

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

**Assoziation genetischer Varianten
im Sigma-1-Rezeptor und Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Juliane Sachau
aus Göttingen**

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, Institut für Experimentelle u. Klinische Pharmakologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer, Klinik für Neurologie

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.07.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Definition von Schmerzen.....	1
1.1.1 Schmerzprozessierung.....	1
1.1.2 Somatosensible Bahnen.....	2
1.2 Nozizeptiver Schmerz.....	2
1.3 Neuropathischer Schmerz.....	3
1.3.1 Klinische Symptomatik.....	4
1.3.2 Diagnostik.....	5
1.3.3 Pathophysiologie.....	7
1.3.4 Aktuelle Therapie.....	9
1.3.5 Mechanismen-basierte Therapie.....	11
1.4 Sigma-1-Rezeptor (<i>SIGMAR1</i>).....	13
1.5 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (<i>AGTR2</i>).....	16
1.6 Variabilität chronischer Schmerzen.....	17
1.7 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Kits, Verbrauchsmaterial.....	19
2.1.2 Geräte.....	20
2.1.3 Primersequenzen.....	20
2.2 Studienkollektiv.....	22
2.3 Phänotypische Charakterisierung mittels Quantitativ Sensorischer Testung (QST).....	23
2.4 Analyse genetischer Varianten in <i>SIGMAR1</i> und <i>AGTR2</i>	25
2.4.1 DNA-Amplifikation.....	25
2.4.2 Polymerasekettenreaktion- (PCR) Amplifikation.....	26
2.4.3 Pyrosequenzierung.....	27
2.4.4 Sanger-Sequenzierung.....	29
2.5 Statistische Auswertung.....	29

3	Ergebnisse	35
3.1	Korrelationsanalyse	37
3.2	Assoziation von <i>SIGMAR1</i> -Genvarianten mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen	38
3.2.1	<i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130)	39
3.2.2	<i>SIGMAR1</i> 5A>C (rs1800866)	45
3.2.3	<i>SIGMAR1</i> 445+400A>G (rs7865100)	49
3.2.4	Haplotypenanalyse und logistische Regression	52
3.2.5	Hauptkomponentenanalyse (PCA)	53
3.3	Assoziation von <i>AGTR2</i> -Genvarianten mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen	58
3.3.1	<i>AGTR2</i> 199G>T (rs5193)	58
3.3.2	<i>AGTR2</i> 205G>A (rs5194)	60
3.3.3	Haplotypenanalyse und logistische Regression	62
4	Diskussion	63
4.1	<i>Single nucleotide variant</i> (SNV) Auswahl	63
4.2	Assoziation von genetischen Varianten in <i>SIGMAR1</i> und <i>AGTR2</i> mit neuropathischem Schmerz	65
4.3	Assoziation von genetischen Varianten in <i>SIGMAR1</i> mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA)	66
4.4	Assoziation von <i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130) mit der Ausprägung von neuropathischem Schmerz	66
4.4.1	Assoziation von -297G>T (rs10814130) mit dem Wind-up Phänomen	67
4.4.2	Assoziation von -297G>T (rs10814130) mit paradoxen Hitzeempfindungen	68
4.4.3	Geschlechterabhängige Assoziation von -297G>T (rs10814130)	69
4.5	Assoziation von <i>SIGMAR1</i> 5A>C (rs1800866) mit der Ausprägung von neuropathischem Schmerz	69
4.6	Assoziation von <i>SIGMAR1</i> 445+400A>G (rs7865100) mit der Ausprägung von neuropathischem Schmerz	71
4.7	<i>SIGMAR1</i> und <i>TRPV1</i>	72
4.8	Assoziation von <i>single nucleotide variants</i> (SNVs) in <i>AGTR2</i> mit der Ausprägung von neuropathischen Schmerzen	73
4.9	Limitationen	75
4.10	Fazit	76
4.11	Ausblick	76

5	Zusammenfassung.....	78
6	Literaturverzeichnis	80
7	Anhang	88
8	Danksagung.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Flussschema zum <i>Grading</i> neuropathischer Schmerzen	5
Abbildung 2	Sigma-1-Rezeptor-(SIGMAR1)-Signalweg.	13
Abbildung 3	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AGTR2) Signalweg.	16
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Pyrosequenzier-Kaskade.....	28
Abbildung 5	Somatosensorische Profile des Patientenkollektivs eingeteilt in Cluster 1 und 2.....	31
Abbildung 6	<i>Linkage disequilibrium</i> (LD) Plots für die <i>single nucleotide variants</i> (SNVs) in SIGMAR1 (A) und in AGTR2 (B).....	36
Abbildung 7	<i>Heatmap</i> der QST-Parameter Korrelationen.	37
Abbildung 8	Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) sowie auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater (B) aller neuropathischen Schmerzpatienten.....	39
Abbildung 9	Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).....	40
Abbildung 10	Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) aller weiblichen Patienten.....	41
Abbildung 11	Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater (B) von weiblichen Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).....	42
Abbildung 12	Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter aller männlichen Patienten.....	43
Abbildung 13	Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) von männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).....	44

- Abbildung 14 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) aller neuropathischen Schmerzpatienten. 45
- Abbildung 15 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater (B) von Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1). 46
- Abbildung 16 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) aller weiblichen Patienten. 47
- Abbildung 17 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater (B) von weiblichen Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1). 47
- Abbildung 18 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B). 49
- Abbildung 19 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater (B) von weiblichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1.) 50
- Abbildung 20 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater (B) aller männlichen Patienten. 51
- Abbildung 21 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Paramater von männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1). 52
- Abbildung 22 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der thermischen Detektion (PC1) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2). 55
- Abbildung 23 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der thermischen

Nozozeption/Druckschmerzhyperalgesie (PC3) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).	56
Abbildung 24 Einfluss von <i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der mechanischen Detektion (PC4) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).	57
Abbildung 25 Einfluss von <i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der mechanischen Hyperalgesie (PC2) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).	57
Abbildung 26 Einfluss von <i>AGTR2</i> 199G>T (rs5193) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter aller weiblichen Patienten.	58
Abbildung 27 Einfluss von <i>AGTR2</i> 199G>T (rs5193) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter von weiblichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).	59
Abbildung 28 Einfluss von <i>AGTR2</i> 199G>T (rs5193) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) von weiblichen Patienten mit einem überwiegenden Verlust der somatosensorischen Funktion (Cluster 2).	60
Abbildung 29 Einfluss von <i>AGTR2</i> 205G>A (rs5194) auf das somatosensorische Profil (A) und die Häufigkeit dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxer Hitzeempfindungen (PHS) (B) von männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).	61
Abbildung 30 Einfluss von <i>AGTR2</i> 205G>A (rs5194) auf das somatosensorische Profil (A) und die Häufigkeit dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxer Hitzeempfindungen (PHS) (B) von männlichen Patienten mit einem überwiegenden Verlust der somatosensorischen Funktion (Cluster 2).	62
Abbildung 31 Darstellung der untersuchten <i>single nucleotide variants</i> (SNVs) im <i>SIGMAR1</i> -Gen.	66
Abbildung 32 Strukturformeln von Glutamin und Prolin.	71
Abbildung 33 Darstellung der untersuchten <i>single nucleotide variants</i> (SNVs) im <i>AGTR2</i> -Gen.	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Primernamen, Primersequenzen und Fragmentlänge der zu amplifizierenden Sequenz.....	21
Tabelle 2 Demographische Patientendaten.....	23
Tabelle 3 Verwendete <i>Annealing</i> -Temperaturen für die PCR-Ansätze der einzelnen <i>single nucleotide variants</i> (SNVs).....	27
Tabelle 4 Dominante Modelle	32
Tabelle 5 Häufigkeiten der <i>single nucleotide variants</i> (SNV) im <i>SIGMAR1</i> - und <i>AGTR2</i> -Gen bei gesunden Kontrollen, neuropathischen Schmerzpatienten und gemäß dem 1000 Genome-Projekt.....	35
Tabelle 6. Rohdaten und logarithmierte Daten für die gesamte Patientenkohorte und für Cluster 1 und 2	38
Tabelle 7 Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit Faktorladungen der 13 QST-Parameter für die vier Hauptkomponenten (PC1-4).	54
Tabelle 8 Bezeichnungen der <i>single nucleotide variants</i> (SNVs), Lokalisation im Gen und Funktion	65
Tabelle 9 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil für <i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130).....	89
Tabelle 10 Signifikante p-Werte für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für <i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130)	90
Tabelle 11 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für <i>SIGMAR1</i> 5A>C (rs1800866)	91
Tabelle 12 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für <i>SIGMAR1</i> 445+400A>G (rs7865100) ..	92
Tabelle 13 Haplotypenanalyse für <i>SIGMAR1</i> -297G>T (rs10814130) und <i>SIGMAR1</i> 5A>C (rs1800866)	93
Tabelle 14 Logistische Regressionsanalyse für die SNVs in <i>SIGMAR1</i> , Geschlecht und Krankheitsentitäten	94
Tabelle 15 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für <i>AGTR2</i> 199G>T (rs5193).....	95
Tabelle 16 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil für <i>AGTR2</i> 205G>A (rs5194).....	95
Tabelle 17 Logistische Regressionsanalyse für die SNVs in <i>AGTR2</i> und Krankheitsentitäten	96

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AGTR1	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
AGTR2	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CDT	Kälteerkennungsschwelle
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPT	Kälteschmerzschwelle
CRPS	komplexes regionales Schmerzsyndrom
DAG	Diacylglycerol
DFNS	Deutscher Forschungsbund Neuropathischer Schmerz
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DMA	dynamisch mechanische Allodynie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRP78	78 kDa Glucose regulierendes Protein
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HPT	Hitzeschmerzschwelle
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
kDa	Kilodalton
LEP	Laser-evozierte Potentiale
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAM	Mitochondrien-assoziierte endoplasmatisches Retikulum-Membran
MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i>
MDT	mechanische Detektionsschwelle
mM	Millimol/liter

MPS	mechanische Schmerzsensitivität
MPT	mechanische Schmerzschwelle
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
Ncl.	<i>Nucleus</i>
NeuPSIG	<i>Special Interest Group on Neuropathic Pain</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	numerische Rating-Skala
NTC	Negativkontrolle
OR	Odds Ratio
OPRM1	μ -Opioidrezeptor 1
PC	<i>principal component</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHS	paradoxe Hitzeempfindungen
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPT	Druckschmerzschwelle
PSQ	Pyrosequenzierer
QST	Quantitativ Sensorische Testung
RNA	Ribonukleinsäure
SEP	Somatosensorisch-evozierte Potentiale
SIGMAR1	Sigma-1-Rezeptor
SNV	<i>single nucleotide variant</i>
snRNA	<i>small nuclear</i> Ribonukleinsäure
SSNRI	Selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
TCA	trizyklische Antidepressiva
TENS	transkutane elektrische Nervenstimulation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRP	Transient-Rezeptor-Potential
TRPV1	Transient-Rezeptor-Potential-Kanal vom Typ Vanilloid-Rezeptor 1
TSL	thermisch sensorisches Limen
3'-UTR	3' untranslatierte Region
VAS	visuelle Analogskala
VDT	Vibrationsdetektionsschwelle
WDR	<i>wide-dynamic-range</i>
WDT	Wärmedetektionsschwelle
WUR	Wind-up Ratio
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Definition von Schmerzen

Die Weltschmerzorganisation *International Association for the Study of Pain* (IASP) definiert Schmerz als „unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit einer aktuellen oder potenziellen Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit den Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“¹. Diese Definition zeigt deutlich, dass der Schmerz eine sehr individuelle, subjektive Empfindung ist und durch vielerlei Faktoren (Umwelt, genetische Faktoren etc.) beeinflusst wird. Schmerzen werden anhand ihres Pathomechanismus in nozizeptive und neuropathische Schmerzen eingeteilt, die unterschiedlich therapiert werden. Die derzeitige Therapie neuropathischer Schmerzen, die auf den verursachenden Grunderkrankungen basiert, ist jedoch unspezifisch und häufig ineffektiv, sodass 20% aller Patienten mit neuropathischen Schmerzen, die eine schmerztherapeutische Spezialeinrichtung aufsuchen, unzureichend therapiert werden². Daher liegt einem neuen Therapieansatz, der sogenannten Mechanismen-basierten Therapie, die Identifizierung von Zielstrukturen, die in der Entstehung neuropathischer Schmerzen involviert sind, zugrunde. Dabei sollte die große Variabilität chronischer Schmerzen und somit des therapeutischen Ansprechens berücksichtigt werden, bei der neben einer Vielzahl anderer Faktoren auch die genetische Variabilität eine entscheidende Rolle spielt. Die genetische Variabilität lässt sich größtenteils durch *single nucleotide variants* (SNVs), Variationen eines einzelnen Basenpaars der Desoxyribonukleinsäure (DNA)³, erklären.

1.1.1 Schmerzprozessierung

Schmerzreize werden durch spezifische Schmerzrezeptoren, die Nozizeptoren, wahrgenommen, die sich als freie Nervenendigungen in fast jedem Gewebe des Körpers befinden. Sie registrieren potenziell schädigende mechanische, thermische oder chemische Reize und leiten diese über afferente Nervenfasern an das Gehirn weiter. Anhand des Entladungsverhaltens werden drei verschiedene Hauptgruppen von Nozizeptoren unterschieden: Über dünn-myelinisierte, schnell leitende A δ -Fasern wird der akute erste Schmerz mit stechendem Charakter vermittelt. Die polymodalen Nozizeptoren können hingegen durch mechanische, thermische oder chemische

Reize erregt werden und leiten über unmyelinisierte C-Fasern den verzögerten, zweiten Schmerz weiter, der als dumpf-bohrend empfunden wird. Darüber hinaus existieren sogenannte ruhende Nozizeptoren (*silent nociceptors*), die unter physiologischen Bedingungen inaktiv sind. An den freien Endigungen der Schmerzrezeptoren findet die Kodierung des Schmerzreizes in ein Rezeptorpotenzial (Transduktion) statt. Hierfür sind verschiedene Rezeptoren in der Nozizeptormembran lokalisiert, deren Aktivierung entweder direkt (inotroper Mechanismus) oder indirekt über intrazelluläre Signalkaskaden (metabotroper Mechanismus) die Bildung eines Rezeptorpotenzials bedingt. Das Rezeptorpotenzial wird elektronisch fortgeleitet und bei Übertreten der Schwelle durch spannungsabhängige Na⁺-Kanäle (Na_v1.6-1.9) in ein Aktionspotenzial transformiert ⁴.

1.1.2 Somatosensible Bahnen

Mehrere aufsteigende somatosensible Bahnen sind für die Weiterleitung verschiedener Reize (mechanisch, thermisch, chemisch) aus dem Rückenmark zum primär somatosensorischen Kortex des Gehirns zuständig.

Der *Tractus spinothalamicus (lateralis und anterior)* vermittelt über A δ - und C-Fasern Schmerz-, Temperatur-, grobe Druck- und Tastempfindungen. Anhaltende, dumpfe Schmerzen und das damit einhergehende Unwohlsein werden über den *Tractus spinoreticularis* vermittelt.

Über die Hinterstrangbahnen werden propriozeptive (Lage und Stellung des Bewegungsapparates) und exterozeptive (Berührung) Signale vermittelt. Diese Bahn setzt sich aus dem *Fasciculus gracilis*, mit Fasern aus der unteren Extremität, und dem *Fasciculus cuneatus*, mit Fasern aus der oberen Extremität (A α -, A β -Fasern), zusammen. Eine detaillierte Darstellung der somatosensiblen Bahnen lässt sich in den Werken von Klinker *et al.* ⁵ und Trepel ⁶ nachlesen.

