird sichtbar, dass nicht nur eine signifikante Assoziation in der 102C>T Variante mit den unterschiedlichen Genotypen in Bezug auf die Schmerzschwelle bei der mechanischen Schmerzschwelle (MPT) besteht, sondern dass die z-Werte auch signifikant durch das Vorkommen des T-Allels beeinflusst werden ($p=0,004$ und $p=0,008$).

B) Das dominant-rezessiv Modell verdeutlicht den signifikanten Unterschied ($p=0,001$) zwischen dem zu hyposensiblen Reaktionen neigendem Wildtyp CC und den zu hypersensiblen Reaktionen neigenden Varianten CT+TT.

In der Untersuchung des signifikant assoziierten QST-Parameters MPT in der Cluster II Subgruppe konnten darüber hinaus eine weitere Auffälligkeit festgestellt werden. Es zeigte sich, dass der signifikante Unterschied in der Schmerzreaktion zwischen den Genotypausprägungen nur im Testareal, das heißt im vom neuropathischen Schmerz betroffenen Areal, aufzufinden war. Dieses Phänomen konnte auf der gesunden, nicht vom neuropathischen Schmerz betroffenen, Kontrollseite nicht nachgewiesen werden (Abb. 13). Die lineare Analyse sowie die Trendanalyse blieben beide unauffällig.

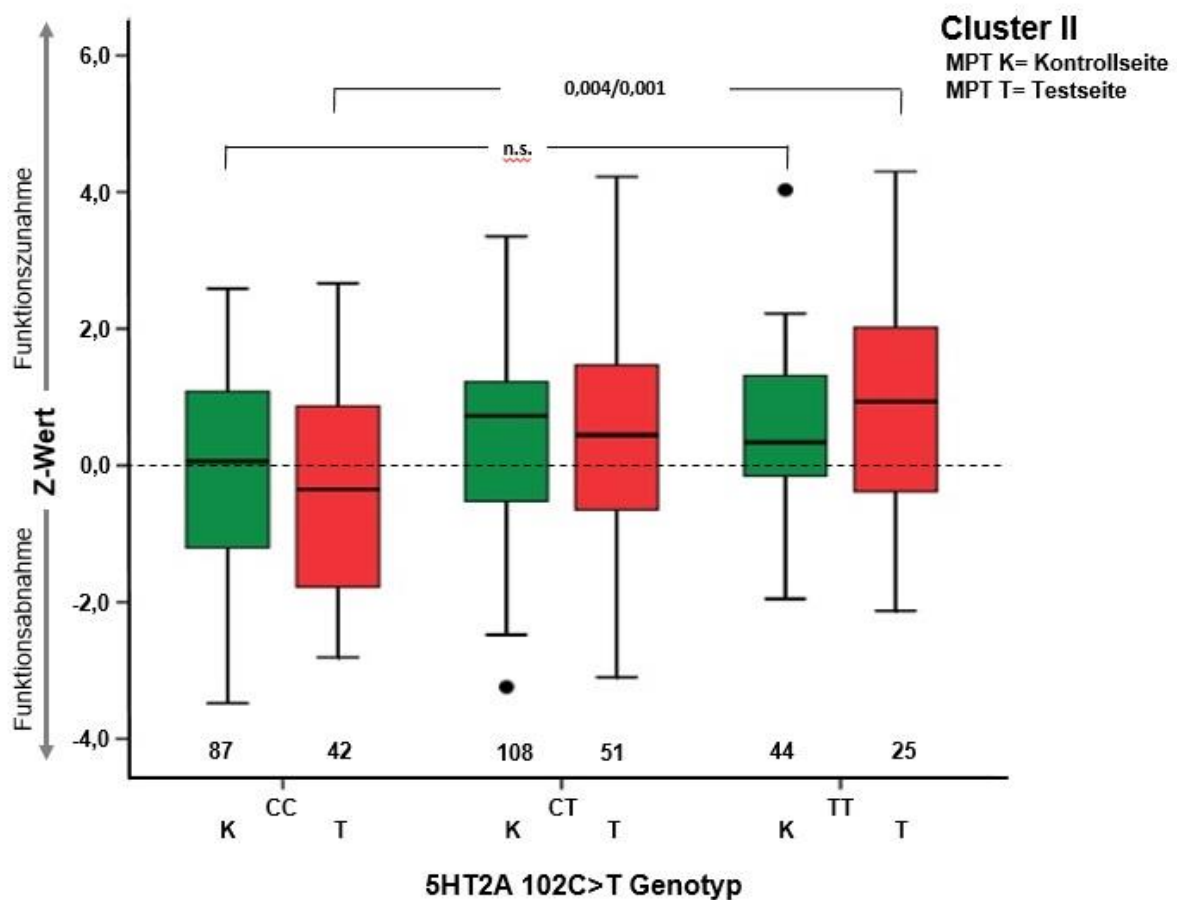


Abbildung 13: Assoziation des 5-HT-2A 102 C>T Genotyps von Cluster II Patienten mit der mechanischen Schmerzschwelle (MPT) auf der Test- und Kontrollseite

Ein signifikanter Unterschied in den Reaktionsmustern der 5-HT-2A 102C>T Genotypen von Cluster II Patienten konnte nur im vom neuropathischen Schmerz betroffenen Testareal nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test $p=0.004$, Jonckheere-Terpstra-Test $p=0.001$). Die „Kontrollseite“, die nicht vom neuropathischen Schmerz betroffen war, wies keine bedeutenden Reaktionsunterschiede zwischen den Genotypausprägungen auf.

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung des T-Allels im 5-HT2A 102C>T Polymorphismus unter neuropathischen Schmerzbedingungen wurden in einer

binären Analyse ausschließlich pathologische z-Werte (z-Wert über zwei oder unter minus zwei) für MPT bei Cluster II Patienten untersucht. Das Ergebnis verdeutlicht den Zusammenhang des T-Allels als Risikofaktor für die Entwicklung einer mechanischen Hyperästhesie. Patienten mit einer Variantenausprägung (CT+TT) demonstrierten mit einer OR von 8,31 häufiger eine mechanische Hyperästhesie als die Wildtypträger (CC). Die Verteilung von Hyper- und Hypoästhesie nach binärer Analyse bezüglich der Präsenz eines T-Allels im Genotyp oder nicht auf den kalibrierten Nadelreiz der mechanischen Schmerzschwellentestung (MPT) ist in Abbildung 14 visualisiert. In der CC-Patientengruppe liegt das Reaktionsspektrum der A δ -Faser mit über 75% im hyposensiblen Bereich während der CT/TT-Genotyp in über 70% der Fälle bei der Testung eine hypersensible Reaktion aufzeigt.

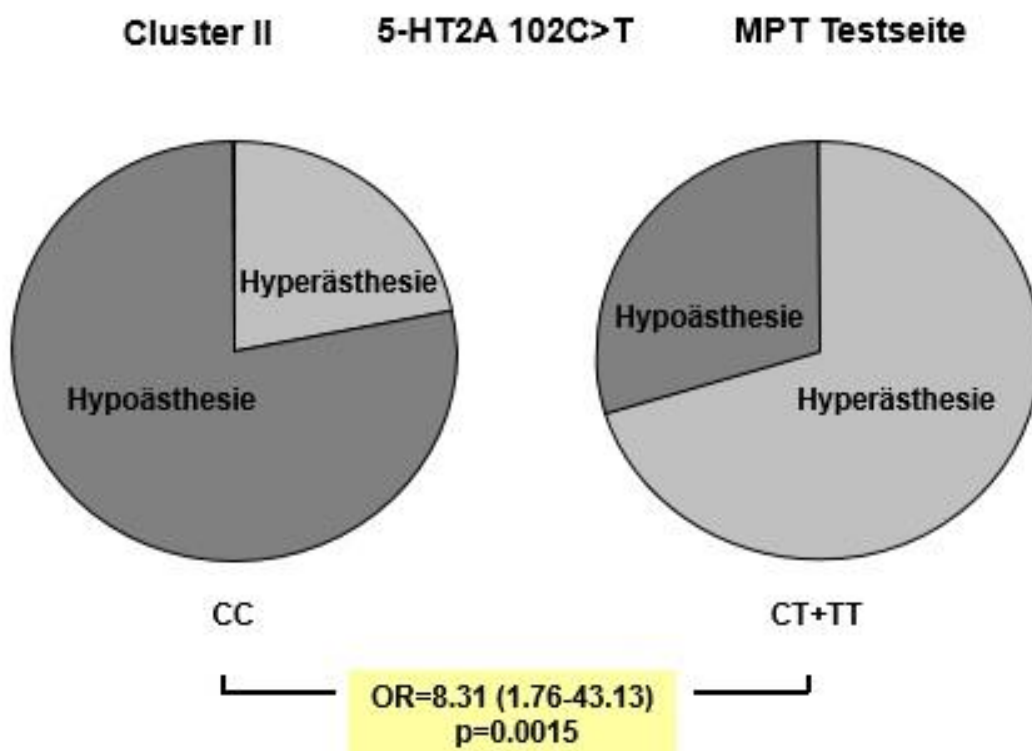


Abbildung 14: Pathologisch mechanische Schmerzreizschwelle

Die genetisch basierte Verteilung der pathologischen Reaktion auf die Schmerzschwellentestung (MPT z-Wert über zwei oder unter minus zwei) in Cluster II Patienten in Bezug auf die 102C>T 5-HT2A Variante. Die Wildtypträger neigen überwiegend zu Hypoästhesien auf Nadelreize während hetero- und homozygote T-Allelträger zu 2/3 mit Hyperästhesie reagieren (p=0,0015).

3.2.2.2 5-HT2A 102C>T und mechanische Schmerzsensitivität (MPS)

Die 102C>T Variante des 5-HT2A-Rezeptors zeigte überdies zunächst eine zweite Assoziation mit der mechanischen Schmerzsensitivität (MPS), einem weiteren Korrelat für zentrale Sensibilisierung (Abb. 15 A+B).