1.2 Nozizeptiver Schmerz

Schmerzen können anhand ihrer zeitlichen Dauer in den akuten Schmerz und den chronischen Schmerz, der je nach Definition eine Mindestdauer von 3-6 Monaten aufweist, eingeteilt werden ⁷. Der akute Schmerz gilt als lebenswichtige Sinnesmodalität und dient dem Körper als Warnsignal, um (potenziell) schädigende Noxen zu

vermeiden. Beim chronischen Schmerz geht diese Schutzfunktion verloren. Hier erhält der Schmerz einen eigenständigen Krankheitswert⁸. Etwa 17% der deutschen Bevölkerung leiden an chronischen Schmerzen⁹. Chronische Schmerzen lassen sich anhand ihres Pathomechanismus in drei Hauptgruppen einteilen, die unterschiedlich therapiert werden. Es werden nozizeptive und neuropathische Schmerzen sowie Schmerzen mit nozizeptiver und neuropathischer Komponente (*mixed pain*) unterschieden¹⁰. Der nozizeptive Schmerz entsteht als Folge einer direkten Aktivierung von Nozizeptoren durch (potenziell) schädigende Reize bei intaktem Nervensystem. Er gilt im Gegensatz zum neuropathischen Schmerz, dem keine adäquate Stimulation afferenter Nervenfasern vorausgeht, als physiologisch und ist bei kausaler Therapie potenziell reversibel^{8,10,11}. Zum nozizeptiven Schmerz zählen u.a. chronische Entzündungsschmerzen, z.B. bei Osteoarthritis, viszerale Schmerzen sowie die Hauptkomponente der chronischen Rückenschmerzen und Tumorschmerzen². Daneben existiert nach Überarbeitung der ursprünglichen Definition des neuropathischen Schmerzes (siehe Kapitel 1.3) eine vierte Gruppe chronischer Schmerzen, der sogenannte noziplastische Schmerz¹². Der noziplastische Schmerz wird definiert als Schmerz infolge einer veränderten Nozizeption ohne klaren Hinweis auf eine akute oder drohende Gewebeschädigung, die eine Aktivierung peripherer Nozizeptoren bewirkt, und ohne Hinweis auf eine Erkrankung bzw. Läsion des somatosensorischen Systems. Hierzu zählen z.B. Schmerzen im Rahmen einer Fibromyalgie oder eines komplexen regionalen Schmerzsyndroms (CRPS) Typ 1.

1.3 Neuropathischer Schmerz

Die IASP definierte den neuropathischen Schmerz im Jahr 1994 als Schmerz, der durch eine Läsion oder Dysfunktion des Nervensystems entsteht. Nach Erneuerung dieser ursprünglichen Definition durch die *Special Interest Group on Neuropathic Pain* der IASP (NeuPSIG) gilt der neuropathische Schmerz seit 2008 als direkte Folge einer Schädigung oder Erkrankung somatosensorischer Nervenstrukturen¹¹. Die Prävalenz neuropathischer Schmerzen beläuft sich auf etwa 0,9 bis 17,9% weltweit¹³⁻¹⁵. Anhand der Genese werden neuropathische Schmerzen in zentrale und periphere Schmerzen unterteilt, die sich in ihrer klinischen Manifestation und Pathophysiologie unterscheiden¹¹. Während zentrale neuropathische Schmerzen durch eine primäre Läsion zentralnervöser Strukturen (Rückenmark, Gehirn) entstehen, treten pe-

riphere neuropathische Schmerzen infolge einer Verletzung eines (fokaler Befall) oder mehrerer peripherer Nerven (diffuser Befall) auf. Als Ursache sowohl peripherer als auch zentraler neuropathischer Schmerzen kommen toxische, metabolische, mechanische oder entzündliche Veränderungen in Betracht ². Typische Beispiele für neuropathische Schmerzen sind die postherpetische Neuralgie, schmerzhafte Polyneuropathien (schmerzhafte diabetische Polyneuropathie, Small-Fiber-Neuropathie), die posttraumatische Neuralgie und zentrale Schmerzen nach Rückenmarksverletzungen. Die Verletzung nervaler Strukturen führt zu neuroplastischen Veränderungen des zentralen und peripheren Nervensystems, die im Laufe der Zeit irreversibel werden können ¹⁰.

1.3.1 Klinische Symptomatik

Typischerweise berichtet der neuropathische Schmerzpatient über ein Nebeneinander von sogenannten positiven (Hypersensitivität) und negativen (Hyposensitivität) Symptomen sowohl in dem vom betroffenen Nerv innervierten Hautareal als auch in benachbarten Arealen. Negative Symptome sind Ausdruck einer durch die Nervenläsion herabgesetzten Sensibilität. Sie können sich bei Schädigung dick-myelinisierter Nervenfasern oder der Hinterstrangbahnen (siehe Kapitel 1.1.2) durch ein vermindertes Ansprechen auf mechanische Stimuli äußern. Ebenso können sie eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber thermischen und schmerzhaften Reizen infolge einer Schädigung von dünnen Nervenfasern oder des spinothalamischen Traktes (siehe Kapitel 1.1.2) darstellen ¹⁰. Die als besonders belastend empfundenen positiven Symptome umfassen den spontanen Schmerz (ohne äußeren Reiz), der sich oftmals als brennender Dauerschmerz oder als stechende, einschießende Schmerzattacken präsentiert. Daneben können evozierte Schmerzen (Allodynie, Hyperalgesie) als Reaktion auf einen äußeren Stimulus auftreten. Die Allodynie beschreibt das Phänomen, dass ein eigentlich nicht schmerzhafter Reiz im betroffenen Hautareal als schmerzhaft wahrgenommen wird. In der klinischen Praxis wird unter Allodynie meist nur die mechanisch dynamische Allodynie (DMA) verstanden, bei der schon eine leichte Berührung, wie etwa das Bestreichen der Haut mit einem Wattebausch, starke Schmerzen auslöst und die typischerweise im Rahmen einer postherpetischen Neuralgie auftritt ^{16,17}. Ein inadäquat gesteigertes Schmerzempfinden bei verminderter analgetischer Reizschwelle wird als Hyperalgesie bezeichnet. Daneben stellt die

Summation ein weiteres evoziertes Schmerzphänomen dar. Hierunter wird die zunehmende Schmerzverstärkung infolge wiederholter Nozizeptorstimulation durch nur leicht schmerzhaft Reize verstanden. Dieses Schmerzphänomen wird auch als Wind-up Ratio (WUR) bezeichnet. Pathophysiologisch liegt dem eine Fazilitierung des nozizeptiven Systems zugrunde ¹⁸. Neuropathische Schmerzen werden von den betroffenen Patienten oft als brennend oder einschießend in Kombination mit Dysästhesien beschrieben und lassen sich daher schon anhand der Qualität von anderen Schmerzformen abgrenzen ¹⁰.

1.3.2 Diagnostik

Die Diagnostik neuropathischer Schmerzen basiert auf bestimmten Kriterien eines durch die NeuPSIG entwickelten *Grading Systems*, bei dem sichere, wahrscheinliche, mögliche und unwahrscheinliche neuropathische Schmerzen unterschieden werden (siehe Abbildung 1) ¹¹.

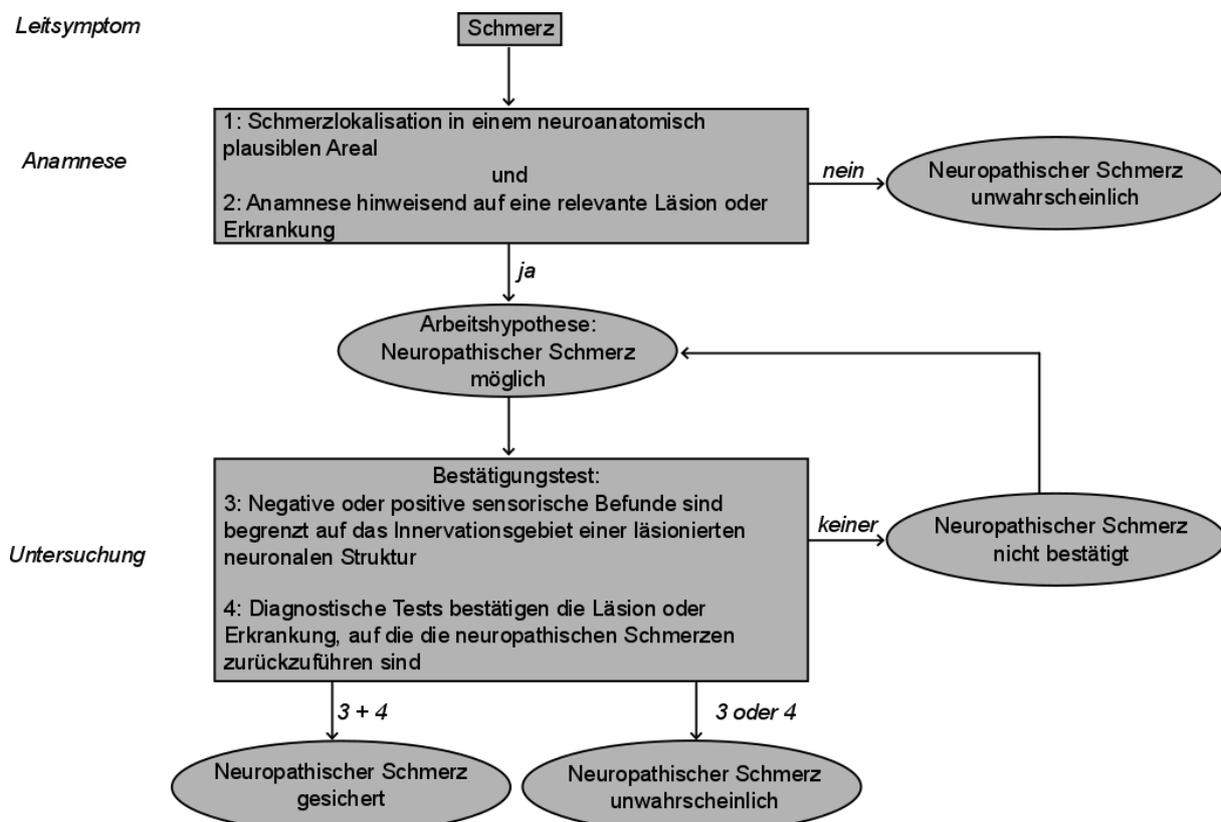


Abbildung 1 Flussschema zum *Grading* neuropathischer Schmerzen

Dargestellt sind die vier *Grading* Kriterien zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, ob ein Patient unter neuropathischem Schmerz leidet. Modifiziert nach der S1-Leitlinie für die „Diagnostik und Therapie in der Neurologie“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) ¹⁹.

Da sich Schmerzen individuell sehr heterogen präsentieren und kein einheitliches klinisches Bild darstellen, ist die Anamnese in Kombination mit einer klinisch-neurologischen Untersuchung entscheidend, um einen ersten Eindruck vom Patienten und dem zugrundeliegenden Krankheitsbild zu gewinnen. Neben Beginn, Dauer, zeitlichen Charakteristika, Schmerzqualität und -lokalisation, werden auch die Einnahme von Medikamenten, Komorbiditäten sowie schmerzliche Erfahrungen in der Lebensgeschichte erfragt.

Zur Quantifizierung der Schmerzintensität werden im klinischen Alltag u.a. Analogskalen eingesetzt (Numerische Rating-Skala, NRS; visuelle Analogskala, VAS) ¹⁹. Darüber hinaus wurden standardisierte *Screening Tools* wie z.B. verschiedene Schmerzfragebögen (*Neuropathic Pain Questionnaire* ²⁰, DN4 ²¹, painDETECT ²²) zur erleichterten Klassifikation neuropathischer Schmerzen entwickelt, die allerdings 10-20% der neuropathischen Schmerzpatienten nicht als solche erkennen ¹⁰. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten häufig nicht das Symptom im Fragebogen beschreiben, was der Untersucher erfassen möchte, d.h. dass Angaben aus Fragebögen und Untersuchungsbefunde häufig nur wenig Assoziation zeigen ²³. Durch den Patienten geführte Schmerztagebücher mit Angaben zu Schmerzintensität im Tagesverlauf, aber auch zum Schlafverhalten und zur Medikamenteneinnahme, liefern ein besseres Verständnis der Schmerzsymptomatik und können zur Verlaufsbeurteilung genutzt werden ²⁴.

Die *Bedside*-Untersuchung dient der vereinfachten Erfassung der veränderten Sensibilität im Bereich des betroffenen Hautareals neuropathischer Schmerzpatienten. Dabei wird die Reaktion des Patienten auf Berührung, Nadelreize, Druck, Kälte, Hitze, Vibration und zeitliche Summation untersucht und die Antwort als „normal“, „vermindert“ oder „gesteigert“ eingestuft ²⁴.

Zur Quantifizierung verschiedener Symptome neuropathischer Schmerzen existiert mit der durch den Deutschen Forschungsbund Neuropathischer Schmerz (DFNS) etablierten Quantitativ Sensorischen Testung (QST) ein standardisiertes Protokoll ^{16,17}, mit dem sich für jeden Patienten ein individuelles Sensibilitätsprofil des betroffenen Hautareals erstellen lässt. Anhand dieses sensorischen Profils können dann

Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen der Schmerzentstehung gezogen werden. Bei dem subjektiven, psycho-physikalischen Testverfahren werden mit einer Testbatterie in insgesamt sieben Tests 13 verschiedene thermische sowie mechanische Sensibilitätsparameter untersucht und die Werte des erkrankten Hautareals mit Werten der kontralateralen gesunden Körperpartie und Werten gesunder Kontrollprobanden verglichen. Im Gegensatz zur konventionellen Neurographie können bei der QST sowohl die dick-myelinisierten A β -Fasern als auch die dünn- und unmyelinisierten A δ - und C-Fasern erfasst werden ¹⁷.

Darüber hinaus können je nach Krankheitsbild zusätzliche elektrophysiologische Untersuchungen, wie die Elektroneurographie (ENG) und die Elektromyographie (EMG), bildgebende Verfahren zur Darstellung von Gehirn oder Rückenmark, Hautbiopsien und Somatosensorisch- und Laser-evozierte Potentiale (SEP, LEP) ergänzt werden, um Pathologien afferenter Nervenfasern auch objektiv nachzuweisen. Daneben können in Abhängigkeit vom Krankheitsbild laborchemische Untersuchungen wegweisend sein, beispielsweise zur Ursachenabklärung einer Polyneuropathie ¹⁹. Da hierbei jedoch keine Messung des Schmerzempfindens erfolgt, ist die Erfassung eines kausalen Zusammenhangs von zugrundeliegender Läsion und Schmerzausprägung im Rahmen dieser Untersuchungen häufig nicht möglich.

1.3.3 Pathophysiologie

Neuropathischer Schmerz entsteht als Folge einer Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Systems. Dabei sind verschiedene periphere und zentralnervöse Pathomechanismen für die Ausbildung der unterschiedlichen Schmerzcharakteristika verantwortlich ¹⁰. Die individuellen Pathomechanismen können anhand der in Kapitel 1.3.2. beschriebenen Methoden zur Erfassung patientenspezifischer Symptome identifiziert werden. Die Hypersensitivität vieler neuropathischer Schmerzpatienten lässt sich durch ein Ungleichgewicht zwischen gesteigerter zentraler oder peripherer Sensibilisierung und verminderter Schmerzhemmender Mechanismen erklären, welches durch eine Veränderung der Funktion und Expression von Ionenkanälen und Veränderungen der neuronalen Funktion entsteht ²⁵. Die geschädigten Neuronen sind durch eine verminderte Aktivierungsschwelle sowie eine gesteigerte Membranerregbarkeit charakterisiert. Infolge der Nervenschädigung kommt es zu einer peripheren

Sensibilisierung, d.h. einer gesteigerten Erregbarkeit primärer Afferenzen (C-, A β -, A δ -Fasern) mit Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (Protonen, ATP, Prostaglandine, Substanz P, Histamin). Die angelockten Immunzellen setzen Zytokine frei, die über einen gesteigerten Na⁺- und Ca²⁺-Strom zur Generierung von Aktionspotenzialen an der nozizeptiven Endigung führen ²⁶. Darüber hinaus trägt die ektopre Aktivität afferenter Nervenfasern entscheidend zur Entwicklung einer primären Hyperalgesie und Allodynie bei. Unter physiologischen Bedingungen werden afferente C-/A δ -Fasern durch eine potenzielle Gewebeschädigung aktiviert, was sich in den hohen Schwellen der Nozizeptoren für chemische, thermische und mechanische Reize widerspiegelt. Eine Nervenläsion führt zwar oft zu einem sensorischen Verlust in dem vom geschädigten Nerven innervierten Hautareal, allerdings können sowohl die geschädigten als auch die benachbarten intakten nozizeptiven Afferenzen eine Spontanaktivität entwickeln, die sich u.a. durch eine gesteigerte Expression spannungsgesteuerter Na⁺-Kanäle begründen lässt und sich zunächst in einer Erniedrigung der Wahrnehmungsschwellen äußert ^{10,25}. Daher kann sich das klinische Bild neuropathischer Schmerzen heterogen präsentieren und aus Dauerschmerz, Taubheit und evozierten Schmerzen bestehen (zur detaillierten Darstellung der klinischen Symptomatik siehe Kapitel 1.3.1) ²⁵. Die sekundäre Hyperalgesie und Allodynie beruhen im Gegensatz dazu auf Veränderung der Schmerzverarbeitung im zentralen Nervensystem (ZNS) und sind Zeichen einer zentralen Sensibilisierung. Eine dauerhafte Entladung nozizeptiver Nervenfasern mit permanenter Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren und Neuropeptide (Glutamat, Substanz P) aus der präsynaptischen Endigung führt zu Veränderungen der postsynaptischen Membran im Sinne einer Sensibilisierung postsynaptischer multirezeptiver *wide-dynamic-range* (WDR) Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks. Im Rahmen dieser Sensibilisierung kommt es zu einer verstärkten Phosphorylierung und somit Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure- (AMPA) Rezeptoren oder einer vermehrten Expression spannungsgesteuerter Na⁺-Kanälen.