Patienten, die ein T-Allel in ihrem Genotyp trugen, beurteilten deutlich früher einen Nadelreiz als schmerzhaft, als Patienten ohne T-Allel ($p= 0,007$). Nur 1/5 der CT-Genotypen und 1/3 der TT-Genotypen empfand den applizierten Nadelreiz weniger schmerzhaft als gesunde Probanden. In Abbildung 15 A sind diese Ergebnisse zusammengefasst. Die Mediane der TT und CT-Allelträger liegen gut erkennbar überhalb der Nulllinie im Bereich der Nervenfasersfunktionszunahme. Der Median der heterozygoten Patienten befindet sich dabei nur minimal unterhalb des Wertes der homozygoten TT-Träger. Ein signifikanter Unterschied in der Trendanalyse bestand demnach nicht. Die Reaktionen des Wildtyps auf die MPS-Testung waren vergleichbar mit denen der MPT-Testung. 2/3 der Patienten verspürte den Reiz erst ab höheren Intensitäten als schmerzhaft als die gesunden Probanden. In Abbildung 15 A ist die Verstärkung der hypersensiblen Reaktion mit zunehmender Präsenz des T-Allels nicht so eindeutig erkennbar wie bei der MPT-Testung. Dies repräsentierte auch die Auswertung nach Bonferronikorrektur, wonach der initial signifikante Unterschied $p= 0,005$ zu den heterozygoten und $p= 0,017$ zu den homozygoten T-Allelträgern nicht mehr nachzuweisen war.

Im dominant-rezessiv Modell fiel der anfangs signifikante Unterschied der Beurteilungen zunehmend starker Nadelreize zwischen den Varianten und dem Wildtyp ebenfalls nicht so prägnant aus ($p= 0,007$) wie bei der mechanischen Schmerzschwelle und verlor sich ebenfalls nach Bonferronikorrektur.

Es konnten keine Assoziationen für dynamisch mechanische Allodynie oder die Wind-Up-Ratio gefunden werden.

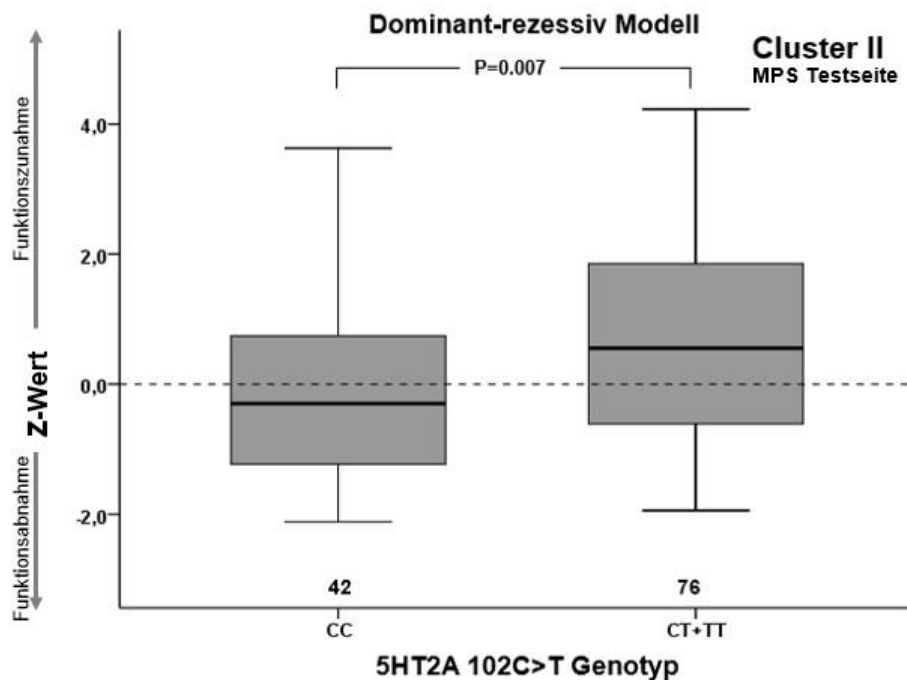
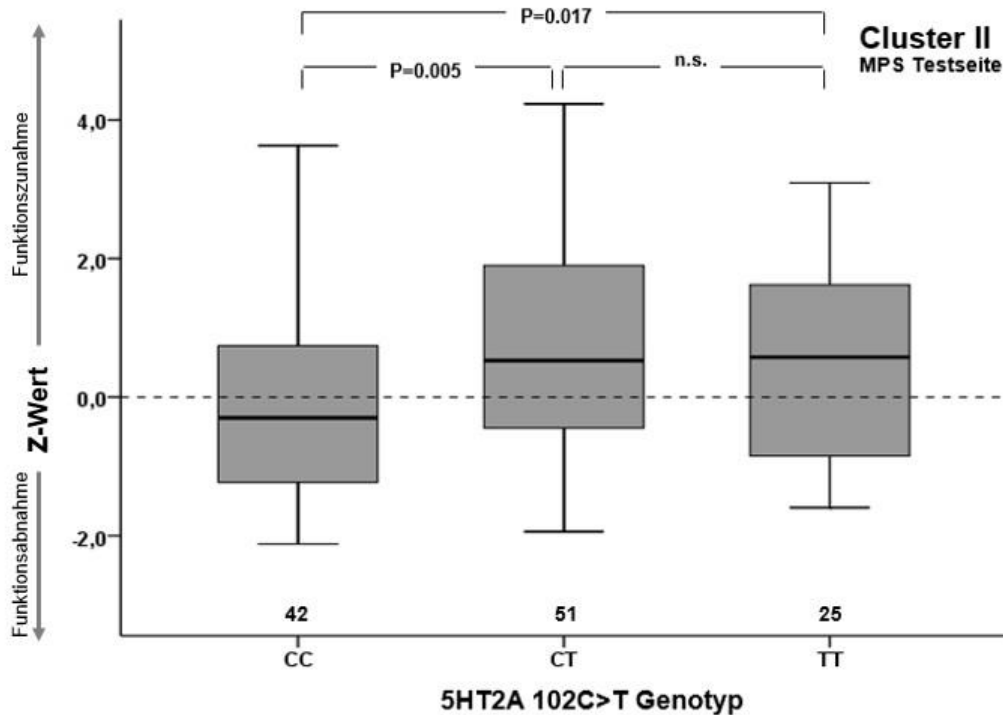


Abbildung 15 (A+B): Assoziation des 5-HT-2A 102 C>T Genotyps von Cluster II Patienten mit mechanischer Schmerzsensitivität (MPS)

A) Es wird sichtbar, dass initial eine signifikante Assoziation in der 102C>T Variante mit den unterschiedlichen Genotypen in Bezug auf die Schmerzschwelle bei der mechanischen Schmerzsensitivität (MPS) besteht und die z-Werte zunächst auch signifikant durch das Vorkommen des T-Allels beeinflusst werden.

B) Das dominant-rezessiv Modell verdeutlicht den ebenfalls eingangs signifikanten Unterschied ($p=0,007$) zwischen dem zu hyposensiblen Reaktionen neigendem Wildtyp CC und den zu hypersensiblen Reaktionen neigenden Varianten CT+TT.

4. Diskussion

Anhand der vorliegenden Studie konnte ein erster Eindruck gewonnen werden, ob die drei Rezeptorvarianten 102C>T, 452C>T und -1438A>G (1) einen Einfluss auf die Entwicklung chronisch neuropathischer Schmerzen haben und (2) das Auftreten von sensorischen Pathologien in Patienten mit neuropathischen Schmerzen beeinflussen.

4.1 Einfluss der Polymorphismen auf die Schmerzempfindung (Genotypverteilung)

Die Ergebnisse der Analyse zur genetischen Variabilität der oben aufgeführten 5-HT_{2A} Rezeptorvarianten und deren mögliche Auswirkung auf eine variierende Schmerzempfindungsschwelle bei chronisch neuropathisch bedingten Schmerzen zeigten keinen Hinweis auf einen Zusammenhang. Der Vergleich der Häufigkeitsverteilung der Allelfrequenzen sowie der Genotypfrequenzen in den drei untersuchten SNPs zwischen neuropathischen Schmerzpatienten, gesunden Kontrollprobanden und Daten der HapMap Datenbank erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Genotypverteilung der Patientienkohorte folgte wie die Genotypverteilung der Kontrollprobanden dem Hardy-Weinberg-Equilibrium.

Diese Ergebnisse decken sich mit der aktuellen Forschung, die die 5-HT_{2A} Rezeptorpolymorphismen hauptsächlich mit Krankheitsbildern aus dem Bereich der Psychiatrie wie beispielsweise Schizophrenie, psychotischen Syndromen und Alzheimer in Verbindung bringen (Serretti, Drago et al. 2007, Quednow, Kuhn et al. 2008). Eine experimentelle Studie von Bray et al. (2004) untersuchte die Funktionalität des 102C>T Polymorphismus. Sie verglichen in ihrer Studie mit Primer Extension die Allelüberginstimmung von genomischer DNA und mRNA aus mehreren kortikalen Regionen von Menschen mit einer heterozygoten Ausprägung des 5-HT_{2A} Rezeptorpolymorphismus 102C>T. Es war keine interindividuelle Variabilität der relativen mRNA Allelexpression festzustellen. Hier liegt die Vermutung nahe, dass der Polymorphismus keine Modifikationen der mRNA nach sich zieht (Bray, Buckland et al. 2004). Widersprüchlich sind dahingegen Studien, die nachweislich über funktionelle Varianten der 5-HT_{2A} Rezeptorpolymorphismen im Sinne von veränderter Promotoraktivität (-1438A>G), Destabilisierung der intrazellulären Signalkaskade (452C>T) sowie über signifikante Assoziation mit dem Auftreten von Fibromyalgie

(102C>T) berichten (Hazelwood and Sanders-Bush 2004, Parsons, D'Souza et al. 2004, Lee, Choi et al. 2012). Die Auswahl der hier untersuchten 5-HT_{2A}-Rezeptorpolymorphismen erfolgte über Hinweise aus der Literatur, die einen Einfluss der SNPs auf die Schmerzempfindung belegten. Der 452C>T SNP ist jedoch der Einzige, der eine Veränderung der Aminosäurestruktur nach sich zieht. Für den Nachweis eines genetischen Einflusses wären weitere Untersuchungen mit SNPs des Rezeptors notwendig, die eine Veränderung der Proteinstruktur bewirken. Da in dieser Studie keine Funktionalitätsprüfung der ausgewählten Polymorphismen in vivo durchgeführt wurde, bleibt dieser umstrittene Aspekt in weiteren Studien zu klären.

Die weiterführende Analyse untersuchte den genetischen Einfluss der ausgewählten Rezeptorvarianten auf die Ausprägung von Hyper- und Hypoästhesie bei neuropathischen Schmerzpatienten. Hierfür wurde die Verteilung der Genotypfrequenzen zwischen dem hypersensiblen Cluster I und dem hyposensiblen Cluster II neuropathischer Schmerzpatienten untereinander sowie zu schmerzfreien Kontrollprobanden verglichen. Es fanden sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Genotypfrequenzen.

Interessanterweise ist die Rolle von 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der Schmerzmodulation sehr umstritten. In einer Übersichtsarbeit von Millan (2002) beispielsweise spielten sie im Zusammenhang mit den Rezeptorfamilien 5-HT₃ und 4 durch ihren exzitatorischen Charakter eine Schlüsselrolle in der Modulation von Schmerzempfindungen auf peripherer und zentraler Ebene. Abbildung 16 ist eine Zusammenfassung aus verschiedenen Quellen über den bisherigen Kenntnisstand über Lokalisation und Rolle des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Schmerzverarbeitungssystem. Dieser erstreckt sich von der Peripherie bis ins Großhirn und wirkt maßgeblich pronozizeptiv.

Zweifellos ist die Schmerzempfindung, vor allem in chronischem Zustand, eine sehr schwierig zu messende Eigenschaft, da sie über viele miteinander verzahnte Schaltkreise entsteht und reguliert wird. Es präsentieren sich vielseitige klinische Schmerzsymptome und -zeichen, die aus einem Zusammenspiel an zentralen und peripheren Nervensystemdynamiken, der Stressanpassungsfähigkeit des gesamten Systems und dem Entzündungszustand des Organismus zusammengesetzt werden. Da Schmerz ein komplexes Merkmal darstellt, wäre eine polygene Natur der Schmerzempfindung zu erwarten (Diatchenko, Nackley et al. 2007). Das bedeutet, dass die Untersuchung einzelner Loci in Genen ohne Bezug zum restlichen System

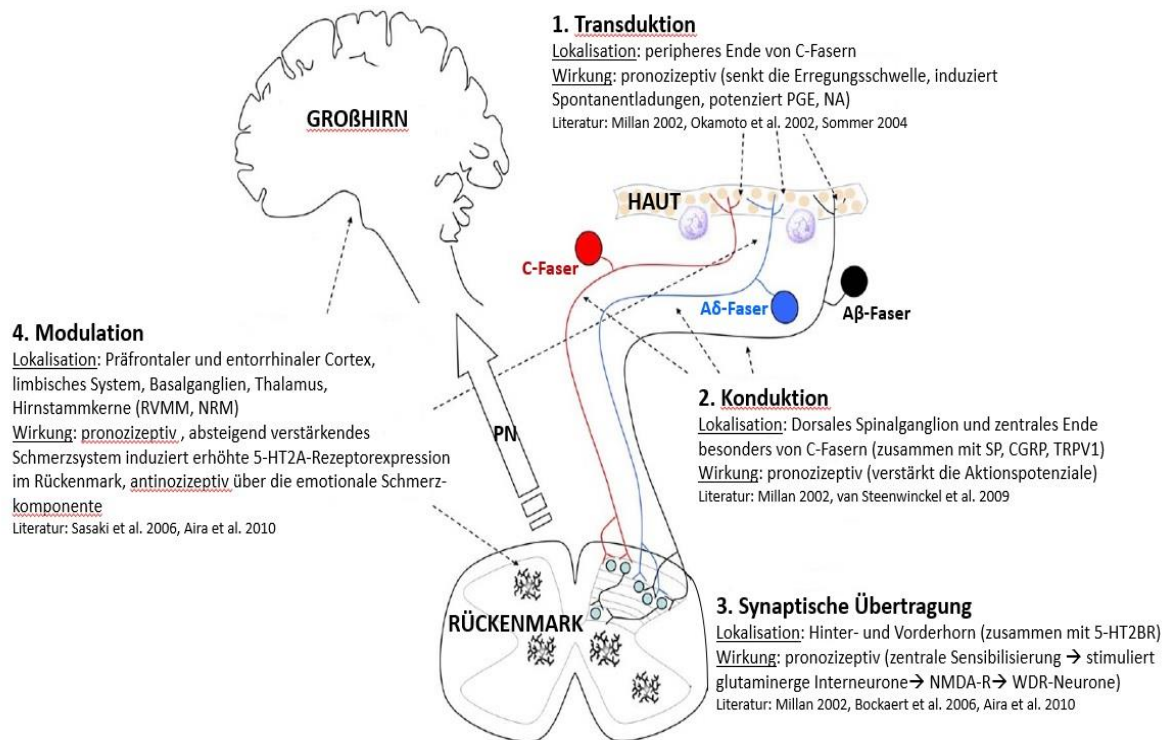


Abbildung 16: Lokalisation und Wirkung des 5-HT2A-Rezeptors im menschlichen Schmerzverarbeitungssystem

Schmerzhafte Reize werden von den peripheren Afferenzen, die Haut, Muskeln und Viszera innervieren, wahrgenommen. Die Zellkörper dieser Nerven (Nozizeptoren) sitzen in den Spinalganglien, mit Ausnahme der Zellkörper des craniofasialen Gewebes, die in den trigeminalen Ganglien lokalisiert sind. Der schmerzhafte Reiz gelangt über eine Verschaltung im Rückenmark über projizierende Neurone (PN) ins Großhirn. Die Lokalisation der 5-HT2A-Rezeptoren ist weit im schmerzleitenden Nervensystem gestreut:

1. Sie sind in der Peripherie, vor allem auf C-Fasern zusammen mit Rezeptoren zu finden, die für die Umwandlung von schmerzhaften Reizen in elektrische Impulse verantwortlich sind, wie z.B. TRP-Kanäle.

2. Im Spinalganglion der übertragenden Nervenfasern sitzen weitere 5-HT2A-Rezeptoren, die zusammen mit der Substanz P (SP) und dem Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP) das ausgelöste Aktionspotenzial verstärken.

3. Im Hinterhorn sitzen die 5-HT2A-Rezeptoren und aktivieren stumme glutaminerge (erregende) Interneurone. Die Aktivierung erfolgt verstärkt, bei einem Überhang an absteigenden schmerzverstärkenden Einflüssen aus dem Hirnstamm, die wiederum die Expression der 5-HT2A-mRNA im Hinterhorn erhöht.

4. Die absteigenden Nervenbahnen aus dem Hirnstamm besitzen einen dualen Charakter in der Modulation der Schmerzempfindung. Sie können die Schmerzweiterleitung auf der Rückenmarksebene entweder hemmen über endogene Opioid-, Noradrenalin oder Serotoninausschüttungen oder sie können sie verstärken. Hier werden auch Einflüsse von absteigenden serotoninergen Nervenbahnen vermutet. Im Gehirn werden die Schmerzreize von einer Schmerzmatrix, die aus mehreren Gehirnarealen besteht, analysiert und aus einer sensorisch-diskriminativen und einer emotionalen Schmerzkomponente zusammengesetzt ist. 5-HT2A-Rezeptoren im präfrontalen und entorrhinalen Cortex, dem limbischen System, den Basalganglien, dem Thalamus und den Hirnstammkernen wirken pronozizeptiv über das absteigend verstärkende Schmerzsystem und antinozizeptiv über die positive Beeinflussung der emotionalen Schmerzempfindung.

[Abbildung modifiziert in Anlehnung an Foulkes und Wood 2008: Genes Involved in Pain Perception and Modulation]

und Untersuchungen der Auswirkungen auf die Zelleigenschaften im Grunde genommen keine repräsentative Analyse dieses komplexen Geschehens sein kann. Dementsprechend wäre es aufschlussreich die Interaktionen und gegenseitige Regulation mehrerer Gene sowie deren Epigenetik zu untersuchen, die zu veränderter Expression von Molekülen und Rezeptoren an einzelnen Schaltstellen der Schmerzbahn unter den verschiedensten Schmerzbedingungen führen (Raju, Englander et al. 2014).

Die für diese Studie ausgewählten Varianten im 5-HT_{2A}-Rezeptorgen mögen in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf die Entwicklung chronischer Schmerzen bei neuropathischen Schmerzpatienten haben, gleichwohl ist die erhöhte Expression der 5-HT_{2A} Rezeptoren im Spinalganglion und Kortex nach einer Nervenläsion ein Ausdruck von einem veränderten Aktivitätszustand des Gens, der abhängig von Lokalisation, regulierenden Faktoren und gegebenenfalls auch abhängig von bisher nicht untersuchten SNPs sein kann (Myers, Airey et al. 2007, Supornsilpchai, le Grand et al. 2010). Ferner kann bei der Regulation von Schmerz und Analgesie das Geschlecht eine erhebliche Rolle spielen. Forscher fanden heraus, dass die Genotypkonstellation nicht unbedingt ausschlaggebend für einen unterschiedlichen Schmerzphänotyp sein muss, sondern dass die Merkmalsvariabilität der Gene mit dem Geschlecht assoziiert sein kann. Diese Geschlechtsunterschiede werden noch kontrovers diskutiert, jedoch wiesen mehrere Studien nach, dass Männer eine erhöhte Schmerzschwelle, Toleranz und analgetische Sensibilität aufweisen (Mogil 1999, Rolke, Baron et al. 2006, Aoki, Hayashida et al. 2010).