Eine Läsion peripherer Nerven mit Funktionsverlust inhibitorischer GABAerger (γ -Aminobuttersäure) Interneurone des Rückenmarks sowie der Wegfall hemmender absteigender Bahnen begünstigen eine gesteigerte Erregbarkeit und somit die Schmerzentstehung ²⁷. Die insgesamt resultierende erleichterte Schmerzprojektion

zum Thalamus, primär somatosensorischen Kortex und limbischen System über die in Kapitel 1.1.2 beschriebenen Bahnen führt zu einem zum gesteigerten Schmerzempfinden, und zum anderen häufig zu durch die Schmerzen verursachten Sekundärkomplikationen wie Depression und Schlafproblemen ²⁶.

1.3.4 Aktuelle Therapie

Neuropathische Schmerzen erfordern aufgrund der Vielzahl zugrundeliegender Pathomechanismen und häufiger, vor allem psychologischer, Komorbiditäten oft ein individuelles, multimodales Therapiekonzept, bestehend aus medikamentösen und nicht-medikamentösen Maßnahmen. Nicht-medikamentöse Therapieverfahren sind beispielsweise die transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS), psychologisch-verhaltenstherapeutische Ansätze oder die physikalische Therapie und die Ergotherapie. Hintergrund ist das von Engel bereits 1977 etablierte biopsychosoziale Schmerzmodell ²⁸, wonach chronische Schmerzen durch das Zusammenspiel sich gegenseitig beeinflussender biologischer, psychologischer und sozialer Faktoren entstehen. Vor Beginn der medikamentösen Therapie sollten zunächst alle kausalen Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft werden. Falls diese nicht verfügbar sind oder zu keiner adäquaten Schmerzlinderung führen, sollte so früh wie möglich mit der medikamentösen Therapie in ausreichend hoher Dosierung begonnen werden, um eine Schmerzchronifizierung zu vermeiden ¹⁹. Die aktuelle medikamentöse Therapie umfasst eine Vielzahl an Medikamenten, die lediglich durch eine Modulation des Schmerzsystems und nicht durch eine Bekämpfung der Schmerzursache zu einer Schmerzlinderung führen.

Gemäß den Leitlinien der DGN gelten die trizyklischen Antidepressiva (TCA), der selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) Duloxetin, Antikonvulsiva mit Wirkung auf neuronale Kalziumkanäle sowie Capsaicin- und Lidocain-Pflaster zur topischen Anwendung als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung neuropathischer Schmerzen.

Die analgetische Wirkung der Antidepressiva (TCA, SSNRI) entsteht durch eine Wiederaufnahmehemmung von Serotonin und Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt. Nachfolgend werden die deszendierenden schmerzhemmenden Bahnen verstärkt. Die TCA hemmen darüber hinaus spannungsabhängige Natriumkanäle. Sie

gelten als die wirksamsten analgetischen Substanzen bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen, wobei der antidepressive Effekt einen zusätzlichen Benefit darstellt, da Patienten mit neuropathischen Schmerzen häufig eine depressive Komponente entwickeln¹⁰. Man unterscheidet sedierende (z.B. Amitriptylin) von nicht sedierenden (z.B. Clomipramin) TCA, die je nach gewünschter Wirkung verordnet werden können. Bei dieser Arzneistoffgruppe werden jedoch häufig anticholinerge Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Miktionsbeschwerden, Mundtrockenheit, Obstipation sowie orthostatische Dysregulation und kardiale Nebenwirkungen beobachtet, die insbesondere bei älteren Patienten nicht selten zum Therapieabbruch führen²⁹. Der selektive SSNRI Duloxetine ist für die Behandlung der schmerzhaften diabetischen Neuropathie zugelassen.

Die allgemein gut verträglichen Antikonvulsiva Gabapentin und Pregabalin führen durch ihre Bindung an die $\alpha_2\delta$ -Untereinheit neuronaler Calcium-Kanäle zu einem verminderten Ca^{2+} -Einstrom in die Nervenzellen und hemmen somit die Freisetzung verschiedener Neurotransmitter (Substanz P, Glutamat) und damit die Fortleitung der Schmerzreize¹⁰. Während der Einsatz von Gabapentin derzeit nur in der Therapie peripherer neuropathischer Schmerzen (postherpetische Neuralgie) empfohlen wird, konnte für Pregabalin eine zusätzliche analgetische Wirksamkeit bei der Behandlung von zentralen Neuropathien nach Rückenmarksverletzungen gezeigt werden³⁰⁻³².

Zur topischen Schmerztherapie wird u.a. der Einsatz von Lidocain- und Capsaicin-Pflastern empfohlen. Lidocain führt über eine Blockade regionaler Na^+ -Kanäle zu einem verminderten Schmerzempfinden³³. Lidocain-Pflaster können in der Therapie der postherpetischen Neuralgie aufgrund schmerzlindernder und antialodyner Effekte bei seltenen systemischen Nebenwirkungen durch die topische Applikation mit geringer Absorption und damit systemischer Nebenwirkungen eingesetzt werden³⁴. Capsaicin bewirkt bei niedriger Dosierung initial eine Aktivierung von Transient-Rezeptor-Potential-Kanälen vom Typ Vanilloid-Rezeptor (TRPV1) auf nozizeptiven Afferenzen und durch wiederholte Anwendung eine dauerhafte Desensibilisierung dieser Rezeptoren. Durch die einmalige Anwendung hochdosierter Capsaicin-Pflaster (8%) konnte bei Patienten mit postherpetischer Neuralgie und diabetischer Polyneuropathie eine Schmerzlinderung erzielt werden^{35,36}. Erste Langzeitstudien konnten die gute Verträglichkeit von Capsaicin bei der Behandlung der diabetischen Polyneuropathie bestätigen³⁷.

Die Antikonvulsiva Carbamazepin, Oxcarbazepin und Lamotrigin entfalten ihre analgetische Wirkung über die Hemmung spannungsgesteuerter Natrium-Kanäle auf sensibilisierten Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems. Carbamazepin gilt als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der Trigeminusneuralgie. Oxcarbazepin und Lamotrigin werden als off-label Alternative bei Carbamazepin-Unverträglichkeit oder pharmakologischer Interaktion empfohlen, spielen aber sonst bei der Therapie neuropathischer Schmerzen eine untergeordnete Rolle ¹⁹.

Hochpotente Opioide wie Morphin und Oxycodon gelten nicht als Mittel der ersten Wahl in der Therapie neuropathischer Schmerzen, da die schweren Nebenwirkungen in der Langzeittherapie, wie z.B. Abhängigkeit und Missbrauch, häufig therapielimitierende Faktoren darstellen. Sie können jedoch bei Versagen anderer Medikamente als Drittlinientherapeutika eingesetzt werden ³³.

In einzelnen Studien zur Behandlung von peripherem Nervenschaden und schmerzhafter diabetischer Polyneuropathie konnte ein analgetischer Effekt durch mehrfache intrakutane Botulinumtoxin A-Injektion erzielt werden ³⁸. Alle weiteren potenziell analgetischen Arzneistoffe (z.B. Cannabinoiden, NMDA-Antagonisten) führten in bisherigen Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen und sind daher (noch) nicht Mittel der Wahl ¹⁰.

Eine komplette Schmerzfreiheit wird mit den derzeitig verfügbaren Medikamenten häufig nicht erreicht. Daher liegt das vorrangige Therapieziel vor allem in einer Schmerzreduktion um 30-50%, einer Verbesserung der Schlaf- und Lebensqualität sowie dem Erhalt der sozialen Aktivität und Arbeitsfähigkeit ¹⁹.

1.3.5 Mechanismen-basierte Therapie

Die Therapie neuropathischer Schmerzen basiert derzeit auf Medikamenten, die unabhängig von der Schmerzursache zu einer Schmerzlinderung führen. Auch wenn neuropathische Schmerzen grundsätzlich als Folge einer Nervenläsion entstehen, existiert eine Vielzahl pathophysiologischer Mechanismen, die zum Gesamtbild der individuell empfundenen Schmerzen beiträgt. Dabei zeigen Patienten mit gleicher Grunderkrankung häufig verschiedene sensorische Symptome und Patienten mit unterschiedlicher zugrundeliegender Erkrankung können wiederum identische Sensibili-

tätsprofile aufweisen¹⁰. Demzufolge sollten nicht die Krankheitsentitäten als Therapiegrundlage neuropathischer Schmerzen dienen, sondern vielmehr die individuellen sensorischen Symptome, da diese häufig einen Hinweis auf die zugrundeliegenden Pathomechanismen liefern¹⁰. Um eine effektivere Schmerztherapie gewährleisten zu können, sollten zukünftige in der Therapie eingesetzte Arzneistoffe gezielt in die individuellen Pathomechanismen eines Patienten eingreifen. Eine solche Therapie wird als Mechanismen-basiert bezeichnet³⁹. Im Zuge dieser Therapieoptimierung müssen Zielstrukturen für Arzneistoffe identifiziert werden, die in der Entstehung neuropathischer Schmerzen involviert sind und als Angriffspunkte für neue Arzneistoffe dienen können. Als potenzielle neue Zielstrukturen zur Behandlung neuropathischer Schmerzen wurden der Sigma-1-Rezeptor (*SIGMAR1*) und der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (*AGTR2*) identifiziert. Im Rahmen mehrerer Interventionsstudien, die zum Teil schon klinisch im Menschen durchgeführt wurden, konnte durch den Einsatz von *SIGMAR1*- und *AGTR2*-Antagonisten eine Schmerzlinderung erzielt werden^{40,41}.

Der Einsatz von *SIGMAR1*-Antagonisten bewirkte im Mausmodell eine Verbesserung des antinozizeptiven Effekts von Opioiden ohne Zunahme der Opioid-bedingten Nebenwirkungen⁴². Verschiedene Studien haben gezeigt, dass *SIGMAR1*-Liganden alleine das Schmerzempfinden unter physiologischen Bedingungen nicht beeinflussen⁴³. Unter sensibilisierten Bedingungen, wie z.B. nach Nervenschaden, zeigten *SIGMAR1*-Antagonisten jedoch einen antialloodynen und antihyperalgetischen Effekt und führten zu einer Normalisierung der durch die Schädigung verminderten Schmerzschwellen, ohne dabei schwere Nebenwirkungen zu bewirken. In einer kürzlich durchgeführten randomisierten, doppelblinden Phase-IIa-Studie von Bruna *et al.*⁴¹ wurde die Wirksamkeit von MR309, einem neuen selektiven *SIGMAR1*-Antagonisten, in der Behandlung Oxaliplatin-induzierter peripherer Neuropathie untersucht. Hierbei führte MR309 bei akzeptablem Nebenwirkungsprofil zu einer verminderten akuten Neuropathie und potenzieller Neuroprotektion der chronischen Oxaliplatin-induzierten Neuropathie. Aufgrund dieser Ergebnisse sind *SIGMAR1*-Antagonisten potenzielle neue Arzneimittel zur Behandlung neuropathischer Schmerzen und Gegenstand der aktuellen klinischen Forschung⁴⁴.

Auch der Einsatz von *AGTR2*-Antagonisten führte in mehreren präklinischen Studien zu einer Hemmung pronozizeptiver Mechanismen⁴⁵⁻⁴⁷. In einer Phase-II-Studie von

Rice *et al.* ⁴⁰ wurden die Schmerzen bei Patienten mit postherpetischer Neuralgie durch den Einsatz von EMA401, einem selektiven AGTR2-Antagonisten, signifikant stärker gelindert als durch ein Placebo. EMA401 zeichnete sich dabei aufgrund einer fehlenden ZNS-Penetration durch ein geringes Nebenwirkungsprofil aus und wurde von allen Patienten gut toleriert.

1.4 Sigma-1-Rezeptor (SIGMAR1)

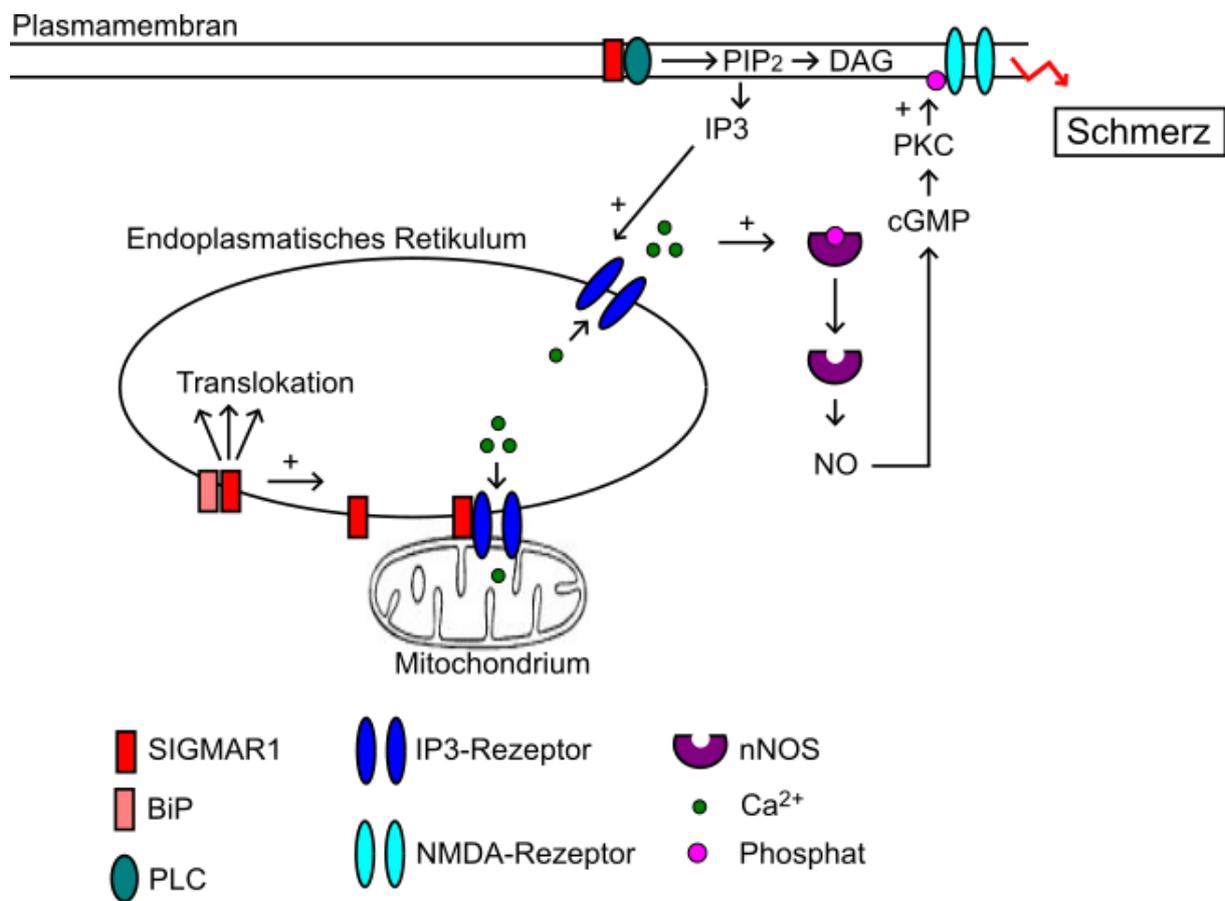


Abbildung 2 Sigma-1-Rezeptor-(SIGMAR1)-Signalweg.

Dargestellt ist eine postulierte SIGMAR1-Signalkaskade inklusive beteiligter Enzyme, die zur Schmerzentstehung beitragen könnte. Unter physiologischen Bedingungen bildet SIGMAR1 einen inaktiven Komplex mit dem *binding immunoglobulin protein* (BiP). Eine stressinduzierte Dissoziation von BiP führt zur Aktivierung und Translokation von SIGMAR1 in verschiedene Zellkompartimente. An der Mitochondrien-assoziierten Membran des Endoplasmatischen Retikulums (MAM) verhindert SIGMAR1 durch Bindung instabiler Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) Rezeptoren deren Degradation und gewährleistet so den Ca²⁺-Strom ins Mitochondrium. An der Plasmamembran bewirkt SIGMAR1 über eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) eine gesteigerte IP₃-Produktion. Die Bindung von IP₃ an IP₃-Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums führt zur Freisetzung von Ca²⁺ ins Zytoplasma. Ca²⁺ induziert die Dephosphorylierung und somit die Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS). Es entsteht vermehrt Stickstoffmonoxid (NO), was eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und somit eine Phosphorylierung des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptors bewirkt. Durch die NMDA-Rezeptor-Aktivierung kommt es letztlich zur Schmerzentstehung.