Obwohl die Analyse des menschlichen Genoms viele neue Erkenntnisse in der Schmerzforschung mit sich gebracht hat, sollte man dennoch den möglichen Einfluss von Umweltfaktoren auf die Schmerzvariabilität in Schmerzpathologien nicht außer Acht lassen (Mogil 1999, Foulkes and Wood 2008).

Ähnlich wie die Komplexität des Schmerzes, die für Wissenschaftler und Forscher bisher nicht bis ins kleinste Detail erklärbar ist, ist auch die Wirkweise von Serotonin im menschlichen Organismus in vielerlei Hinsicht unklar. Dass Serotonin eine Rolle in der Schmerzweiterleitung und -verarbeitung unter anderem über den 5-HT_{2A} Rezeptor spielt, haben diverse Publikationen gezeigt (Okamoto, Imbe et al. 2002, Van Steenwinckel, Noghero et al. 2009, Rahman, Bannister et al. 2011). Dennoch liegen

auf dem Weg zwischen mikro- und makrobiologischen Vorgängen sowie den möglichen korrelierenden klinischen Zeichen einige Unbekannte.

Zusammengefasst kann man sagen, dass kein direkter Einfluss der 5-HT_{2A}-Rezeptorvarianten auf die allgemeine Schmerzempfindung und –chronifizierung neuropathischer Schmerzen besteht. Es existieren aber durchaus pathologische Umstände, die zu einer erhöhten Expression des pronozizeptiven 5-HT_{2A}-Rezeptorgens führen und indirekt zu erhöhter Schmerzempfindung bei neuropathischen Schmerzpatienten beitragen können.

4.2 Einfluss der Polymorphismen auf den Schmerzphänotyp

Die Frage, ob 5-HT_{2A}-Rezeptorvarianten Einfluss auf die Ausprägung pathologisch somatosensorischer Symptome bei neuropathischen Schmerzpatienten haben sowie Zeichen und Symptome der zentralen Sensibilisierung begünstigen, ließ sich durch die vorliegenden Studiendaten bestätigen.

Bei der Untersuchung der Genotypverteilung der Polymorphismen in der Patientenkohorte in Assoziation mit den 13 QST-Parametern konnte eine statistisch relevante Erhebung zwischen der 102 C>T Variante des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens und dem QST-Parameter für mechanische Schmerzreizschwelle (MPT) festgestellt werden. Demzufolge reagierten Patienten, die ein variantes Allel trugen, in der MPT-Testungsreihe früher auf den in der Schmerzreiztestreihe gesetzten Nadelstich als der Wildtyp. Bemerkenswert waren ähnliche Effekte, die für die mechanische Schmerzsensitivität (MPS) beobachtet werden konnten. Diese verloren jedoch nach multipler Testung ihre Signifikanz.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit einer Studie von Bardin et al. (1997), der schon damals intrathekal appliziertes Serotonin mit einer erhöhte Empfindlichkeit auf mechanische Reize nicht jedoch auf thermische Reize in Verbindung bringen konnte.

4.2.1 Die Bedeutung der getesteten Seite

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse nur auf der vom neuropathischen Schmerz betroffenen Seite eine klare Zunahme der Nervenfaseraktivität auf Nadelreize in

Abhängigkeit des Genotyps, während die gesunde Kontrollseite dieses Phänomen nicht aufwies. Diese Feststellung deckt sich zum einen mit unserem Ergebnis, dass die allgemeine Schmerzanfälligkeit nicht durch eine bestimmte Genotypausprägung in den SNPs des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens beeinflusst ist. Zum anderen kann man die Bedeutung des Rezeptors unter den pathologischen Bedingungen einer Nervenbeschädigung in Bezug auf die mechanische Sensibilität erkennen.

Dies korrespondiert mit der tierexperimentellen Studie von van Steenwinckel et al. (2008), die an Mausstämmen die Hochregulierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren in chronischen neuropathischen Schmerzzuständen peripher sowie zentral, besonders im Hinterhorn des Rückenmarks, nachwies. Unter physiologischen Umständen waren die Rezeptoren nur wenig bis moderat membranständig im Rückenmark vertreten. Die verstärkte Expression der 5-HT_{2A}-Rezeptoren wird als ein Mechanismus der peripheren und zentralen Sensibilisierung bei pathologischen Schmerzen gedeutet.

Genau wie die erhöhte Expression von 5-HT_{2A}-Rezeptoren wird das Auftreten einer Nadelreizhyperalgesie Studien zufolge mit dem Prozess der zentralen Sensibilisierung bei chronischen neuropathischen Schmerzpatienten in Verbindung gebracht (Rolke 2009). In dieser Studie verkörperte der Test, der den QST-Parameter MPT ermittelte einen möglichen Nachweis für Nadelreizhyperalgesie, die über die Funktion von A δ -Fasern sowie von C-Fasern bemessen wurde.

Ein besonderes Kennzeichen der zentralen Sensibilisierung sind ein tiefgreifender funktioneller Wechsel im somatosensorischen System von hochschwelliger nozizeptiven Reizen zu niedrighschwelliger Schmerzempfindung. Dies geschieht über veränderte Eigenschaften der Nerven im Hinterhorn wie die Erhöhung der Membranerregbarkeit von nozizeptiven und multizeptiven Hinterhornneuronen, erhöhter synaptischer Wirksamkeit, reduzierter Hemmung sowie Konversion von nozizeptor spezifischen Neuronen zu Wide-dynamic-range-Neuronen. Wide-dynamic-range Neurone sind charakterisiert durch Erweiterung des nervlichen Inputs durch harmlose und nozizeptive Reize sowie Erweiterung ihres räumlichen Inputs. Dies kann dazu führen, dass periphere taktile Reize auch über nicht-schmerzassoziierte A δ - und A β -Mechanorezeptoren im Stande sind, die im Hinterhorn projizierenden Nerven der Schmerzbahn zu aktivieren. Eine Stimulation mittels leicht mechanischer Reize auf der Haut kann so schnell zu schmerzhaften Signalen konvertieren. Begriffe, die einen solchen Prozess beschreiben sind Nadelreizhyperalgesie und mechanisch

dynamische Allodynie. In dieser Studie konnte eine pathologisch verstärkte Nadelreizhyperalgesie anhand der auffälligen Assoziation der 102C>T Variante mit dem MPT-Parameter bei den neuropathischen Schmerzpatienten nachgewiesen werden, die dynamisch mechanische Allodynie hingegen blieb ohne signifikante Assoziationen.

Die Mechanismen der zentralen Sensibilisierung sind komplex und vielseitig. Während eine von peripher erhöhte Stimulationsfrequenz und -amplitude plastische und morphologische Veränderungen im Rückenmark verursachen können, gibt es zunehmend Evidenz, dass eine duale Modulation der Schmerzverarbeitung auf das Nervengeflecht im Hinterhorn von zentralen aminergen Nervenprojektionen aus Hirnstammkernen einwirkt (Millan 2002). Es gibt sogar Hinweise aus Tiermodellen, dass vor allem absteigende Projektionen aus der rostroventralen Medulla einen Einfluss auf die pathologische Schmerzverarbeitung ausüben (Ossipov, Dussor et al. 2010). Unter physiologischen Voraussetzungen befindet sich die Funktion der absteigenden Hemmung und die der absteigenden Verstärkung von Schmerzsignalen im Gleichgewicht. Allerdings haben Forscher in Tiermodellen mit chronisch neuropathischen Schmerzen nachweisen können, dass es unter pathologischen Schmerzbedingungen zu einer tonische Aktivierung der absteigenden schmerzverstärkenden Nervenbahn kommt und dies zu einem Ungleichgewicht und einer zusätzlichen Hemmung der schmerzhemmenden Nervenbahn führt. Das Überwiegen der verstärkten Weiterleitung von Schmerzreizen kann ebenfalls als ein Mechanismus der zentralen Sensibilisierung angesehen werden (Ossipov, Lai et al. 2000, Vanegas and Schaible 2004, Aira, Buesa et al. 2012).

Der 5-HT_{2A}-Serotoninrezeptor wird schon seit langem als wichtiger Mediator der neuronalen Hyperexzitabilität angesehen. In Bezug auf die Schmerzempfindung wird er dem pronozizeptiven System zugeordnet. Aira et al. (2010) stellte in ihrer Studie über die Funktion von 5-HT_{1A}, B, 2A, B, C, 3 und 4 Rezeptoren bei der Übertragung von schmerzhaften Reizen in Ratten mit spinaler Nervenläsion eine signifikante Hochregulation und pronozizeptiven Einfluss von 5-HT_{2A} und B-Rezeptoren als bedeutende Effektoren des absteigenden serotoninergen Systems fest. Die Daten beschreiben eine Förderung der spinalen Hyperexzitabilität unter den pathologischen Bedingungen der Nervenläsion über die Verstärkung spinaler Feldpotenziale, die aus C-Faser-Aktivierungen nach Nervenligation resultieren. Darüber hinaus wird zudem

eine mögliche Beeinträchtigung von spinalen μ -Opioid-Mechanismen diskutiert. Entscheidend in der Studie war die Feststellung, dass diese Veränderungen ohne eine Nervenläsion nicht nachweisbar waren.