SIGMAR1 ist ein Chaperon-Protein, das mit vielen verschiedenen Rezeptoren und Ionenkanälen interagiert und deren Aktivität moduliert^{43,48}. Chaperon-Proteine sind für die korrekte Faltung und Aggregation von Proteinen zuständig⁴⁹. Bis zu seiner ersten Klonierung aus Meerschweinchenleber im Jahr 1996 wurde SIGMAR1 aufgrund der Kreuzreaktivität einiger Liganden zur Familie der Opioid-Rezeptoren gezählt⁵⁰. Das *SIGMAR1*-Gen codiert für ein 24 kDa schweres Protein, das aus 223 Aminosäuren mit zwei Transmembrandomänen besteht⁵⁰, wobei die Liganden-Bindungsstelle vermutlich von der zweiten Transmembrandomäne und dem C-Terminus des Rezeptors gebildet wird⁵¹. Das Gen besteht aus 4 Exons und 3 Introns und ist auf Chromosom 9 Bande p13 lokalisiert⁵². Die Sequenz von *SIGMAR1* weist keine Ähnlichkeit zu anderen Säugetierproteinen auf und unterscheidet sich sowohl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) als auch von Ionenkanälen⁴⁴. Es existieren synthetische und endogene SIGMAR1-Liganden. Eine Vielzahl unterschiedlicher Pharmaka, wie z.B. Antipsychotika und Antidepressiva, binden dabei als Agonisten an SIGMAR1. Diese SIGMAR1-Agonisten zeigten in verschiedenen experimentellen Modellen von akuter Hirnschädigung oder neurodegenerativer Erkrankungen (Alzheimer Demenz) einen neuroprotektiven Effekt⁵³. Neurosteroide (Progesteron, Testosteron, Pregnenolon) gelten hingegen als mögliche endogene Liganden und agieren entweder als Agonisten (Pregnenolon) oder Antagonisten (Progesteron), weisen jedoch insgesamt nur eine geringe SIGMAR1-Affinität auf⁵⁴. Der Rezeptor ist ubiquitär sowohl in peripheren Organen, vor allem in der Leber, als auch im zentralen Nervensystem in Arealen zur Verarbeitung von Emotionen, von Gedächtnisbildung und der motorischen und sensorischen Funktion exprimiert⁴⁴. Hier findet er sich insbesondere in Schlüsselarealen der Schmerzkontrolle, wie den Spinalganglien, dem Thalamus, dem periaquäduktalen Grau und der rostroventralen Medulla⁵⁵. Auf subzellulärer Ebene ist SIGMAR1 vor allem in der Mitochondrien-assoziierten Membran des Endoplasmatischen Retikulums (MAM) verankert⁵⁶.

Die SIGMAR1-Aktivierung resultiert in einer Vielzahl verschiedener Signalkaskaden, von denen im Folgenden nur einige ausgewählte beschrieben werden (Abbildung 2). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von SIGMAR1 nur im bereits vorsensibilisiertem Gewebe, z.B. nach Nervenschädigung, zu einer gesteigerten Schmerzwahrnehmung führt⁴⁴. An der MAM reguliert SIGMAR1 den Ca^{2+} -Efflux aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Mitochondrium über

Aktivierung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) Rezeptoren. Im Mitochondrium wird Ca^{2+} u.a. für die ATP-Produktion benötigt und spielt somit eine entscheidende Rolle für das Zellüberleben, wobei zu hohe mitochondriale Ca^{2+} -Konzentrationen auch zum Zelltod führen können⁵⁶. Ca^{2+} gelangt zum größten Teil aus dem ER über IP3-Rezeptoren ins Mitochondrium. Unter physiologischen Bedingungen bildet SIGMAR1 an der MAM einen inaktiven Komplex mit einem weiteren Chaperon-Protein (*binding immunoglobulin protein*, BiP; auch bekannt als 78 kDa Glucose regulierendes Protein, GRP78). Unter pathologischen Bedingungen (Stress) steigt die Expression von IP3 im Zytosol, was eine Abnahme der Ca^{2+} -Konzentration im ER zur Folge hat. Durch Dissoziation von BiP wird SIGMAR1 aktiviert und verhindert durch Bindung instabiler IP3-Rezeptoren deren Degradation, um so den Ca^{2+} -Influx ins Mitochondrium sicherzustellen⁴⁴. Die Aktivierung und vermehrte Expression von SIGMAR1 resultiert somit u.a. in einer Neuroprotektion und einer Verhinderung von Zelltod als Reaktion auf zellulären Stress⁵⁶. Darüber hinaus kann SIGMAR1 infolge von Aktivierung oder zellulärem Stress in andere Zellkompartimente, wie z.B. in die Plasmamembran, ins Zytoplasma oder die Kernhülle, translozieren⁴³. An der Plasmamembran bewirkt die stressbedingte Aktivierung von SIGMAR1 eine gesteigerte IP3-Produktion durch Stimulation der Phospholipase C (PLC). Durch Bindung von IP3 an die IP3-Rezeptoren des ER wird vermehrt Ca^{2+} ins Zytoplasma freigesetzt. Die gesteigerte zytosolische Ca^{2+} -Konzentration führt zu einer verminderten Phosphorylierung und damit gesteigerter Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS), wodurch vermehrt Stickstoffmonoxid (NO) produziert wird. Die durch NO-induzierte Aktivitätssteigerung der Proteinkinase C (PKC) bedingt eine Phosphorylierung der NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors⁵⁷. Der dadurch aktivierte NMDA-Rezeptor führt über verschiedene Mechanismen zur Induktion synaptischer Plastizität, die u.a. für die Schmerzentstehung infolge zentraler Sensibilisierung wichtig ist⁴⁴.

1.5 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AGTR2)

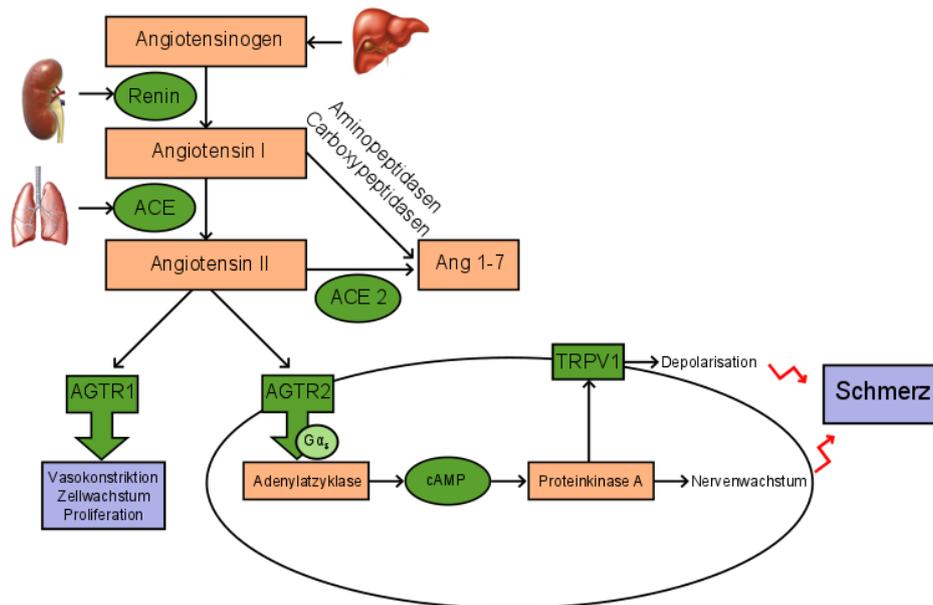


Abbildung 3 Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AGTR2) Signalweg.

Dargestellt sind das Renin-Angiotensin-System (RAAS) mit beteiligten Enzymen und Substraten und die postulierte Signalkaskade von AGTR2, die zur Schmerzentstehung führt. Modifiziert nach Smith und Muralidhara 2014⁴⁶ und Danser und Anand 2014⁵⁸. ACE, Angiotensin-konvertierendes Enzym; AGTR1, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1; AGTR2, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2; cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat; TRPV1, Transient-Rezeptor-Potential-Kanal vom Typ Vanilloid-Rezeptor 1.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (siehe Abbildung 3) wurde 1898 entdeckt und führte aufgrund seiner blutdruckregulierenden Funktion zur Entwicklung vieler Arzneistoffe, die derzeit Grundlage der antihypertensiven Pharmakotherapie sind. Das in der Leber produzierte und sezernierte Angiotensinogen wird durch die Protease Renin in der Niere enzymatisch in das inaktive Angiotensin I umgewandelt. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) aus der Lunge und durch andere Aminopeptidasen und Carboxypeptidasen in Angiotensin II gespalten. Daneben entstehen auch weitere bioaktive Angiotensin-Peptide (Angiotensin III, IV, 1-7), die aber im Vergleich zu Angiotensin II eine untergeordnete Rolle spielen. Angiotensin II bindet an den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AGTR1) und den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (AGTR2). Beide Rezeptoren sind GPCR, bestehend aus 7-Transmembrandomänen, die sich allerdings in ihrer Genomstruktur, der Lokalisation und Funktion voneinander unterscheiden⁴⁶. Im Gegensatz zu AGTR1 scheint AGTR2 keine blutdruckregulierende, sondern eine pronozizeptive Funktion zu haben. Das AGTR2-Gen besteht aus 3 Exons und 2 Introns und befindet sich auf dem Chromosom Xq22-2. AGTR2 ist in den Spinalganglien von Ratten und Menschen mit Markern sensorischer Neuronen, Substanz P und Neurofilament 200 (NF-200) kolo-

kalisiert und wird u.a. in peripheren Nerven sowie in Nervenfasern der Haut, der Blase und des Darms exprimiert⁵⁹. Eine Aktivierung von AGTR2 durch Angiotensin II führt im Sinne einer $G_{\alpha s}$ -Stimulation zu einer vermehrten Phosphorylierung und somit Aktivierung von p38 und p42/44 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK). Diese Aktivierung führt zu einer phosphorylierungsbedingten Aktivierung verschiedener Ionenkanäle, wie z.B. TRPV1- und spannungsgesteuerten Na^+ - und Ca^{2+} -Kanälen⁴⁵. Das resultierende Nervenwachstum bedingt die Ausbildung von Kollateralen sowie eine abnorme Nervenfaserverregeneration und begünstigt zusammen mit der TRPV1-Sensibilisierung die Schmerzentstehung im Sinne einer Pronozizeption⁵⁸.

1.6 Variabilität chronischer Schmerzen

Wie in Kapitel 1.3.5 bereits näher beschrieben, werden neue Arzneimittel zur kausalen Therapie neuropathischer Schmerzen benötigt. Dabei konnten Antagonisten von SIGMAR1 und AGTR2 als vielversprechende Kandidaten identifiziert werden. Grundsätzlich ist die Wirkung der derzeit eingesetzten Substanzen individuell sehr unterschiedlich, da die Schmerzerfahrung und das Ansprechen auf analgetische Arzneistoffe durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. durch das soziale Umfeld, das Patientenalter und -geschlecht, Komorbiditäten und Ko-Medikation, beeinflusst wird⁶⁰. Erst das Zusammenspiel aller Faktoren führt zum subjektiven und individuellen Schmerzerleben⁶¹. Die Unterschiede in der Schmerzempfindung lassen sich zum Teil auch durch die genetische Variabilität erklären. Genetische Variabilität entsteht zum größten Teil durch SNVs. Dabei handelt es sich um eine Variation eines einzelnen Basenpaares der DNA. SNVs können die Entstehung von Krankheiten begünstigen³. So sind genetische Varianten im *NOD2*-Gen beispielsweise mit einem gehäuften Auftreten von Morbus Crohn assoziiert⁶². Darüber hinaus zeigten einige Studien, dass SNVs in bestimmten Genen mit Unterschieden in der Schmerzwahrnehmung assoziiert sind. So führt der 472G>A (rs4680) Polymorphismus im Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*) Gen zu einem Aminosäureaustausch (Valin > Methionin), der mit einem veränderten Schmerzempfinden assoziiert ist. Das variante Allel (A) bewirkt aufgrund einer Verringerung der *COMT*-Enzymaktivität und der dadurch gesteigerten dopaminergen Stimulation eine Hochregulation der μ -Opioid-Rezeptoren im Gehirn und dadurch ein verbessertes Ansprechen auf Morphin⁶³. Im μ -Opioidrezeptor 1 (*OPRM1*) Gen zeigte der 118A>G (rs1799971) Polymorphismus

eine geringere *minor allele frequency* (MAF) bei chronischen Schmerzpatienten verglichen mit einer Kontrollgruppe von Patienten mit postoperativem akuten Schmerz⁶⁴ sowie eine Assoziation des varianten Allels (G) mit einer verringerten Sensitivität für Druckschmerz⁶⁵. In einer Studie von Binder *et al.*⁶⁶ konnte eine Assoziation von Polymorphismen in Transient-Rezeptor-Potential (TRP) Kanälen mit Veränderungen der somatosensorischen Funktion bei neuropathischen Schmerzpatienten beobachtet werden. Inwiefern genetische Varianten in SIGMAR1 und AGTR2 Auswirkungen auf das Schmerzempfinden haben, wurde jedoch bislang nicht untersucht.

1.7 Zielsetzung

Dieser Studie lag die Arbeitshypothese zugrunde, dass genetische Varianten im Sigma-1-Rezeptor (*SIGMAR1*) und Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (*AGTR2*) die Entstehung neuropathischer Schmerzen begünstigen. Hierfür wurde in 228 neuropathischen Schmerzpatienten und 248 gesunden Kontrollen die Genotypenverteilung ausgewählter Polymorphismen in dem *SIGMAR1*-Gen bzw. der Promotorregion (-297G>T (rs10814130), -296C>T (rs1799729), 445+400A>G (rs7865100), 5A>C (rs1800866), 446-42C>T (rs11559048) und in dem *AGTR2*-Gen bzw. der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) (199G>T (rs5193), 205G>A (rs5194), -95-29A>G (rs1403543), 501C>A (rs11091046) bestimmt. In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit die Varianten einen Einfluss auf das somatosensorische Schmerzprofil der Patienten haben. Zur Ermittlung dieses individuellen Schmerzprofils wurden die Patienten zuvor mittels Quantitativ Sensorischer Testung (QST) des Deutschen Forschungsverbunds Neuropathischer Schmerz (DFNS) phänotypisiert und in zwei verschiedene Subgruppen eingeteilt (Cluster 1, Erhalt der somatosensorischen Funktion; Cluster 2, Verlust der somatosensorischen Funktion). Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der Statistik-Software SPSS. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen, das Ansprechen von neuropathischen Schmerzen auf eine medikamentöse Behandlung mit SIGMAR1- oder AGTR2-Antagonisten zu beurteilen. So könnte in Zukunft die Therapie neuropathischer Schmerzen unter Berücksichtigung des Genotyps optimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien stammen, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma Aldrich (Darmstadt, Deutschland). Die Plastikware wurde von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) und Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.1.1 Kits, Verbrauchsmaterial

Alle Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

DNA-Amplifikations-Kit	illustra™ GenomPhi™ V2 Amplification Kit	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
DNA-Aufreinigungs-Kit	GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Material für PCR-Reaktionen		
dNTPs	2,5 mM	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
MgCl	50 mM	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Puffer	500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl; pH 8.4	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Taq-Polymerase	500 U/μl	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Material für Gelelektrophorese		
Ethidiumbromid	10 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Ladepuffer	BlueJuice™ Gel Loading Buffer	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
DNA-Größenmarker	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Agarose		Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Material für die Pyrosequenzierung		
Bindungs-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 1 ml/l Tween 20	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Streptavidin Sepharose Beads		Qiagen (Hilden, Deutschland)
Annealing Puffer	20 mM Tris Acetat, 2 mM	Qiagen

	Magnesium Acetat	(Hilden, Deutschland)
Wasch-Puffer	1 mM Tris Acetat	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Tris-EDTA-Puffer		Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
dNTPs		Qiagen (Hilden, Deutschland)
Enzym-Mix für Pyrosequenzierung	PyroMark Enzyme Mixture	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Substrat-Mix für Pyrosequenzierung	PyroMark Substrate Mixture	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Kammer für Agarose-Gelelektrophorese	Sub-Cell® Model 192	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Geldokumentationssystem	Kodak Image Station 440 CF	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Photometer	NanoPhotometer 1676	Implen (München, Deutschland)
Vakuumsystem	PyroMark Q96 Vacuum Work Station	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pyrosequenzierer	PSQ HS 96 MD	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Heizplatte	VWR Advanced Hot Plate Stirrer	VWR (Hannover, Deutschland)

2.1.3 Primersequenzen

Die Primer wurden mit der Assay Design Software 1.0.6. (Biotage) designt und mittels Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) generiert.