Es existieren wenige Informationen über den konkreten Prozess der pronozizeptiven Wirkung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren. In der Untersuchung von Aira et. al (2012) an Ratten mit einer spinalen Nervenligation wurden dorsale Hinterhornpotenziale mit Mikroelektroden unter Rezeptoragonisteinflüssen von 5-HT_{2A}-Rezeptoren und mGlu-Rezeptoren gemessen. Es konnten zwei eminente Ergebnisse dargestellt werden. (1) Die erhöhte 5-HT_{2A}-Rezeptorexpression nach spinaler Nervenläsion wird in den Zusammenhang mit mGluR1 Plastizität gebracht, das heißt es fördert die vermehrte Expression von mGluR1 an der postsynaptischen Verdichtung von Hinterhornneuronen und (2) das Zusammenspiel der beiden Rezeptoren nach spinaler Nervenläsion begünstigt die 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelte spinale Übererregbarkeit und Schmerzentscheidung.

Schon früh wurde die Bedeutung einer Aktivierung stiller glutaminerger erregender Synapsen des Hinterhorns im Rückenmark für die spinale Übererregbarkeit festgestellt (Li and Zhuo 1998). Die aktivitätsabhängige Plastizität von Glutamatrezeptoren und ihr erregender Charakter im Hinterhorn ist mittlerweile ein weiterer allgemein anerkannter Mechanismus der zentralen Sensibilisierung. Die erhöhte Aktivität der Glutamatrezeptoren führt zu verstärkter und verlängerter Erregung der Hinterhornneurone und ist so in der Lage einen Wechsel von akutem zu chronischem Schmerz zu induzieren und erhalten (Azkue, Liu et al. 2003, Latremoliere and Woolf 2009). Die enge Verknüpfung von Serotonin und Glutamatrezeptoren ist mehrfach in der Literatur beschrieben. Ferner konstatieren mehrere Experimente, dass die 5-HT_{2A} Rezeptoren auf denselben Dendriten und postsynaptischen Verdichtungen im Hinterhorn wie nozizeptor-assoziierte metabotrope Glutamatrezeptoren lokalisiert wurden (Zhang, Gao et al. 2001, Van Steenwinckel, Brisorgueil et al. 2008, Wei, Dubner et al. 2010).

In Zusammenschau dieser Studien wird der mögliche Einfluss des 5-HT_{2A}-Rezeptors, der unter den pathologischen Bedingungen einer Nervenläsion im Rückenmark, besonders im Hinterhorn, vermehrt exprimiert wird, auf eine Rekrutierung stiller glutaminerger Synapsen im Hinterhorn und dadurch auch auf die zentrale Sensibilisierung bei neuropathischen Schmerzpatienten deutlich.

4.2.2 Die Bedeutung der Clusteranalyse

Der signifikante Unterschied der genotypabhängigen Reaktionsweise in Assoziation mit dem QST-Parameter MPT konnte in dieser Studie ausschließlich bei Cluster II Patienten nachgewiesen werden. Dies bekräftigt die Annahme, dass die Varianten des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens in den Prozess der zentralen Sensibilisierung involviert sind.

Die Clusteranalyse resultierte in der Bildung zweier Cluster: (i) Cluster I Patienten mit der Neigung zu Hyperästhesie auf die standardisierten Stimuli, das heißt in den QST-Testergebnissen dominierende Z-Werte über Null und (ii) Cluster II Patienten mit der Neigung zu Hypästhesie auf die standardisierten Stimuli, das heißt dominierende Z-Werte der QST-Ergebnisse unter Null. Zeichen und Symptome der Hyperästhesie bedürfen zur Empfindung ein intaktes peripher afferentes Nervensystem und erhaltene somatosensorische Nervenfunktionen. Dieses ist bei peripherer Verletzung oder Entzündung vermehrt anfällig für peripher sensibilisierende Faktoren. Im Gegensatz dazu sind Zeichen und Symptome der Hypästhesie mit einer überwiegend peripheren Nervendegeneration im getesteten Areal vergesellschaftet und dementsprechend bei Schmerzpersistenz anfälliger für zentral sensibilisierende Prozesse (Rolke 2009, Maier, Baron et al. 2010, Binder, May et al. 2011).

Eine gezielte Analyse der beiden Clustersubgruppen (s. Tab. 18) im mechanischen Reaktionsbereich der QST aus Binder et al. (2011) verdeutlichte die Differenzen zwischen Funktionszu- und abnahme der vom neuropathischen Schmerz betroffenen Nervenfasern bei Applikation der Tests für mechanische Schmerzschwellen (MPT), mechanische Schmerzsensitivität (MPS), dynamisch mechanische Allodynie (DMA) und das Wind-Up-Verhältnis (WUR). Wie in der Definition der Cluster demonstrierten Cluster I Patienten prozentual deutlich häufiger eine detektierbare Antwort auf unterschwellige Reize im Sinne einer Nervenfunktionszunahme, während Cluster II Patienten, gekennzeichnet durch eher abgeschwächte Reaktionen auf die applizierten Reize, zum Funktionsverlust der betroffenen Nervenfasern tendierten. Die Unterschiede waren deutlich signifikant bei dem mechanischen QST-Parameter MPT ($p=0.017$) und MPS ($p=0.006$) wo über $\frac{3}{4}$ der Patienten in Cluster I eine Nervenfunktionszunahme erkennen ließen, während in Cluster II jeweils nur die Hälfte der Patienten eine Funktionszunahme, der Rest eine Funktionsabnahme aufwies. Die dynamisch mechanische Allodynie (DMA) kennzeichnete sich durch grenzwertig signifikante Unterschiede in der Zu- oder Abnahme der Nervenfasernfunktion ($p=0.045$) aus,

wohingegen die Wind-up Ratio (WUR) keine signifikante Unterschiede im Reaktionsmuster zwischen den beiden Clustern offenbarte.

Tabelle 18: Vergleich der Häufigkeit pathologischer mechanischer QST-Werte (%) zwischen Cluster I zu Cluster II

QST-Wert	Cluster I		Cluster II		p-Wert
	Funktionszunahme	Funktionsverlust	Funktionszunahme	Funktionsverlust	
MPT	74.5	25.5	51.1	48.9	0.017
MPS	81.3	18.8	56.5	43.5	0.006
WUR	94.7	5.3	87.5	12.5	n.s.
DMA	19.8	80.2	31.1	68.9	0.045

MPT= Schwellenwert für mechanische Nadelberührung (A δ -Fasern); MPS= Schwellenwert für überschwellige Nadelreizberührung (A δ -Fasern); WUR= Zeitliche Summation kalibrierter Nadelreize (A δ -Fasern); DMA= Schwellenwert für schmerzhafte streichende Berührung mittels Wattebausch, Q-Tip und Pinsel (A β -Fasern). Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests berechnet. In Anlehnung an Binder et al. 2011

Da die zentrale Sensibilisierung des Hinterhorns einerseits durch die Hyperaktivität peripherer Nozizeptoren und andererseits über die regulierenden Effekte der absteigenden aminergen Nervenbahnen beeinflusst wird, ist die Cluster II Kohorte für die Untersuchung der Hypothese eines Einflusses der 5-HT_{2A}-Varianten auf die zentrale Sensibilisierung von Vorteil, da der Einfluss der peripheren Aktivität in diesen Patienten deutlich vermindert ist. Dementsprechend ist die Behauptung möglich, dass ein signifikanter Einfluss der 5-HT_{2A}-Varianten auf die zentrale Sensibilisierung in Cluster II Patienten aufgrund ihrer Eigenschaften dargestellt werden kann. Entsprechend dieser Voraussetzungen spricht die signifikante Assoziation zwischen der mechanischen Hyperalgesie und Varianten des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens ausschließlich in Cluster II Patienten für die These, dass 5-HT_{2A} Rezeptorvarianten einen Einfluss auf den Prozess der zentralen Sensibilisierung unter neuropathischen Schmerzbedingungen haben.

4.2.3 Die Bedeutung der Genotypen

Bei der Testung des QST-Parameters MPT mittels kalibrierter Nadelreize stellte sich eine klare Verteilung der Genotypen des 102C>T SNPs im Z-Wert basierten QST-Profil dar. Die Werte der Wildtypen lagen größtenteils unter null, was eine geringere

Weiterleitung der applizierten Stimuli über A δ -Fasern bedeutet. Im Gegensatz dazu lagen die Z-Werte der Varianten vermehrt über null, was für eine verstärkte Weiterleitung der applizierten Stimuli über A δ -Fasern sprach. Daraus lässt sich schließen, dass das Vorkommen eines T-Allels im Genotyp der 102 C>T Variante signifikant häufiger mit einer pathologisch verminderte Schmerzreizschwelle auf den getesteten Nadelreiz vergesellschaftet war als mit dem 102C homozygoten Wildtyp.

In der dichotomisierten Verteilung von Cluster II Patienten bezüglich der genotypabhängigen Nervenfunktionszu- oder abnahme bei der Testung auf die Nadelreizhyperalgesie zeigte sich das hyper- und hypoalgetische Reaktionsverhalten noch deutlicher. Die Gruppe der homozygoten C-Allelträger reagierte zu 75% hyposensibel auf den applizierten Nadelreiz im Gegensatz zu der hetero- und homozygoten T-Allelträgergruppe, die zu fast 75% hypersensibel reagierten. In Zusammenschau lassen diese Effekte vermuten, dass das T-Allel einen pronozizeptiven Charakter hat.

Die pronozizeptive Wirkung des T-Allels wurden ebenfalls in der Studie von Aoki et al. (2010) observiert. Hier stellte sich bezüglich der 102T Variante des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens ein erhöhter postoperativer Schmerzmedikamentenbedarf nach großen Abdominaleingriffen dar. Diese Ergebnisse waren jedoch geschlechtsspezifisch. Während Frauen mit dem T/T-Genotyp einen signifikant erhöhten Bedarf an postoperativer Schmerzmedikation aufwiesen, zeigte sich diese Signifikanz bei den Männern mit derselben Variantenausprägung nicht.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die T-Allelträger homo- sowie heterozygot der Cluster II Patienten eine veränderte Schmerzverarbeitung in Bezug auf Nadelreize haben, wenn sie von neuropathischen Schmerzen betroffen sind. Dies kann mit einer zunehmenden Expression von 5-HT_{2A}-Rezeptoren nach peripherer Nervenläsion einhergehen. Ferner könnten die 102T Varianten eine verstärkte Rekrutierung von pronozizeptiven metabotropen Glutamatrezeptoren bewirken. Die dritte Möglichkeit wäre eine vermehrte Hemmung und Beeinflussung der absteigenden hemmenden μ -Opioid-Nervenbahnen.