Tabelle 1 Primernamen, Primersequenzen und Fragmentlänge der zu amplifizierenden Sequenz

Gen	SNV	Primernamen	Primersequenz (5' - 3')	Amplikonlänge (bp)
SIGMAR1	-297G>T (rs10814130)*	SIGMAR1_rs10814130 F1	CGTCCATTCTGGGTCTCACTATC	92
		SIGMAR1_rs10814130 R1	GGCAGATGTCAGGGTCTTCA [Btn]	
		SIGMAR1_rs10814130 S1	ACCTATCCGTATGTAGAGTG	
	445+400A>G (rs7865100)	SIGMAR1_rs7865100 F2	GTATGGTGAAACCCCGTCTCT [Btn]	304
		SIGMAR1_rs7865100 R2	CAATTTTGCCCAGACAGTATTCC	
		SIGMAR1_rs7865100 S2	TCGCCCAGGCTGGCGT	
	5A>C (rs1800866)	SIGMAR1_rs1800866 F2	GTCAGGGCGAGCCGTACC	200
		SIGMAR1_rs1800866 R2	[Btn] GTCAGCACCGCTGCGACA	
		SIGMAR1_rs1800866 S1	CCGCCCCGCCGGGATG	
446-42C>T (rs11559048)	SIGMAR1_rs11559048 F5	CACATGGATGGTGGAGTACG	217	
	SIGMAR1_rs11559048 R2	TGCCCGCTCCTGTCTATC [Btn]		
	SIGMAR1_rs11559048 S3	CTATACTCTTCGCTCCTATG		
AGTR2	199G>T (rs5193)	AGTR2_rs5193 F1	CGTCCAGTGACTTTCAGGAATTG	227
		AGTR2_rs5193 R1	TGGTTCAAGAGGAAATCCTGA- TAA [Btn]	
		AGTR2_rs5193 S1	TCTGATATGTTTGTACAAGA	
	205G>A (rs5194)	AGTR2_rs5194 F5	GTTTTATCGTCCAG- TGACTTTCAG [Btn]	196

	AGTR2_rs5194 R1	CCCCACTAAGAAACACAAGCA	
	AGTR2_rs5194 S1	TCTAGGTTGTAAATATGTCT	
-95-29A>G (rs1403543)	AGTR2_rs1403543 F1	TATTACGTCCCAGCGTCTGA	246
	AGTR2_rs1403543 R1	CTTGCTTAG- TGCCTAAACACACTC [Btn]	
	AGTR2_rs1403543 S1	CTGTATTTTGCAAACTCC	
501C>A (rs11091046)	AGTR2_rs11091046 F1	ACTGGATTATTCAGGCTTTAGGC	90
	AGTR2_rs11091046 R1	CTATATTCCTAGCCCTATTGAA- TATGTAG[Btn]	
	AGTR2_rs11091046 S1	GGCATATGCTTCTTTAAAA	

*mit den gleichen Primersequenzen konnte auch *SIGMAR1* -296C>T (rs1799729) detektiert werden, da die beiden *single nucleotide variants* (SNVs) nur 1 Base entfernt voneinander in der Promotorregion des Gens liegen. SNV, *single nucleotide variant*; *SIGMAR1*, Sigma-1-Rezeptor; *AGTR2*, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2; F, Vorwärtsprimer; R, Rückwärtsprimer; S, Sequenzierprimer; [Btn], Biotin; bp, Basenpaar.

2.2 Studienkollektiv

Im Rahmen einer Vorgängerstudie des Deutschen Forschungsverbunds Neuropathischer Schmerz (DFNS) wurden insgesamt 228 Patienten (durchschnittliches Alter 51,3 ± 18,7 Jahre, 121 Frauen, 107 Männer), alle kaukasischer Herkunft, die unterschiedliche neuropathische Schmerzbilder zeigten, klinisch untersucht⁶⁶. Die Patienten litten unter Polyneuropathie (n = 62), postherpetischer Neuralgie (n = 21), peripherem Nervenschaden (n = 27), komplexem regionalen Schmerzsyndrom (CRPS, n = 63), Trigeminusneuralgie (n = 31), zentralem Schmerz (n = 11) sowie unter anderen Formen neuropathischer Schmerzen, die keinem der aufgeführten Syndrome zuzuordnen waren (n = 13), wie Radikulopathien, Phantomschmerz, atypischem Gesichtsschmerz und regionalen Schmerzsyndromen (lokalisierter neuropathischer Schmerz nach operativen Eingriffen oder Trauma). Die weiteren Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 aufgeführt. Als Kontrollgruppe wurden 248 gesunde, kaukasische Probanden (168 Frauen, durchschnittliches Alter 33,5 ± 6,6 Jahre; 80 Männer,

durchschnittliches Alter $35,7 \pm 7,7$ Jahre) in die Studie mit eingeschlossen ⁶⁷. Alle Patienten und Kontrollen gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde durch die zuständige Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie durch Ethikkommissionen der darüber hinaus beteiligten DFNS Zentren befürwortend bewertet und anschließend entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt ⁶⁶.

Tabelle 2 Demographische Patientendaten

	Alle Patienten	Cluster 1	Cluster 2	Männer	Frauen
Anzahl (n)	228	112	116	107	121
Alter (Jahre)	$51,4 \pm 18,7$	$49,6 \pm 17,3$	$53,1 \pm 19,8$	$50,5 \pm 17,8$	$52,2 \pm 19,4$
Krankheitsdauer (Monate)	$35,4 \pm 62,6$	$37,9 \pm 78,0$	$33,3 \pm 46,5$	$44,1 \pm 76,3$	$27,5 \pm 46,0$
Schmerzintensität (0-100 Likert-Skala, NRS)	$5,71 \pm 2,33$	$5,48 \pm 2,17$	$5,94 \pm 2,48$	$5,47 \pm 2,35$	$5,93 \pm 2,30$
Polyneuropathie (n, %)	62 (27,2)	23 (20,5)	39 (33,6)	42 (39,3)	20 (16,5)
Postherpetische Neuralgie (n, %)	21 (9,2)	7 (6,3)	14 (12,1)	5 (4,7)	16 (13,2)
Peripherer Nervenschaden (n, %)	27 (11,8)	13 (11,6)	14 (12,1)	13 (12,1)	14 (11,6)
CRPS (n, %)	63 (27,6)	36 (32,1)	27 (23,3)	16 (15,0)	47 (38,8)
Trigeminusneuralgie (n, %)	31 (13,6)	24 (21,4)	7 (6,0)	14 (13,1)	17 (14,0)
Zentraler Schmerz (n, %)	11 (4,8)	4 (3,6)	7 (6,0)	9 (8,4)	2 (1,7)
Andere Neuropathien (n, %)	13 (5,7)	5 (4,5)	8 (6,9)	8 (7,5)	5 (4,1)

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Absolute Werte und Prozentangaben der einzelnen Krankheitsbilder beziehen sich auf alle untersuchten Patienten. Die Schmerzintensität der letzten vier Wochen wurde mithilfe der Numerischen Rating-Skala bestimmt (NRS; 0, kein Schmerz; 10, schlimmster vorstellbarer Schmerz) bestimmt. Cluster 1 enthält Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion und Cluster 2 Patienten mit einem überwiegenden Verlust der Funktion ⁶⁶. CRPS, komplexes regionales Schmerzsyndrom.

2.3 Phänotypische Charakterisierung mittels Quantitativ Sensorischer Testung (QST)

Die neuropathischen Schmerzpatienten wurden im Vorfeld mittels Quantitativ Sensorischer Testung (QST) phänotypisiert ^{16,17}. Die Messungen dauern dabei 2x30 min (je 30 min für das betroffene und gesunde Areal). Mithilfe einer Thermode lassen sich sechs thermische Parameter erfassen. Zunächst werden die Kälteerkennungsschwelle (CDT) und die Wärmedetektionsschwelle (WDT) sowie das thermisch sensorische Limen (TSL), welches die Fähigkeit des Patienten zur Unterscheidung wechselnder warmer und kalter Reize widerspiegelt, bestimmt. Bei der Messung des TSL wird au-

ßerdem erfragt, ob der Patient einen kalten Reiz als heiß empfindet. Dieses Phänomen wird als paradoxe Hitzeempfindung (PHS) bezeichnet. Mit der Thermode lassen sich schließlich noch die individuelle Kälteschmerzschwelle (CPT) und die Hitzeschmerzschwelle (HPT) erfassen. Zur Bestimmung der mechanischen Sensibilität wird zunächst mithilfe dünner Nylonfilamente, sogenannter von Frey-Haare, getestet, wie gut ein Patient feine Berührungen wahrnehmen kann (Schwelle für Berührungswahrnehmung, MDT). Durch Einsatz von Pinprick-Stimulatoren festgelegter Intensität kann die mechanische Schmerzschwelle (MPT) für Nadelreize bestimmt werden. Darüber hinaus wird die mechanische Schmerzsensitivität (MPS) gemessen, die auch als Pinprick-Hyperalgesie bezeichnet wird. Dabei bewertet der Patient auf einer Skala von 0 bis 100 die Schmerzhaftigkeit eines Nadelreizes (0, kein Schmerz; 100, maximal vorstellbarer Schmerz). Des Weiteren wird erfasst, ob der Patient bereits leichte Berührungsreize als schmerzhaft empfindet (dynamisch mechanische Allodynie, DMA). Mithilfe der Pinprick-Stimulatoren kann außerdem die anhaltende Schmerzverstärkung durch wiederholte Reizung spinaler Neurone gemessen werden. Dieses Phänomen wird als Wind-up-Ratio (WUR) bezeichnet. Dabei vergleicht der Patient die Schmerzintensität eines einzelnen Reizes mit einer Serie wiederholt dargebotener Reize gleicher Intensität. Durch Einsatz einer Stimmgabel (Rydel-Seiffer-Vibrationsgabel) wird die Wahrnehmungsschwelle für Vibration (VDT) über einzelnen Knochenvorsprüngen ermittelt. Die Druckschmerzschwelle (PPT), welche die Empfindlichkeit des Patienten angibt, auf stumpfen Druck zu reagieren, lässt sich mit einem Druckalgometer bestimmen. Anhand der Testergebnisse lassen sich Rückschlüsse auf die jeweils geschädigten afferenten Nervenfasern ziehen. Die Funktion dick-myelinisierter A β -Fasern kann mit Hilfe der mechanischen Detektionsschwelle (MDT) und der Vibrationsdetektionsschwelle (VDT) eingeschätzt werden. Anhand der Kälteerkennungsschwelle (CDT) und der mechanischen Schmerzschwelle (MPT) lassen sich Aussagen über die Funktion dünn-myelinisierter A δ -Fasern treffen. Das Vorhandensein von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) deutet ebenfalls auf eine Störung der A δ -Faserfunktion oder auf eine zentrale Störung des Kälteempfindens hin. Die Wärmedetektionsschwelle (WDT) und Hitzeschmerzschwelle (HPT), wie auch das Wind-up Phänomen (WUR) repräsentieren die Funktion der unmyelinisierten C-Fasern. Inwiefern die Kälte- und Druckschmerzschwelle (CPT, PPT) Hinweise auf die Funktion von C- und A β -Fasern liefern, ist noch nicht eindeutig geklärt. Das Vorhandensein von Hitzehyperalgesie deutet darüber hinaus auf eine periphere

Sensibilisierung hin, wohingegen statische mechanische Hyperalgesie und dynamisch mechanische Allodynie Zeichen für eine zentrale Sensibilisierung sind.

2.4 Analyse genetischer Varianten in *SIGMAR1* und *AGTR2*

Es wurden insgesamt fünf Polymorphismen in dem *SIGMAR1*-Gen bzw. der Promotorregion, -297G>T (rs10814130), -296C>T (rs1799729), 445+400A>G (rs7865100), 5A>C (rs1800866), 446-42C>T (rs11559048), sowie vier Polymorphismen in dem *AGTR2*-Gen bzw. der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR), 199G>T (rs5193), 205G>A (rs5194), -95-29A>G (rs1403543), 501C>A (rs11091046), untersucht. Die Allelfrequenzen der einzelnen SNVs und ihre Position bzw. Funktion im Gen, sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Auswahlkriterien der Polymorphismen werden in Kapitel 4.1 näher erläutert.

Die bereits isolierte Patienten- bzw. Kontroll-DNA wurde auf das Vorhandensein der oben aufgeführten Polymorphismen untersucht. Hierfür wurde der DNA-Gehalt zunächst in den isolierten Proben mit einem Photometer anhand der jeweils absorbierten Lichtintensität bestimmt. Der als optimal angesehene DNA-Gehalt lag dabei bei 30ng/µl.

2.4.1 DNA-Amplifikation

Einzelne Proben der Patienten-DNA wurden zunächst mit dem illustra™ GenomPhi™ V2 Amplification Kit amplifiziert, da von diesen Proben nicht mehr ausreichend DNA für die anschließende Genotypisierung vorhanden war. Die DNA-Amplifikation folgte dabei dem Prinzip der *Multiple Displacement Amplification* (MDA)⁶⁸, die auf einer kontinuierlichen Strangverlängerung (*strand displacement*) beruht, wobei permanent neue, einzelsträngige *Template*-Bereiche entstehen, die als Ausgangspunkt neuer Replikationen dienen, ohne dass die gesamte DNA denaturiert wird. Zunächst lagern sich hexamere Primer unspezifisch an den DNA-Einzelstrang an und dienen im Folgenden als *Templates* für die Amplifikation. Die Phi29 DNA-Polymerase bewegt sich entlang dieser DNA-*Templates* und verdrängt dabei den komplementären Strang. Sobald der nächste Primer erreicht wird, wird dieser seinerseits zum *Template* für eine neue Replikation.

Für die DNA-Amplifikation wurde zunächst 1 µl der DNA mit 9 µl *Sample Puffer*, der die hexameren Primer enthielt, gemischt, danach in einem Thermocycler bei 95 °C für 3 min denaturiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Für die Amplifikation wurde ein Master Mix bestehend aus 9 µl Reaktions-Puffer sowie 1 µl Enzym-Mix mit einer Phi29 DNA-Polymerase, weiteren Hexameren und Nukleotiden für jede Reaktion zu den gekühlten DNA-Proben hinzugefügt und bei 30 °C für 1,5 h inkubiert. Zur Inaktivierung der Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wurden die Proben schließlich für 10 min auf 65 °C erhitzt und dann auf 4 °C gekühlt.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion- (PCR) Amplifikation

Zur Genotypisierung mittels Pyrosequenzierung wurden zunächst für jeden SNV PCR-Reaktionen mit einem biotinylierten und einem nicht-biotinylierten Primer durchgeführt. Vor der Amplifikation wurden die Primer gelöst. Hierfür wurden sie zentrifugiert, mit der angegebenen Menge TaqMan Wasser 1:10 auf 10 µM verdünnt und anschließend für 30 min im Thermoschüttler auf 37 °C erhitzt. Die PCR-Ansätze enthielten in einem Endvolumen von 25 µl mit Wasser verdünnt je 10 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 10 mM Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP; 2,5 mM jedes dNTPs), 50 mM MgCl₂, den Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl; pH 8.4) sowie 75 U einer thermostabilen DNA-Polymerase (500 U/µl) und 1 µg der Patienten- bzw. Probanden-DNA. Jede PCR-Platte beinhaltete neben den DNA-Proben von Patienten und Kontrollen zwei Negativkontrollen (NTCs) ohne DNA, um eine Kontamination des Master Mixes auszuschließen. Für die PCR-Amplifikation wurden folgende Bedingungen gewählt: initiale Denaturierung bei 95 °C für 5 min, gefolgt von 35 Zyklen mit einer jeweiligen Dauer von 30 sec für jeden einzelnen Schritt und bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C, einem *Annealing*-Schritt mit einer für den jeweiligen SNV spezifischen *Annealing*-Temperatur (siehe Tabelle 3) und einer Elongation bei 72 °C. Die finale Elongation erfolgte für 7 min bei 72 °C.