So ist das Vorkommen eines „T“-Allels in der Genotypausprägung des 102C>T Einzelstrangpolymorphismus im 5-HT_{2A} Rezeptorgen ein möglicher Risikofaktor für

die Ausprägung von mechanischer Nadelreizhyperalgesie und zentraler Sensibilisierung bei neuropathischen Schmerzpatienten.

4.3 Beschränkungen dieser Studie

Es bestehen einige Einschränkungen in Bezug auf die Durchführung und Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit.

Erstens sind die Kontrollprobanden durchschnittlich circa 30 Jahre jünger als die Schmerzpatienten. Das Alter hat nachweislich einen Einfluss auf die Schmerzempfindung. Daher sollte in weiteren Studien auf eine ähnliche Altersspanne geachtet werden.

Zweitens ist die Taq-Polymerase bei der Polymerisierung der gesuchten DNA-Abschnitte fehleranfällig, da das Enzym keine proof-reading-Funktion enthält. Es kann durch ungenaues Kopieren zu Mutationen in der kopierten Nukleotidabfolge kommen. Bei einer Wiederholung des Experimentes besteht die Möglichkeit der Verwendung von Pfu- oder Pfx-Polymerasen, die auch aus thermophilen Mikroorganismen stammen und sequenz-exakter arbeiten. Deren Einsatz ist jedoch kostenintensiver.

Drittens wurde die Schmerzmedikation der beteiligten Patienten nicht in der QST-Testung berücksichtigt. Die Einnahme von Serotoninwiederaufnahmehemmern sowie Morphine könnten sich auf die Mechanismen der absteigenden Schmerzverstärkung sowie der μ -Opioid-Mechanismen auswirken und die signifikanten Ergebnisse der mechanischen Schmerzschwelle beeinflusst haben. Im Gegenzug könnten sie auch weitere Auffälligkeiten im mechanischen Schmerzbereich verdeckt haben.

Viertens wurde die Phänotypisierung mittels QST nur an der Patientenkohorte durchgeführt, nicht jedoch an den Kontrollprobanden. Obwohl in der QST-Prozedur ein Vergleich zwischen der vom neuropathischen Schmerz betroffenen Testseite und der im Vergleich dazu relativ gesunden Kontrollseite stattfand, war der Vergleich der Variabilität in der Schmerzempfindung von komplett gesunden Probanden nicht möglich. Dies erfolgte annäherungsweise über die z-Wert-Verrechnung (s. 2.6 Statistik).

Fünftens sollten funktionelle Proteinexperimente in vivo oder in vitro durchgeführt werden, um den Effekt der untersuchten SNPs direkter messen zu können und die

gefundene Assoziation mit der mechanischen Schmerzschwelle weiter bestätigen zu können. Weitere Fragen, die aus der Proteinsynthese geklärt werden könnten wären epigenetische Mechanismen, phänotypische Plastizität und die phänotypische Kanalisierung.

Sechstens wäre eine Haplotypenanalyse mit Untersuchung des Linkage Equilibriums von klareren Aussagen in Bezug auf die polygene Natur des Schmerzes gewesen.

Und zuletzt hätten größere Fallzahlen deutlichere Ergebnisse bezüglich der Verteilung der Genotypen in den Bereichen der Nervenfunktionsverstärkung oder –verminderung geben können.

4.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie kann zu einem besseren Verständnis der Rolle von 5-HT_{2A}-Rezeptorpolymorphismen auf neuropathische Schmerzen, insbesondere in Bezug auf die Ausprägung von Nadelreizhyperalgesie, führen.

An Cluster II Patienten konnte der Einfluss die 102 C>T Variante des 5-HT_{2A}-Rezeptors auf Nadelreizhyperalgesie, einem Charakteristikum zentraler Sensibilisierungsprozesse, nachgewiesen werden.

Die bedeutende Rolle von 5-HT_{2A}-Rezeptorpolymorphismen bei der Entstehung von Nadelreizhyperalgesie kann in Zukunft Ansatzpunkt für eine spezifische Therapie, z.B. mit zentralgängigen 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten, sein.

Weitere Studien sind jedoch notwendig um die regulativen Mechanismen der 5-HT_{2A}-Rezeptorinteraktionen im spinalen Hinterhorn besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von 5-HT_{2A}-Rezeptorpolymorphismen 102C>T, 452C>T und -1438A>G auf die Schmerzempfindung bei neuropathischen Schmerzpatienten untersucht. Zentrale Fragestellungen der Studie waren, ob Varianten der SNPs einen Einfluss auf die allgemeine Schmerzanfälligkeit von Menschen haben und ob die Polymorphismen eine Auswirkung auf die Präsentation der verschiedenen Schmerzsymptome und –zeichen von neuropathischen Schmerzen gemessen anhand von 13 QST-Parametern haben. In vielen tierexperimentellen Studien über chronisch neuropathische Schmerzmodelle war zuvor eine pronozizeptive Wirkung der 5-HT_{2A}-Rezeptoren belegt worden [Millan 2002, van Steenwinckel et al. 2008]. Ferner belegten klinische Studien die Korrelation von 102T-Varianten des 5-HT_{2A}-Rezeptorgens mit einer gesteigerten Schmerzempfindung [Buskila et al. 2007, Aoki et al. 2010]. Da 5-HT_{2A}-Rezeptoren die spinale Hyperexzitabilität und zentrale Sensibilisierung beeinflussen, wurde zudem der Einfluss der 5-HT_{2A}-Varianten bei Patienten mit eingeschränkter peripherer Nervenfunktion (Cluster II Patienten) getestet, um eine Verdeutlichung der Rolle des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Prozess der zentralen Sensibilisierung zu demonstrieren. Ein allgemeiner Einfluss der 5-HT_{2A}-Varianten auf die Schmerzanfälligkeit konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings zeigten hetero- und homozygote 102T-Varianten bei Cluster II Patienten im Vergleich zu 102C-Genotypen eine Neigung zu mechanischer Überempfindlichkeit. Dies kann möglicherweise durch eine noch stärkere Expression von 5-HT_{2A}-Rezeptoren nach einer Nervenläsion, verstärkte Aktivierung durch Bildung stabilerer Heterodimere mit metabotropen Glutamatrezeptoren oder durch stärkere Hemmung der absteigenden hemmenden Nervenbahn aus dem Hirnnervenkernen bedingt sein. All diese Ergebnisse konnten deutlich zur Aufklärung der Rolle des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Prozess der zentralen Sensibilisierung und Entwicklung mechanischer Hyperalgesie bei chronischen Schmerzpatienten beitragen. Die fundamentale Charakterisierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der Entstehung und Modulation von mechanischer Hyperalgesie und zentraler Sensibilisierung kann einen vielversprechenden Ansatzpunkt für weitere Forschung bezüglich neuer pharmakotherapeutischer Ansätze in Form von spezifischen 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten oder spezifischer siRNA-Moleküle sein. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die genauen Mechanismen des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Prozess

der mechanischen Hyperalgesie und zentralen Sensibilisierung nach peripherer Nervenläsion besser zu begreifen.

6. Literaturverzeichnis

Ahmadian, A., M. Ehn and S. Hober (2006). "Pyrosequencing: history, biochemistry and future." Clin Chim Acta **363**(1-2): 83-94.

Aira, Z., I. Buesa, M. Gallego, G. Garcia del Cano, N. Mendiabale, J. Mingo, D. Rada, J. Bilbao, M. Zimmermann and J. J. Azkue (2012). "Time-dependent cross talk between spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor and mGluR1 subserves spinal hyperexcitability and neuropathic pain after nerve injury." J Neurosci **32**(39): 13568-13581.

Aira, Z., I. Buesa, M. Salgueiro, J. Bilbao, L. Aguilera, M. Zimmermann and J. J. Azkue (2010). "Subtype-specific changes in 5-HT receptor-mediated modulation of C fibre-evoked spinal field potentials are triggered by peripheral nerve injury." Neuroscience **168**(3): 831-841.

Aoki, J., M. Hayashida, M. Tagami, M. Nagashima, K. Fukuda, D. Nishizawa, Y. Ogai, S. Kasai, K. Ikeda and K. Iwahashi (2010). "Association between 5-hydroxytryptamine 2A receptor gene polymorphism and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery." Neurosci Lett **479**(1): 40-43.

Attal, N., G. Cruccu, R. Baron, M. Haanpaa, P. Hansson, T. S. Jensen and T. Nurmikko (2010). "EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision." Eur J Neuro **17**(9): 1113-e1188.

Azkue, J. J., X. G. Liu, M. Zimmermann and J. Sandkuhler (2003). "Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors." Pain **106**(3): 373-379.

Bardin, L., M. Bardin, J. Lavarenne and A. Eschalier (1997). "Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used." Exp Brain Res **113**(1): 81-87.

Baron, R. (2000). "[Neuropathic pain. The long path from mechanisms to mechanism-based treatment]." Anaesthesist **49**(5): 373-386.

Baron, R. (2000). "Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms." Clin J Pain **16**(2 Suppl): S12-20.

Baron, R. (2006). "Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective." Nat Clin Pract Neurol **2**(2): 95-106.

Baron, R., A. Binder and G. Wasner (2010). "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment." Lancet Neurol **9**(8): 807-819.

Baron, R. and R. D. Treede (2007). "[Diagnosis of neuropathic pain]." Dtsch Med Wochenschr **132**(41): 2139-2144.

Berger, M., J. A. Gray and B. L. Roth (2009). "The expanded biology of serotonin." Annu Rev Med **60**: 355-366.