Um die optimale *Annealing*-Temperatur für die Vorwärts- und Rückwärtsprimer der einzelnen SNVs zu ermitteln, wurden jeweils drei verschiedene Temperaturen getestet, die den Schmelztemperaturen der Primer entsprechend ausgewählt wurden (-5-10 °C) und die einzelnen PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurde zunächst im

Rahmen der jeweiligen Temperaturtestung und anschließend nach Auswahl der optimalen *Annealing*-Temperatur exemplarisch für einen Teil der Patienten- und Kontroll-DNA durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Produkte zunächst mit 2 µl Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) auf ein 2 %iges Agarosegel (200 ml 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer, 4 g Agarose) aufgetragen. Das Gel enthielt zusätzlich Ethidiumbromid. Ethidiumbromid ist ein organischer Farbstoff, der durch Interkalation in die DNA sein Absorptionsspektrum ändert und dann bei Bestrahlung mit UV-Licht verstärkt fluoresziert. Die PCR-Produkte wurden so bei einer Laufzeit von 60 min bei 120 V auf einem Geldokumentationssystem dargestellt. Die Banden wurden anhand des DNA-Größenmarkers identifiziert. Als *Annealing*-Temperatur wurde die Temperatur gewählt, für die in der Gelelektrophorese das deutlichste PCR-Produkt zu erkennen war (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Verwendete *Annealing*-Temperaturen für die PCR-Ansätze der einzelnen *single nucleotide variants* (SNVs)

Gen	SNV	<i>Annealing</i> -Temperatur
SIGMAR1	-297G>T (rs10814130) / -296C>T (rs1799729)	59 °C
	445+400A>G (rs7865100)	61 °C
	5A>C (rs1800866)	64 °C
AGTR2	446-42C>T (rs11559048)	57 °C
	199G>T (rs5193)	57 °C
	205G>A (rs5194)	56 °C
	-95-29A>G (rs1403543)	54 °C
	501C>A (rs11091046)	54 °C

SNV, *single nucleotide variant*; SIGMAR1, Sigma-1-Rezeptor; AGTR2, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2

2.4.3 Pyrosequenzierung

Die Genotypisierung der Patienten und Kontrollen erfolgte mittels Pyrosequenzierung (Abbildung 4). Bei dieser Sequenziermethode bindet zunächst ein spezifischer Sequenzierprimer an ein biotinyliertes PCR-Produkt, das als Einzelstrang vorliegt. Die DNA-Polymerase katalysiert die Anlagerung von einem ersten dNTP an den Sequenzierprimer, wenn dieses dNTP komplementär zum vorliegenden Strang ist. Durch diesen Einbau entsteht Pyrophosphat, welches durch die ATP-Sulfurylase in Anwesenheit von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) in ATP überführt wird. Bei der nachfolgenden ATP-abhängigen Umwandlung von Luciferin in Oxiluciferin durch das Enzym Luciferase wird ein Lichtsignal produziert, dessen Stärke proportional zum gebildeten ATP ist. Dieses Lichtsignal wird durch einen Sensor detektiert und als

Peak im Pyrogramm dargestellt. Dabei ist die Höhe des Peaks proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Nach Degradation nichteingebauter Nukleotide und überschüssiger ATPs durch die Apyrase, beginnt ein neuer Elongationszyklus. Die Nukleotidsequenz lässt sich so anhand der Signalpeaks im Pyrogramm ablesen ⁶⁹.

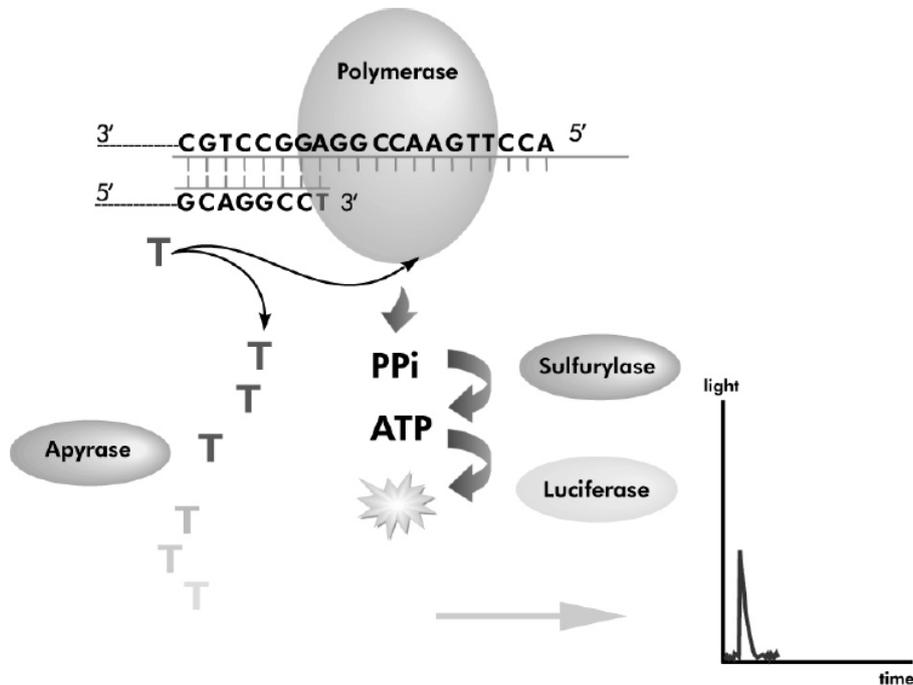


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Pyrosequenzier-Kaskade.

Nach Einbau der Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) in den DNA-Strang wird Pyrophosphat (PPi) freigesetzt und in Adenosinatriphosphat (ATP) umgewandelt. Durch ATP wird ein Lichtsignal generiert und als Peak im Pyrogramm sichtbar. Apyrase degradiert die nichteingebauten Nukleotide ⁷⁰.

Es wurden zunächst 10 µl des PCR-Produktes pro Well einer 96-Well Platte mit 37 µl Bindungs-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 1 ml/l Tween 20), 30 µl Wasser sowie 3 µl Streptavidin-Sepharose *Beads* zur Bindung der PCR-Fragmente gemischt und diese erste PCR-Platte dann für 15-20 min geschüttelt. In der Zwischenzeit wurde eine zweite 96-Well Platte mit 10 µl *Annealing*-Puffer (20 mM Tris Acetat, 2 mM Magnesium Acetat) und 10 µM des jeweiligen Sequenzierprimers (siehe Kapitel 2.1.3) vorbereitet. Die Sepharose *Beads* mit dem daran gebundenen PCR-Produkt wurden mithilfe eines Vakuumsystems aspiriert und anschließend nacheinander für 5 sec in 70 % Ethanol sowie 0,1 M NaOH und für 10 sec in 1:10 Wasch-Puffer (1 mM Tris Acetat) gewaschen. Nach Erhitzen für 2 min auf 80 °C, zur Anlagerung des Sequenzierprimers an den DNA-Strang, und Abkühlen auf Raumtemperatur, wurde die Platte im Pyrosequenzierer platziert. A, C, G und T dNTPs zur Elongation wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit Tris-EDTA-Puffer gemischt und Enzym- und Substratmix zur Pyrosequenzierung bereitgestellt (PSQ H96 1.2.1).

2.4.4 Sanger-Sequenzierung

Einzelne DNA-Proben wurden mittels Ketten-Abbruch-Verfahren nach Sanger ⁷¹ genotypisiert, um die Ergebnisse der Pyrosequenzierung zu überprüfen oder um noch fehlende Proben zu genotypisieren. Die PCR wurde mit nicht-biotinylierten Primern, die ansonsten in ihren Sequenzen den Primern aus Tabelle 1 entsprachen, und den unter Tabelle 3 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das GeneJET PCR Purification Kit verwendet. Die PCR-Proben wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die einzelnen Banden auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Anschließend wurden die PCR-Produkte in mehreren Zentrifugationsschritten mit einem Bindungs- und Waschpuffer aufgereinigt und die DNA schließlich in einem Mikroreaktionsgefäß mit 30 µl Elutionspuffer gemischt. Die Sanger-Sequenzierung erfolgte durch das Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) in Kiel.

Die PCR für *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) und 5A>C (rs1800866) ließ im Gelbild Doppelbanden erkennen. Um die Sequenz mit dem jeweiligen Polymorphismus sicher bestimmen zu können, wurden beide Banden ausgeschnitten und die PCR-Produkte wie oben beschrieben aufgereinigt. Da in der anschließenden Sanger-Sequenzierung nur eine der Banden die entsprechende Sequenz zeigte, wurde für die weitere Genotypisierung die Pyrosequenziermethode angewandt.

2.5 Statistische Auswertung

Die Patienten wurden mittels Quantitativ Sensorischer Testung (QST) phänotypisiert. Mit diesem standardisierten Untersuchungsverfahren lässt sich die veränderte Hautsensibilität neuropathischer Schmerzpatienten erfassen und so ein individuelles Sensibilitätsprofil für jeden Patienten erstellen. Die Werte für die Kälte-, und Hitzeschmerzschwelle (CPT, HPT), für die Vibrationsdetektionsschwelle (VDT) sowie für die Anzahl der paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) waren in dem gesunden Kontrollkollektiv bereits normalverteilt. Alle anderen Parameter wurden zunächst logarithmiert ¹⁶. Anschließend wurden die QST-Parameter, mit Ausnahme von DMA und PHS, z-transformiert. ⁶⁶. Durch die z-Transformation können die QST-Profile von Patienten unabhängig von der Art der Messung der einzelnen Parameter mit Referenz-

daten gesunder Kontrollen (alter-, geschlechts-, ortsnormiert) verglichen werden. Dabei erfolgt die Transformation nach folgender Formel: $Z\text{-Score} = (X_{\text{einzelner Patient}} - \text{Mittelwert}_{\text{Kontrollen}}) / SD_{\text{Kontrollen}}$ ¹⁷. Z-Werte größer als 0 entsprechen einem Zugewinn der somatosensorischen Funktion (Hyperalgesie, Allodynie), wobei der Patient sensibler auf den implizierten Reiz reagiert als gesunde Kontrollen, und Werte kleiner als 0 einem Funktionsverlust, bzw. einer verminderten Sensitivität (Hypoalgesie, Hypästhesie). Das 95% Konfidenzintervall gesunder Kontrollen liegt zwischen -1,96 und +1,96, wobei z-Werte außerhalb dieses Intervalls als pathologisch angesehen werden. Parameter zur Bestimmung von Detektionsschwellen sind ausschließlich durch einen Funktionsverlust und keinen Funktionsgewinn gekennzeichnet. Da DMA und PHS beim Gesunden nicht auftreten, wurden zur Auswertung dieser QST-Parameter dichotomisierte Werte verwendet (0, keine DMA/PHS; 1, Auftreten von DMA/PHS). Anhand der z-Werte wurden die Patienten in zwei Cluster eingeteilt, die sich signifikant in einigen QST-Parametern unterschieden. Cluster 1 enthielt Patienten mit einer vorwiegend erhaltenen somatosensorischen Funktion (moderater sensorischer Verlust bei dominierendem nozizeptiven Zugewinn der Funktion), während Cluster 2 durch einen überwiegenden Verlust der Funktion (starker sensorischer Verlust bei geringem nozizeptiven Zugewinn der Funktion) gekennzeichnet ist (siehe Abbildung 5)⁶⁶.

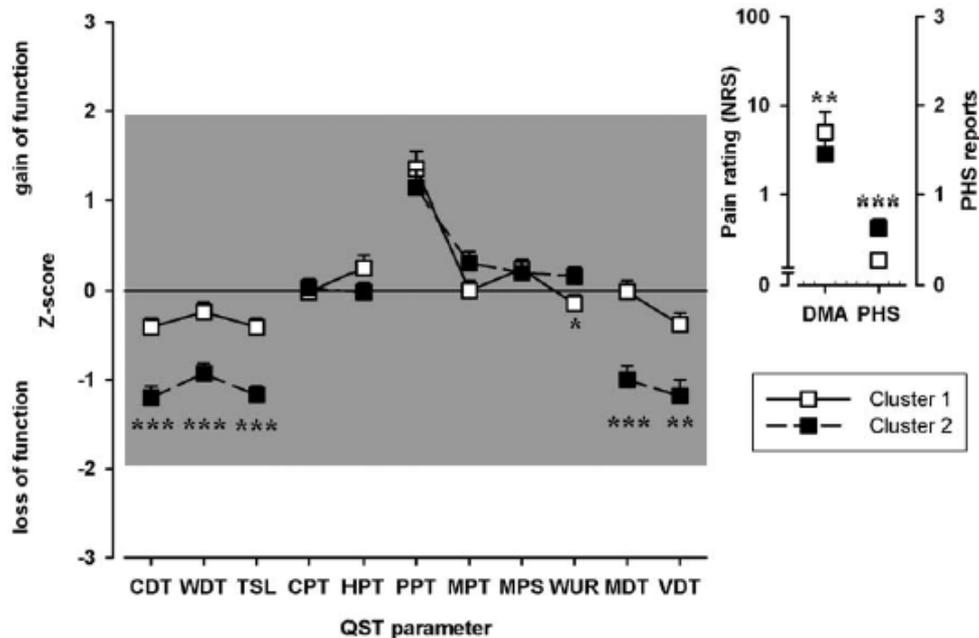


Abbildung 5 Somatosensorische Profile des Patientenkollektivs eingeteilt in Cluster 1 und 2.

Cluster 1 ist durch einen vorwiegenden Erhalt der somatosensorischen Funktion gekennzeichnet, während Cluster 2 einen überwiegenden Funktionsverlust der dünn- oder unmyelinisierten und dickmyelinisierten Nervenfasern anzeigt (signifikant niedrigere z-Werte für CDT, WDT, TSL, MDT, VDT). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichungen. Das grau markierte Areal stellt den Wertebereich gesunder Kontrollen dar (z-Werte zwischen $\pm 1,96$). * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$. CDT, Kältedetektionsschwelle; WDT, Wärmedetektionsschwelle; TSL, thermisch sensorisches Limen; CPT, Kälteschmerzschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzsensitivität; WUR, Wind-up Ratio; MDT, mechanische Detektionsschwelle; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen. Aus Binder *et al.* (2011) ⁶⁶.

Bei der statistischen Auswertung für die Polymorphismen in dem *SIGMAR1*-Gen wurden zunächst alle Patienten als Gesamtkollektiv betrachtet. Da *SIGMAR1* die Sensibilität und das Schmerzempfinden nur unter vorsensibilisierten Bedingungen beeinflusst ⁴⁴, erfolgte die statistische Auswertung zusätzlich für Patienten aus Cluster 1 mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion. Patienten aus Cluster 2, die einen überwiegenden Verlust der Faserfunktion zeigten und dementsprechend nicht vorsensibilisiert waren, wurden nicht separat untersucht. Weiterhin wurden Männer und Frauen getrennt voneinander sowie Männer bzw. Frauen aus Cluster 1 analysiert. Die Auswertung für die Polymorphismen in dem *AGTR2*-Gen erfolgte demgegenüber ausschließlich für Männer und Frauen getrennt und in Cluster 1 bzw. 2, da das Gen auf dem X-Chromosom liegt und Männer somit immer hemizygoter Träger sind.

Zuerst wurde kontrolliert, ob sich das untersuchte Probanden- und Patientenkollektiv im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Mithilfe dieses Gesetzes der Populati-

onsgenetik lassen sich die Allelfrequenzen innerhalb einer Population nach der Formel $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ bestimmen, wobei p und q die Allelfrequenzen der beiden Allele an einem bestimmten Genlocus darstellen. Mittels Chi-Quadrat-Test wird dabei untersucht, ob die beobachtete mit der zu erwarteten Genotypenhäufigkeit innerhalb der Population übereinstimmt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wird als erfüllt angesehen, wenn sich bei der Berechnung kein statistisch signifikanter Unterschied ergibt ($p \geq 0.05$).

Um zu überprüfen, ob die untersuchten Polymorphismen häufiger miteinander verknüpft sind, als nach ihren individuellen Allelfrequenzen zu erwarten wäre, wurde das Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium, LD*) mithilfe des Programms Haploview⁷² berechnet. Da bei gekoppelten SNVs davon ausgegangen wird, dass sie immer zusammen vererbt werden, ist es ausreichend, die Datenauswertung jeweils nur für einen dieser Polymorphismen durchzuführen.

Die statistische Datenauswertung erfolgte mit der Statistik-Software SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, Ehningen). Für alle SNVs in *SIGMAR1* und *AGTR2* wurde ein dominantes Modell zur Auswertung herangezogen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 Dominante Modelle

Gen	SNV	Wildtyp	Heterozygote + homozygote Variante
<i>SIGMAR</i>	-297G>T (rs10814130)	CC	CA + AA
	-296C>T (rs1799729)	GG	GA + AA
	445+400A>G (rs7865100)	TT	TC + CC
	5A>C (rs1800866)	TT	TG + GG
	446-42C>T (rs11559048)	GG	GA + AA
<i>AGTR2</i>	199G>T (rs5193)	GG	GT + TT
	205G>A (rs5194)	GG	GA + AA
	-95-29A>G (rs1403543)	AA	AG + GG
	501C>A (rs11091046)	CC	CA + AA

SNV, single nucleotide variant; *SIGMAR1*, Sigma-1-Rezeptor; *AGTR2*, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2

Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen Patienten und Kontrollen (primäre Fragestellung) wurden mittels Chi-Quadrat- bzw. bei $n < 5$ mittels Fisher-Exakt-Test ermittelt. Darüber hinaus wurden die Allelfrequenzen von Patienten und Kontrollen mit publizierten Daten aus dem 1000 Genome Projekt⁷³ mithilfe des Chi-Quadrat-Tests verglichen.