Binder, A., D. May, R. Baron, C. Maier, T. R. Tolle, R. D. Treede, A. Berthele, F. Faltraco, H. Flor, J. Gierthmuhlen, S. Haenisch, V. Hugel, W. Magerl, C. Maihofner, H. Richter, R. Rolke, A. Scherens, N. Uceyler, M. Ufer, G. Wasner, J. Zhu and I. Cascorbi (2011). "Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients." PLoS One **6**(3): e17387.

Bockaert, J., S. Claeysen, C. Becamel, A. Dumuis and P. Marin (2006). "Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation." Cell Tissue Res **326**(2): 553-572.

Bray, N. J., P. R. Buckland, H. Hall, M. J. Owen and M. C. O'Donovan (2004). "The serotonin-2A receptor gene locus does not contain common polymorphism affecting mRNA levels in adult brain." Mol Psychiatry **9**(1): 109-114.

Buskila, D. (2007). "Genetics of chronic pain states." Best Pract Res Clin Rheumatol **21**(3): 535-547.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie S 1 Leitlinie: Pharmakologisch nicht interventionelle Therapie chronisch neuropathischer Schmerzen.

Diatchenko, L., A. G. Nackley, I. E. Tchivileva, S. A. Shabalina and W. Maixner (2007). "Genetic architecture of human pain perception." Trends Genet **23**(12): 605-613.

Doi-Saika, M., A. Tokunaga and E. Senba (1997). "Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT₃ but via 5-HT_{2A} receptors." Neurosci Res **29**(2): 143-149.

Dworkin, R. H., A. B. O'Connor, J. Audette, R. Baron, G. K. Gourlay, M. L. Haanpaa, J. L. Kent, E. J. Krane, A. A. Lebel, R. M. Levy, S. C. Mackey, J. Mayer, C. Miaskowski, S. N. Raja, A. S. Rice, K. E. Schmader, B. Stacey, S. Stanos, R. D. Treede, D. C. Turk, G. A. Walco and C. D. Wells (2010). "Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update." Mayo Clin Proc **85**(3 Suppl): S3-14.

Falkenberg, V. R., B. M. Gurbaxani, E. R. Unger and M. S. Rajeevan (2011). "Functional genomics of serotonin receptor 2A (HTR2A): interaction of polymorphism, methylation, expression and disease association." Neuromolecular Med **13**(1): 66-76.

Finnerup, N. B., S. H. Sindrup and T. S. Jensen (2007). "Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement." Fundam Clin Pharmacol **21**(2): 129-136.

Finnerup, N. B., S. H. Sindrup and T. S. Jensen (2010). "The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain." Pain **150**(3): 573-581.

Foulkes, T. and J. N. Wood (2008). "Pain genes." PLoS Genet **4**(7): e1000086.

Gavarini, S., C. Becamel, B. Chanrion, J. Bockaert and P. Marin (2004). "Molecular and functional characterization of proteins interacting with the C-terminal domains of 5-HT₂ receptors: emergence of 5-HT₂ "receptosomes"." Biol Cell **96**(5): 373-381.

Gharizadeh, B., T. Nordstrom, A. Ahmadian, M. Ronaghi and P. Nyren (2002). "Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer." Anal Biochem **301**(1): 82-90.

Gordon, D. B. and G. Love (2004). "Pharmacologic management of neuropathic pain." Pain Manag Nurs **5**(4 Suppl 1): 19-33.

Haanpaa, M., N. Attal, M. Backonja, R. Baron, M. Bennett, D. Bouhassira, G. Cruccu, P. Hansson, J. A. Haythornthwaite, G. D. Iannetti, T. S. Jensen, T. Kauppila, T. J. Nurmikko, A. S. Rice, M. Rowbotham, J. Serra, C. Sommer, B. H. Smith and R. D. Treede (2011). "NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment." Pain **152**(1): 14-27.

Hannon, J. and D. Hoyer (2008). "Molecular biology of 5-HT receptors." Behav Brain Res **195**(1): 198-213.

Hazelwood, L. A. and E. Sanders-Bush (2004). "His452Tyr polymorphism in the human 5-HT_{2A} receptor destabilizes the signaling conformation." Mol Pharmacol **66**(5): 1293-1300.

Honda, M., K. Uchida, M. Tanabe and H. Ono (2006). "Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT_{2A/2C} receptors." Neuropharmacology **51**(4): 866-872.

Iwasaki, T., K. Otsuguro, T. Kobayashi, T. Ohta and S. Ito (2013). "Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors." Eur J Pharmacol **702**(1-3): 149-157.

Julius, D., Huang, K.N., Livelli, T.J., Axel, R., Jessell, T.M. (1990). "The 5HT₂ receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **87**: 928e932.

Latremoliere, A. and C. J. Woolf (2009). "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity." J Pain **10**(9): 895-926.

Lawyer, F. C., S. Stoffel, R. K. Saiki, S. Y. Chang, P. A. Landre, R. D. Abramson and D. H. Gelfand (1993). "High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity." PCR Methods Appl **2**(4): 275-287.

Lee, Y. H., S. J. Choi, J. D. Ji and G. G. Song (2012). "Candidate gene studies of fibromyalgia: a systematic review and meta-analysis." Rheumatol Int **32**(2): 417-426.

Li, P. and M. Zhuo (1998). "Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord." Nature **393**(6686): 695-698.

Maier, C., R. Baron, T. R. Tolle, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, J. Gierthmuhlen, H. Flor, C. Geber, V. Hugel, E. K. Krumova, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, H. Richter, R. Rolke, A. Scherens, A. Schwarz, C. Sommer, V. Tronnier, N. Uceyler, M. Valet, G. Wasner and R. D. Treede (2010). "Quantitative sensory testing

in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes." Pain **150**(3): 439-450.

Manske, M. (18.02.2003, zitiert am 03.08.2016). "Schematische Darstellung der Elektrophorese."from
:http://images.google.de/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fupload.wikimedia.org%2Fwikipedia%2Fcommons%2F1%2F11%2FAgarose-Gelelektrophorese.png&imgrefurl=https%3A%2F%2Fde.wikipedia.org%2Fwiki%2FAgarose-elektrophorese&h=420&w=465&tbnid=wsUSXpY0RU0C4M%3A&docid=hnlmb7cj9tKg5M&ei=AtKhV7fWMYOrUf7Qu_AL&tbn=isch&iact=rc&uact=3&dur=408&page=1&start=0&ndsp=33&ved=0ahUKEwi33432jqXOAhWDVRQKH7oDr4QMwgeKAAwAA&bih=731&biw=1600.

Millan, M. J. (2002). "Descending control of pain." Prog Neurobiol **66**(6): 355-474.

Mogil, J. S. (1999). "The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7744-7751.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Myers, R. L., D. C. Airey, D. H. Manier, R. C. Shelton and E. Sanders-Bush (2007). "Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (HTR_{2A}) influence gene expression." Biol Psychiatry **61**(2): 167-173.

Naito, Y., M. Ishii, A. Nagamine, A. Imagawa, K. Shida, J. Takahashi, Y. Hosaka, Y. Naito, H. Oyamada, S. Shimizu, K. Oguchi, H. Hara, Y. Masuda, S. Usami and Y. Kiuchi (2010). "Association of the A-1438G polymorphism in serotonin 2A receptor in migraine with aura among Japanese patients." Biol Pharm Bull **33**(10): 1751-1753.

Nicholl, B. I., K. L. Holliday, G. J. Macfarlane, W. Thomson, K. A. Davies, T. W. O'Neill, G. Bartfai, S. Boonen, F. F. Casanueva, J. D. Finn, G. Forti, A. Giwercman, I. T. Huhtaniemi, K. Kula, M. Punab, A. J. Silman, D. Vanderschueren, F. C. Wu and J. McBeth (2011). "Association of HTR_{2A} polymorphisms with chronic widespread pain

and the extent of musculoskeletal pain: results from two population-based cohorts." Arthritis Rheum **63**(3): 810-818.

Nitanda, A., N. Yasunami, K. Tokumo, H. Fujii, T. Hirai and H. Nishio (2005). "Contribution of the peripheral 5-HT 2A receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain." Neurochem Int **47**(6): 394-400.

Okamoto, K., H. Imbe, Y. Morikawa, M. Itoh, M. Sekimoto, K. Nemoto and E. Senba (2002). "5-HT_{2A} receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is involved in the potentiation of inflammatory pain in rats." Pain **99**(1-2): 133-143.

Ossipov, M. H., G. O. Dussor and F. Porreca (2010). "Central modulation of pain." J Clin Invest **120**(11): 3779-3787.

Ossipov, M. H., J. Lai, T. P. Malan, Jr. and F. Porreca (2000). "Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain." Ann N Y Acad Sci **909**: 12-24.

Parsons, M. J., U. M. D'Souza, M. J. Arranz, R. W. Kerwin and A. J. Makoff (2004). "The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity." Biol Psychiatry **56**(6): 406-410.

Pata, C., E. Erdal, K. Yazc, H. Camdeviren, M. Ozkaya and O. Ulu (2004). "Association of the -1438 G/A and 102 T/C polymorphism of the 5-Ht_{2A} receptor gene with irritable bowel syndrome 5-Ht_{2A} gene polymorphism in irritable bowel syndrome." J Clin Gastroenterol **38**(7): 561-566.

Petit, A. C., G. Quesseveur, F. Gressier, R. Colle, D. J. David, A. M. Gardier, F. Ferreri, J. P. Lepine, B. Falissard, C. Verstuyft, B. P. Guiard and E. Corruble (2014). "Converging translational evidence for the involvement of the serotonin 2A receptor gene in major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **54**: 76-82.

Pierce, P. A., G. X. Xie, J. D. Levine and S. J. Peroutka (1996). "5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study." Neuroscience **70**(2): 553-559.

Qiagen (02.2015). QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Handbook.

Quednow, B. B., K. U. Kuhn, R. Mossner, S. G. Schwab, A. Schuhmacher, W. Maier and M. Wagner (2008). "Sensorimotor gating of schizophrenia patients is influenced by 5-HT_{2A} receptor polymorphisms." Biol Psychiatry **64**(5): 434-437.

Rahman, W., K. Bannister, L. A. Bee and A. H. Dickenson (2011). "A pronociceptive role for the 5-HT₂ receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat." Brain Res **1382**: 29-36.

Rahman, W., R. Suzuki, M. Webber, S. P. Hunt and A. H. Dickenson (2006). "Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation." Pain **123**(3): 264-274.

Raju, H. B., Z. Englander, E. Capobianco, N. F. Tsinoremas and J. K. Lerch (2014). "Identification of potential therapeutic targets in a model of neuropathic pain." Front Genet **5**: 131.

Raymond, J. R., Y. V. Mukhin, A. Gelasco, J. Turner, G. Collinsworth, T. W. Gettys, J. S. Grewal and M. N. Garnovskaya (2001). "Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction." Pharmacol Ther **92**(2-3): 179-212.

Rolke, R. (2009). "„Diagnostischer „Work-up“ neuropathischer Schmerzen in der klinischen Praxis: Quantitative sensorische Testung als komplementäres Verfahren zur konventionellen Elektrophysiologie". Klinische Neurophysiologie **40**(03): 177-182.

Rolke, R., R. Baron, C. Maier, T. R. Tolle, R. D. Treede, A. Beyer, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, I. C. Botefur, S. Braune, H. Flor, V. Hugel, R. Klug, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, C. Rolko, C. Schaub, A. Scherens, T. Sprenger, M. Valet and B. Wasserka (2006). "Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values." Pain **123**(3): 231-243.

Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen and P. Nyren (1996). "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release." Anal Biochem **242**(1): 84-89.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.

Sasaki, M., H. Obata, K. Kawahara, S. Saito and F. Goto (2006). "Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats." Pain **122**(1-2): 130-136.

Sasaki, M., H. Obata, S. Saito and F. Goto (2003). "Antinociception with intrathecal alpha-methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine 2A/2C receptor agonist, in two rat models of sustained pain." Anesth Analg **96**(4): 1072-1078, table of contents.

Schaible, H. G. (2007). "[Pathophysiology of pain]." Orthopade **36**(1): 8, 10-12, 14-16.

Serretti, A., A. Drago and D. De Ronchi (2007). "HTR_{2A} gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies." Curr Med Chem **14**(19): 2053-2069.

Sommer, C. (2004). "Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery." Mol Neurobiol **30**(2): 117-125.

Sommer, C. (2006). "Is serotonin hyperalgesic or analgesic?" Curr Pain Headache Rep **10**(2): 101-106.

Supornsilpchai, W., S. M. le Grand and A. Srikiatkachorn (2010). "Involvement of pro-nociceptive 5-HT_{2A} receptor in the pathogenesis of medication-overuse headache." Headache **50**(2): 185-197.

Suzuki, R., W. Rahman, S. P. Hunt and A. H. Dickenson (2004). "Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury." Brain Res **1019**(1-2): 68-76.

Tokunaga, A., M. Saika and E. Senba (1998). "5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery." Pain **76**(3): 349-355.

Treede, R. D. and R. Baron (2008). "How to detect a sensory abnormality." Eur J Pain **12**(4): 395-396.

Treede, R. D., T. S. Jensen, J. N. Campbell, G. Cruccu, J. O. Dostrovsky, J. W. Griffin, P. Hansson, R. Hughes, T. Nurmikko and J. Serra (2008). "Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes." Neurology **70**(18): 1630-1635.

Treede, R. D. and W. Magerl (2000). "Multiple mechanisms of secondary hyperalgesia." Prog Brain Res **129**: 331-341.

Truini, A., L. Garcia-Larrea and G. Cruccu (2013). "Reappraising neuropathic pain in humans--how symptoms help disclose mechanisms." Nat Rev Neurol **9**(10): 572-582.

Van Oekelen, D., W. H. Luyten and J. E. Leysen (2003). "5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties." Life Sci **72**(22): 2429-2449.

Van Steenwinckel, J., M. J. Brisorgueil, J. Fischer, D. Verge, J. A. Gingrich, S. Bourgoin, M. Hamon, R. Bernard and M. Conrath (2008). "Role of spinal serotonin 5-HT_{2A} receptor in 2',3'-dideoxycytidine-induced neuropathic pain in the rat and the mouse." Pain **137**(1): 66-80.

Van Steenwinckel, J., A. Noghero, K. Thibault, M. J. Brisorgueil, J. Fischer and M. Conrath (2009). "The 5-HT_{2A} receptor is mainly expressed in nociceptive sensory neurons in rat lumbar dorsal root ganglia." Neuroscience **161**(3): 838-846.

Vanegas, H. and H. G. Schaible (2004). "Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?" Brain Res Brain Res Rev **46**(3): 295-309.

Villalobos, C., J. C. Beique, J. A. Gingrich and R. Andrade (2005). "Serotonergic regulation of calcium-activated potassium currents in rodent prefrontal cortex." Eur J Neurosci **22**(5): 1120-1126.

Wei, F., R. Dubner, S. Zou, K. Ren, G. Bai, D. Wei and W. Guo (2010). "Molecular depletion of descending serotonin unmasks its novel facilitatory role in the development of persistent pain." J Neurosci **30**(25): 8624-8636.

Woolf, C. J. (2004). "Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy." Life Sci **74**(21): 2605-2610.

Woolf, C. J. (2011). "Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain." Pain **152**(3 Suppl): S2-15.

Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T. L. Madden (2012). "Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction." BMC Bioinformatics **13**: 134.

Zhang, Y. Q., X. Gao, G. C. Ji and G. C. Wu (2001). "Expression of 5-HT_{2A} receptor mRNA in rat spinal dorsal horn and some nuclei of brainstem after peripheral inflammation." Brain Res **900**(1): 146-151.

Anhang

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik - Schwannenweg 20 - 24105 Kiel

Herrn
Prof. Dr. med. R. Baron
Klinik für Neurologie
Niemannsweg 147

24105 Kiel

Schwannenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum:
3.9.2003

Az.: A 131/03

Studienplan: Untersuchung der Funktion und Eigenschaften des somatosensorischen Nervensystems an Patienten mit neuropathischen Schmerzsyndromen im Rahmen des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz (DFNS), gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)

Studienprotokoll, Patienteninformation und Einverständniserklärung - überarbeitete Version vom 19.8.03

Studienleiter

und Antragsteller: Prof. Dr. R. Baron, Klinik für Neurologie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Datum des

Erstantrages: 4.6.2003 (Eingegangen 13.6.2003)

Datum des

überarb. Antrages: 19.8.2003 (Eingang 27.8.2003)

Bestätigung

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft. Die Kommission stimmt darin überein, daß gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

J. Schaub

Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die diese Studie im Umlaufverfahren beurteilt haben:

Prof. Dr. med. J. Schaub (Pädiatrie)
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Prof. Dr. med. H.M. Mehdorn (Neurochirurgie)
Stellv. Vorsitzender der Ethik-Kommission

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch (Rechtsmedizin)

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Kimmig (Strahlentherapie)

Prof. Dr. med. H. Mönig (Innere Medizin)

Frau E. Mosch-Brockstedt (Pastorin)

Priv.-Doz. Dr. med. D. Proppe (Innere Medizin und Klinische Pharmakologie)

Prof. Dr. med. R. Simon (Innere Medizin)

Frau Priv.-Doz. Dr. med. I. Vogel (Chirurgie)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt folgenden Personen, die alle zum erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, Direktor des Instituts für experimentelle und klinische Pharmakologie, für die Möglichkeit diese Studie durchführen zu können, die langjährige gute Betreuung sowie die zahlreichen konstruktiven Besprechungen und Ratschläge, die jederzeit möglich waren.

Frau Dr. Denisa May, für die geduldige und ausführliche Einarbeitung in grundlegende Labortechniken, ihre energetische Art die Dinge voranzubringen, ihr endloses und kreatives Engagement für das Projekt, die intensive Betreuung und den täglichen fruchtbaren und aufbauenden Austausch. Vielen Dank für die enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Dem Deutschen Netzwerk für Neuropathische Schmerzen und insbesondere Prof. Dr. Ralf Baron, Klinik für Neurologie, Uni Kiel für die Bereitstellung von DNA-Proben und wertvoller klinischer Daten.

Den Mitarbeitern des Instituts für experimentelle und klinische Pharmakologie für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders meinen Eltern, die mir Räume, Möglichkeiten und Zuversicht geben mich zu entwickeln und mich immer wieder ermutigt haben, diese Arbeit zu vollenden. Vielen lieben Dank für allzeit offene Ohren und den ausdauernden Rat und die vielfältigen Taten mit denen ihr mir zur Seite steht.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Carolin Christin Diesch
Geburtsdatum	01.10.1985
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Akademische Laufbahn

1996-2005	Gymnasium Altenholz, Abitur
2006- 2013	Studium der Humanmedizin, Universität Pécs, Ungarn und Charité, Berlin
2008	Physikum, Universität Pécs, Ungarn
2010- 2011	Erasmus Universität Umeå, Schweden
2013	Staatsexamen, Charité, Berlin

Praktische Erfahrung

2012	1. Tertial des Praktischen Jahres in der Traumatologie des Royal Brisbane and Women's Hospital, Australien
2012	1. Tertial des Praktischen Jahres in der Allgemeinchirurgie und Unfallchirurgie der Park-Klinik Berlin Weißensee
2013	2. Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin, Ruppiner Kliniken, Neuruppin
2013	3. Tertial des Praktischen Jahres in der Dermatologie, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Campus Mitte, Berlin
Seit 2014	Assistenzärztin für Innere Medizin, Krankenhaus Neuwittelsbach, München

München, den 16.09.2016