Die Assoziation von SNVs zu z-transformierten QST-Parametern wurde mittels Varianzanalyse (*analysis of variance, ANOVA*) für normalverteilte Daten ermittelt. Mittels

Levene-Test wurden die untersuchten Gruppen auf Varianzhomogenität geprüft. Bei Inhomogenität wurde der Welch-Test zur Berechnung der Unterschiede der QST-Parameter angewandt. Unterschiede in den dichotomisierten Parametern DMA und PHS in Abhängigkeit vom Genotyp wurden mittels Chi-Quadrat-Test geprüft. Basierend auf den z-transformierten Werten wurden somatosensorische Schmerzprofile für die jeweiligen Genotypengruppe erstellt (Wildtyp vs. heterozygote + homozygote Variante), um diese miteinander zu vergleichen.

Mögliche Unterschiede im Auftreten der Häufigkeiten pathologischer QST-Parameter zwischen den einzelnen Genotypengruppen wurden ebenfalls mit dem Chi-Quadrat-Test oder für $n < 5$ mit dem Fishers Exakt Test analysiert. Die z-Werte der QST-Parameter wurden für diese Berechnung in dichotome Werte konvertiert (0, innerhalb des physiologischen Rahmens; 1, pathologischer Funktionsverlust bzw. -gewinn). PHS und DMA lagen bereits als dichotome Werte vor⁶⁶.

Zur Haplotypenanalyse wurden Patienten, die mindestens ein variantes Allel in zwei SNVs trugen, zu einer Genotypengruppe (z.B. CA + AA und TG + GG) und Patienten mit zwei Wildtyp-Allelen in beiden SNVs (CC und TT) zu einer zweiten Gruppe zusammengefasst.

Mithilfe einer logistischen Regressionsanalyse wurde bestimmt, inwiefern Genotypen, Geschlecht und Krankheitsentität als unabhängige Variablen einen Einfluss auf die pathologischen QST-Parameter haben und wie stark dieser Einfluss ist. Hierfür wurden die dichotomisierten QST-Parameter verwendet.

Mittels einer Korrelationsmatrix wurde die Korrelation zwischen den einzelnen QST-Parametern erfasst und es wurde auf Grundlage der Korrelationskoeffizienten eine *Heatmap* erstellt. Der Korrelationskoeffizient r gibt dabei den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen den Merkmalen an, mit $+1/-1$ als vollständig positiver/negativer Zusammenhang und 0 als fehlender Zusammenhang.

Um die Anzahl der 13 untersuchten QST-Parameter zu reduzieren und so möglichst aussagekräftige Hauptkomponenten zu ermitteln, die näherungsweise das gesamte somatosensorische Profil widerspiegeln, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) der z-Werte durchgeführt (STATISTICA 4.5; Statsoft Europe, Hamburg, Deutschland). Zur Ermittlung des Effekts des varianten Allels von -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) in *SIGMAR1* (heterozygoter

Effekt) auf die ermittelten Hauptkomponenten, wurde anschließend eine zweifaktorielle ANOVA mit den Faktoren „Cluster 1 vs. Cluster 2“ und „ homozygoter Wildtyp vs. heterozygote und homozygote Variante“ berechnet. Bei signifikantem Ergebnis der ANOVA wurde anschließend mittels Post-hoc-Test ermittelt, welche Mittelwerte der QST-Parameter sich für die verschiedenen Genotypen innerhalb der zwei Cluster signifikant voneinander unterschieden. Die p-Werte wurden für multiples Testen nach Bonferroni korrigiert.

Die Berechnung der Korrelationsmatrix und der Hauptkomponentenanalyse wurde von PD Dr. Walter Magerl (Neurophysiologie, Centrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim (CBTM), Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Als zweiseitige Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p < 0,05$) festgelegt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit bei multiplem Testen wurde für die primäre Fragestellung nach Unterschieden in der Genotypenverteilung der SNVs zwischen den neuropathischen Schmerzpatienten und den gesunden Kontrollen nach Bonferroni korrigiert. Hierfür wurde ein (adjustiertes) Signifikanzniveau von $p < 0,05 / n$ (n = Anzahl der durchgeführten Tests) festgelegt. Für die sekundären Fragestellungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Es wurden fünf Varianten im *SIGMAR1*-Gen und vier Varianten im *AGTR2*-Gen in 228 Patienten und 248 Kontrollen genotypisiert. Die beobachtete Häufigkeit der SNVs in *SIGMAR1* und *AGTR2* innerhalb der Gruppe der gesunden Kontrollen und der neuropathischen Schmerzpatienten sowie die im Rahmen des 1000 Genome-Projekts⁷³ beschriebene Häufigkeit ist in Tabelle 5 aufgeführt. Des Weiteren sind die mittels Chi-Quadrat Test ermittelten Unterschiede in der Allelverteilung zwischen den einzelnen Gruppen aufgelistet. Es wurden keine Unterschiede zwischen den beobachteten Häufigkeiten der einzelnen Polymorphismen zwischen Patienten und Kontrollen und der beschriebenen Häufigkeit aus dem 1000 Genome-Projekt⁷³ detektiert. Die Allelfrequenzen aller untersuchten SNVs in *SIGMAR1* und *AGTR2* lagen sowohl bei den gesunden Kontrollen als auch bei den Patienten im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 5 Häufigkeiten der *single nucleotide variants* (SNV) im *SIGMAR1*- und *AGTR2*-Gen bei gesunden Kontrollen, neuropathischen Schmerzpatienten und gemäß dem 1000 Genome-Projekt

HGVS-Name	MAF in der Kontrollgruppe	MAF in der Gruppe neuropathischer Schmerzpatienten	MAF im 1000 Genome-Projekt ^a	Patienten vs. Kontrollen ^b	Kontrollen vs. 1000 Genome-Projekt ^b	Patienten vs. 1000 Genome-Projekt ^b
<i>SIGMAR1</i>						
-297G>T (rs10814130)	15,06	16,45	14,81	n.s.	n.s.	n.s.
-296C>T (rs1799729)	15,32	16,67	14,81	n.s.	n.s.	n.s.
445+400A>G (rs7865100)	48,99	48,25	46,52	n.s.	n.s.	n.s.
5A>C (rs1800866)	11,29	10,09	15,21	n.s.	n.s.	n.s.
446-42C>T (rs11559048)	1,01	0,44	0,20	n.s.	n.s.	n.s.
<i>AGTR2</i>						
199G>T (rs5193)	24,25	29,34	21,87	n.s.	n.s.	n.s.
205G>A (rs5194)	52,83	47,93	45,13	n.s.	n.s.	n.s.
501C>A (rs11091046)	51,80	47,11	45,13	n.s.	n.s.	n.s.
-95-29A>G (rs1403543)	53,29	49,17	57,06	n.s.	n.s.	n.s.

Angabe der Häufigkeiten in Prozent. Für die Polymorphismen in *AGTR2* wurden nur die weibliche Kontroll- bzw. Patientengruppe betrachtet. HGVS, *Human Genome Variation Society*; MAF, *minor allele frequency*; *SIGMAR1*, Sigma-1-Rezeptor; *AGTR2*, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2

^a Allelfrequenz basierend auf der *European super population* im 1000 Genome-Projekt⁷³ (Stand:

12.09.2018)

^b Unterschiede in der Allelverteilung wurden mittels Chi-Quadrat Test analysiert und nach Bonferroni korrigiert.

Zur Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts der untersuchten Polymorphismen wurden mithilfe von Haploview LD Plots generiert ⁷³ (siehe Abbildung 6). Im Folgenden wurden zwei SNVs als gekoppelt angesehen, wenn $R^2 \geq 0,8$ war. *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) lag mit -296C>T (rs1799729) gekoppelt vor ($R^2 = 0,98$). Für *AGTR2* 205G>A (rs5194) wurde eine Kopplung mit -95-29A>G (rs1403543) ($R^2 = 0,92$) und mit 501C>A (rs11091046) ($R^2 = 0,94$) beobachtet und für *AGTR2* -95-29A>G (rs1403543) mit 501C>A (rs11091046) ($R^2 = 0,89$).

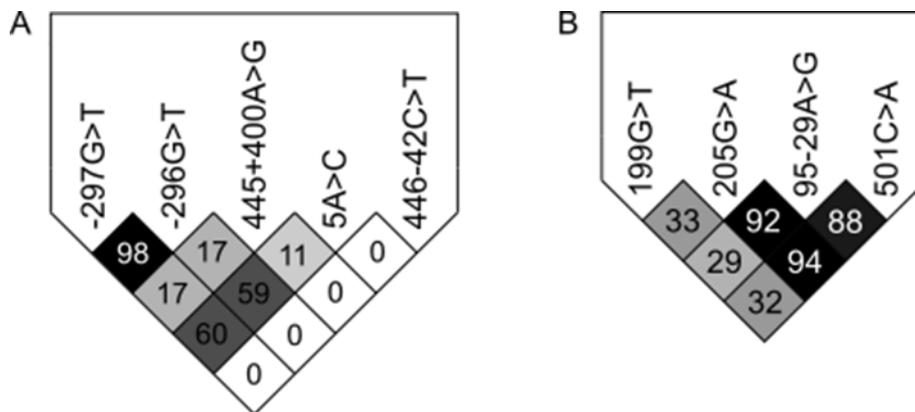


Abbildung 6 Linkage disequilibrium (LD) Plots für die single nucleotide variants (SNVs) in *SIGMAR1* (A) und in *AGTR2* (B).

SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) lag mit -296C>T (rs1799729) gekoppelt vor ($R^2 = 0,98$) und *AGTR2* 199G>T (rs5193) mit 501C>A (rs11091046) ($R^2 = 0,94$) und mit -95-29A>G (rs1403543) ($R^2 = 0,92$) sowie 501C>A (rs11091046) mit -95-29A>G (rs1403543) ($R^2 = 0,89$). Wenn $R^2 = 1$ (100%) ist, lässt sich die Varianz der abhängigen Variable vollständig durch die unabhängige Variable erklären. Wenn $R^2 = 0$ ist, besteht kein linearer Zusammenhang. Für $R^2 = 0$ wurden weiße Felder, für $R^2 = 1$ schwarze Felder und für Werte zwischen 0 und 1 Grautöne gewählt. *SIGMAR1*, Sigma-1-Rezeptor; *AGTR2*, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2.

Aufgrund der geringen Allelfrequenz (MAF = 0,01) (siehe Tabelle 5) ging *SIGMAR1* 446-42C>T (rs11559048) nicht mit in die Haplotypenanalyse mit ein.

Insgesamt wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung der SNVs zwischen den neuropathischen Schmerzpatienten und den gesunden Kontrollen im Gesamtkollektiv oder für Frauen und Männer getrennt voneinander detektiert.

3.1 Korrelationsanalyse

Die Korrelation zwischen den 13 QST-Parametern wurde mittels Korrelationsmatrix erfasst und in Form einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 7). Hieraus ergaben sich verschiedene Cluster aus korrelierenden QST-Parametern. Parameter der thermischen Detektion (CDT, WDT, TSL, $r = 0,55-0,72$; $p \ll 0,0001$) und thermischen Nozizeption (CPT, HPT, $r = 0,45$; $p \ll 0,0001$) zeigten jeweils eine starke positive Korrelation. Beide waren ebenfalls signifikant mit der Druckschmerzschwelle korreliert (PPT; $r = 0,28$ und $0,29$; $p \ll 0,0001$). HPT korrelierte zudem mit WDT und TSL ($r = 0,46$ und $0,41$; beide $p \ll 0,0001$). Die beiden Parameter der PinPrick Hyperalgesie (MPT, MPS) zeigten ebenfalls eine starke Korrelation ($r = 0,57$; $p \ll 0,0001$), wobei MPS zudem signifikant mit DMA korrelierte ($r = 0,34$; $p \ll 0,0001$). Weiterhin korrelierten die Parameter der mechanischen Detektion (MDT, VDT) signifikant ($r = 0,27$; $p < 0,0001$). Neben dieser hauptsächlich positiven Korrelation der einzelnen Parameter, korrelierte PHS negativ mit Parametern der thermischen Detektion ($r = 0,17 - 0,24$; $p < 0,01 - 0,001$) und WUR mit Parametern der mechanischen Schmerzempfindung ($r = 0,17 - 0,25$; $p < 0,01 - 0,001$).

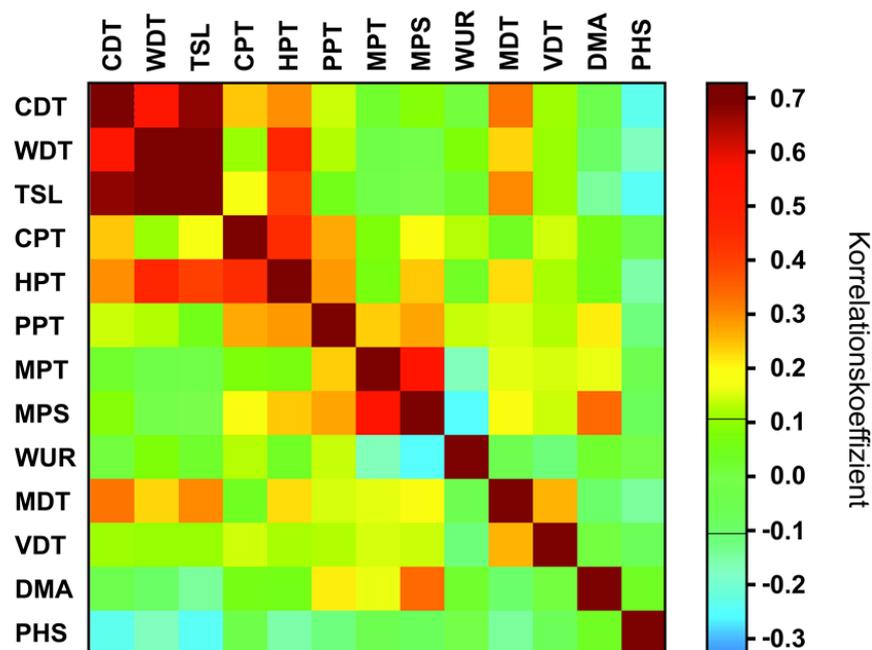


Abbildung 7 Heatmap der QST-Parameter Korrelationen.

Es ergab sich ein Cluster mit Parametern der thermischen Detektion (CDT, WDT, TSL), eines mit Parametern des thermischen Nozizeption bzw. des Druckschmerzes (CPT, HPT, PPT) sowie ein Cluster mit Parametern der mechanischen Detektion (MDT, VDT). Daneben ergab sich ein Cluster mit

Parametern des mechanischen Schmerzes (MPT, MPS), welche mit DMA korrelierten (Cluster der zentralen Sensibilisierung). Parameter der nicht nozizeptiven Wärmeempfindung (WDT, TSL) korrelierten zudem mit nozizeptiver Hitzeempfindung (HPT). Der Grad der Korrelation lässt sich anhand des Korrelationskoeffizienten bestimmen, der in der Abbildung farbkodiert dargestellt ist, mit rot bis gelb für einen positiven linearen Zusammenhang, blau für einen negativen linearen Zusammenhang und grün für einen fehlenden Zusammenhang. Die zwei schwarzen Linien im Farbkodierungsbalken geben das 0,05 Signifikanzniveau für die Größe der untersuchten Patientenkohorte an ($r = \pm 0.10945$ für $p=0.05$, $n=228$)⁷⁴. CDT, Kälteerkennungsschwelle; WDT, Wärmedetektionsschwelle; TSL, thermisch sensorisches Limen; CPT, Kälteschmerzschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzempfindlichkeit; WUR, Wind-up Ratio; MDT, mechanische Detektionsschwelle; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen.

3.2 Assoziation von *SIGMAR1*-Genvarianten mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen

Um einen möglichen Effekt von Genvarianten in *SIGMAR1* auf die Ausprägung neuropathischer Schmerzen zu ermitteln, wurde untersucht, inwiefern die ausgewählten SNVs im *SIGMAR1*-Gen mit Unterschieden in den QST-Werten assoziiert sind. Die Roh- und logarithmierten Daten sowie die Häufigkeit des Auftretens von DMA und PHS sind in Tabelle 6 für die gesamte Patientenkohorte und für Cluster 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 6. Rohdaten und logarithmierte Daten für die gesamte Patientenkohorte und für Cluster 1 und 2

	Alle Patienten (n = 228)	Cluster 1 (n = 112)	Cluster 2 (n = 116)
CDT	-6.76 [0.596 ± 0.457]	-4.35 [0.379 ± 0.444]	-9.11 [0.809 ± 0.360]
WDT	7.41 [0.712 ± 0.388]	4.79 [0.518 ± 0.373]	9.94 [0.900 ± 0.302]
TSL	14.83 [0.974 ± 0.453]	9.73 [0.765 ± 0.434]	19.76 [1.176 ± 0.374]
CPT	11.50 ± 9.97 ⁺	14.07 ± 10.36	9.01 ± 8.95
HPT	44.41 ± 6.16	42.98 ± 4.84	45.78 ± 6.97
PPT	381.19 [2.498 ± 0.277]	351.02 [2.453 ± 0.289]	410.83 [2.543 ± 0.259]
MPT	104.49 [1.690 ± 0.554]	85.38 [1.647 ± 0.507]	122.94 [1.733 ± 0.595]
MPS	6.48 [0.047 ± 0.793]	3.54 [0.104 ± 0.714]	9.32 [-0.009 ± 0.863]
WUR	3.68 [0.443 ± 0.297]	3.46 [0.413 ± 0.291]	3.89 [0.471 ± 0.300]
MDT	21.47 [0.510 ± 0.862]	5.74 [0.081 ± 0.744]	36.66 [0.925 ± 0.761]
VDT	6.44 ± 1.76	7.14 ± 0.83	5.75 ± 2.13
DMA (%)	30	21	38
PHS (%)	8	4	11

Nicht transformierte QST-Werte sind angegeben als Mittelwert der Rohdaten (für CPT, HPT und VDT ± Standardabweichung). Die Werte in [.] zeigen die Mittelwerte der logarithmierten Daten ± Standardabweichung. Für PHS und DMA ist die Häufigkeit des Auftretens angegeben (drei PHS Messun-

gen pro Patient). CDT, Kälteerkennungsschwelle; WDT, Wärmedetektionsschwelle; TSL, thermisch sensorisches Limen; CPT, Kälteschmerzschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzsensitivität; WUR, Wind-up Ratio; MDT, mechanische Detektionsschwelle; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen.

3.2.1 SIGMAR1 -297G>T (rs10814130)

Für den -297G>T (rs10814130) Polymorphismus in *SIGMAR1* unterschied sich das somatosensorische Profil von Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A; n = 67) trugen, in drei thermischen Parametern (WDT, HPT, PHS) und einem mechanischen Parameter (PPT) signifikant von Patienten, die zwei Wildtyp-Allele (CC; n = 161) trugen (Abbildung 8A). Patienten mit mindestens einem varianten Allel (A) waren im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (CC) durch eine höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; -1,41 vs. -1,03; p = 0,049), eine niedrigere Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT; -0,20 vs. 0,30; p = 0,027) und ein vermehrtes Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS; 33% vs. 19%; p = 0,020) gekennzeichnet. Darüber hinaus war das variante Allel (A) mit einer niedrigeren Sensitivität für Druckschmerz assoziiert (PPT; 0,84 vs. 1,41; p = 0,047).

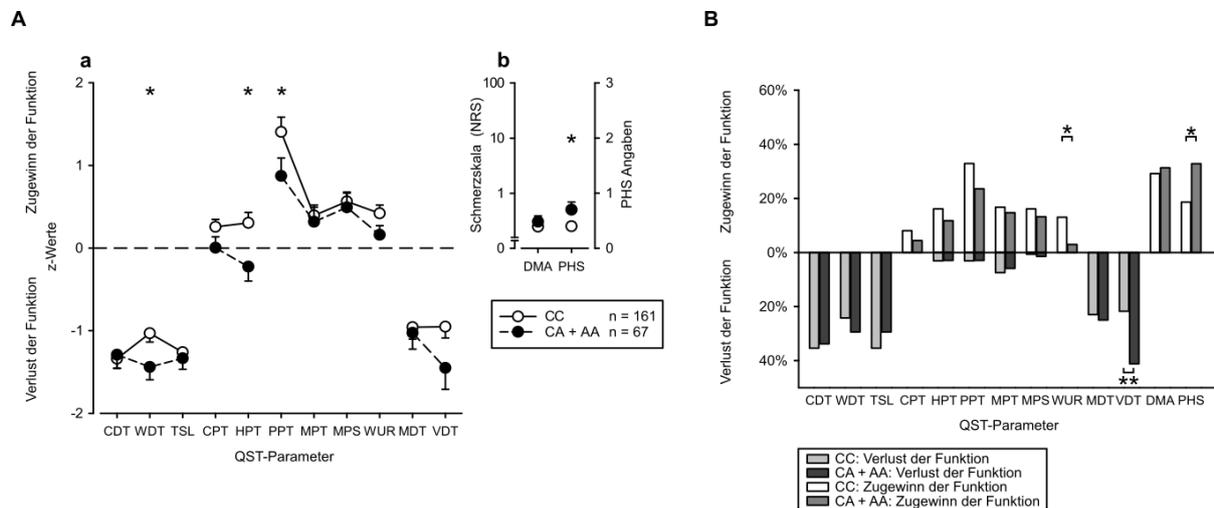


Abbildung 8 Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) sowie auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) aller neuropathischen Schmerzpatienten.

A: Das variante Allel (A; n = 67) war im Vergleich zum Wildtyp (CC; n = 161) mit einer signifikant höheren WDT, HPT und PPT sowie einem vermehrten Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen assoziiert.

B: Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A) trugen, zeigten verglichen mit Wildtyp-Trägern (CC) weniger häufig ein pathologisch gesteigertes WUR. Das variante Allel (A) führte zu einem häufigeren Auftreten einer pathologisch erhöhten VDT sowie vermehrter paradoxer Hitzeempfindungen. Das 95 % Konfidenzintervall gesunder Kontrollen liegt zwischen -1,96 und +1,96. Z-Werte über 0 zeigen einen Zugewinn der somatosensorischen Funktion und Werte unter 0 einen Funktionsverlust an.

¹¹ * $<0,05$; ** $<0,01$. NRS, numerische Rating-Skala; CDT, Kälteerkennungsschwelle; WDT, Wärmedetektionsschwelle; TSL, thermisch sensorisches Limen; CPT, Kälteschmerzschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzempfindlichkeit; WUR, Wind-up Ratio; MDT, mechanische Detektionsschwelle; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen.

In Bezug auf die Häufigkeiten pathologischer QST-Parameter zeigten sich ebenfalls zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypengruppen (Abbildung 8B). Als pathologisch wurden z-Werte kleiner oder größer als 1,96 angesehen (siehe Kapitel 2.4). Der Anteil von Patienten mit einem pathologisch gesteigerten Wind-up Phänomen (WUR) war innerhalb der Gruppe Variant-Allel-Träger (A) signifikant geringer als in der Wildtyp-Gruppe (CC; 3% vs. 13%; $p = 0,027$). Darüber hinaus entwickelten Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A) trugen, signifikant häufiger eine pathologisch erhöhte Vibrationsdetektionsschwelle (VDT) verglichen mit Trägern des Wildtyps (CC; 40% vs. 22%; $p = 0,004$).

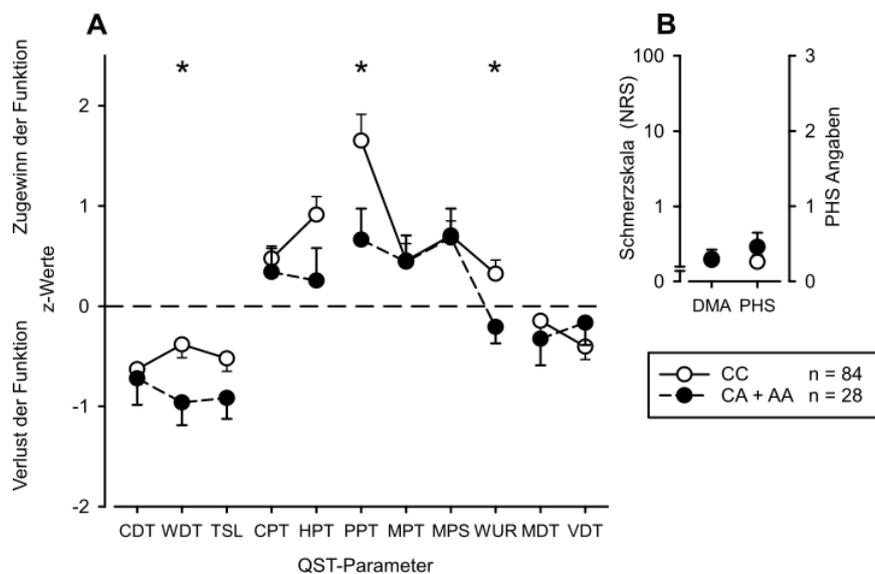


Abbildung 9 Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

Das variante Allel (A; 28) war bei Patienten aus Cluster 1 mit einer höheren WDT, einer niedrigeren Sensitivität für Druckschmerz (PPT) und weniger stark ausgeprägtem WUR gekennzeichnet verglichen mit Wildtyp-Trägern (CC; 28). * $<0,05$.

Bei Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1) bewirkte das variante Allel (A; $n = 28$) im somatosensorischen Profil ebenfalls eine höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; $-0,96$ vs. $-0,38$; $p = 0,031$) und eine niedrigere Sensitivität für Druckschmerz (PPT; $0,66$ vs. $1,65$; $p = 0,018$) sowie ein weniger stark ausgeprägtes Wind-up Phänomen (WUR; $-0,21$ vs. $0,32$; $p = 0,043$) im Ver-

gleich zu Wildtyp-Trägern (CC; n = 84; Abbildung 9). Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit pathologischer QST-Parameter zwischen den verschiedenen Genotypengruppen für Cluster 1 detektiert werden.

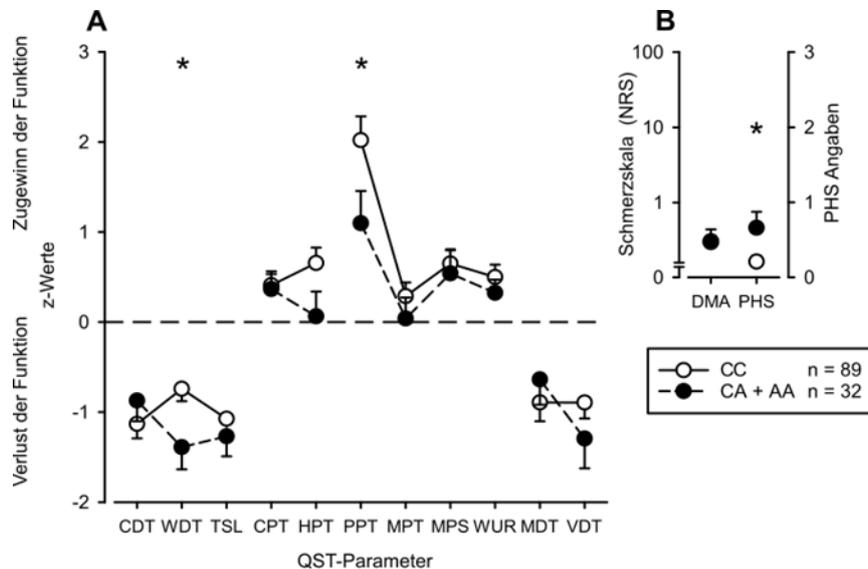


Abbildung 10 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) aller weiblichen Patienten.

Das variante Allel (A; 32) war bei weiblichen Patienten mit einer höheren WDT, einer höheren PPT und einem vermehrten Auftreten von PHS assoziiert verglichen mit Wildtyp-Trägern (CC; 89). * $<0,05$.

In einem nächsten Schritt wurde das Schmerzempfinden männlicher und weiblicher Patienten getrennt voneinander analysiert.

Weibliche Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A; n = 32) trugen, waren verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (CC; n = 89) durch eine höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; -1,33 vs. -0,74; $p = 0,032$), eine niedrigere Sensitivität für Druckschmerz (PPT; 1,04 vs. 2,02; $p = 0,049$) sowie ein vermehrtes Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS; 25% vs. 10%; $p = 0,038$) im somatosensorischen Profil gekennzeichnet (Abbildung 10). Hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung pathologischer QST-Werte zeigten sich für diese Patientengruppe, mit Ausnahme der Unterschiede in den paradoxen Hitzeempfindungen (PHS), keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypengruppen.

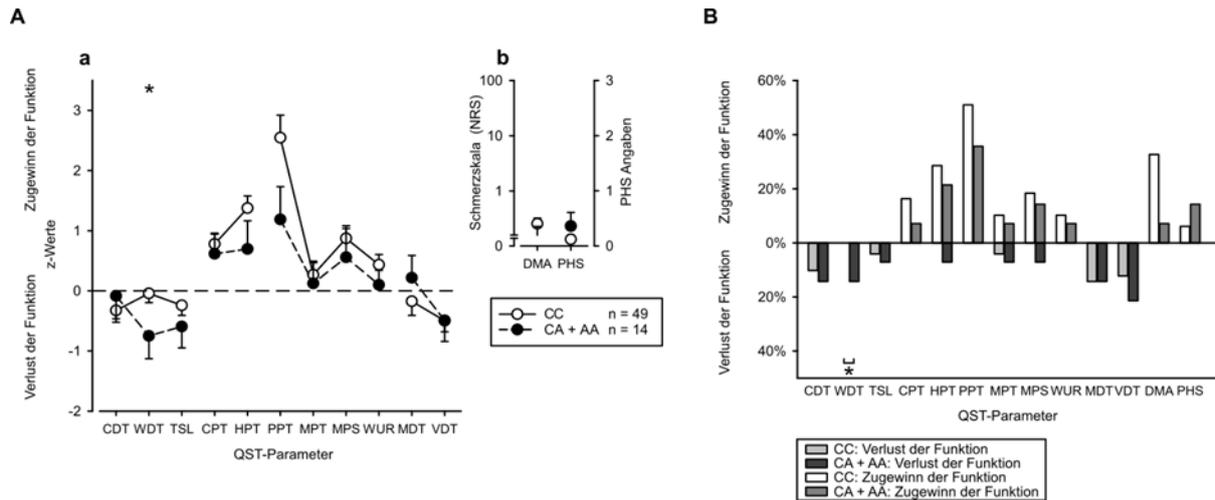


Abbildung 11 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) von weiblichen Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

A: Weibliche Patienten aus Cluster 1, die mindestens ein variantes Allel (A; n = 14) trugen, entwickelten im Vergleich zu Wildtyp-Trägerinnen (CC; n = 49) eine höhere WDT.

B: Das variante Allel (A) war bei weiblichen Patienten aus Cluster 1 im Vergleich zum Wildtyp (CC) häufiger mit einer pathologisch erhöhten WDT assoziiert. * $p < 0,05$.

Trägerinnen des varianten Allels (A; n = 14), die dem Cluster 1 zugeordnet wurden und somit eine überwiegend erhaltene somatosensorische Funktion aufwiesen, zeigten im sensorischen Profil ebenfalls eine höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; -0,75 vs. -0,04; $p = 0,048$) als Wildtyp-Trägerinnen (CC; n = 49; Abbildung 11A). Weibliche Patienten dieser Untergruppe, die mindestens ein variantes Allel (A) trugen, entwickelten sogar signifikant häufiger eine pathologisch erhöhte Wärmedetektionsschwelle (WDT; 14% vs. 0%; $p = 0,047$) verglichen mit Trägerinnen des Wildtyp-Allels (CC; Abbildung 11B).

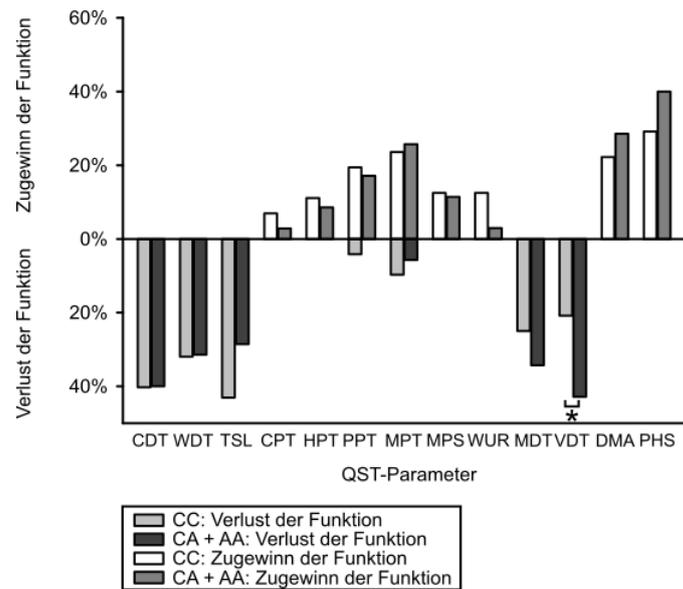


Abbildung 12 Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter aller männlichen Patienten.

Männliche Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A; n = 73) trugen, entwickelten häufiger eine pathologisch erhöhte VDT verglichen mit Wildtyp-Trägern (CC; n = 35). * $<0,05$.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen unterschied sich die Gesamtgruppe der männlichen Patienten in ihrer Genotypenverteilung im somatosensorischen Profil nicht signifikant voneinander. In Bezug auf die Häufigkeit pathologischer QST-Werte zeigten männliche Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A; n = 35) trugen, jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (CC; n = 73) signifikant häufiger eine pathologische Vibrationsdetektionsschwelle (VDT; 43% vs. 21%; $p = 0,017$; Abbildung 12).

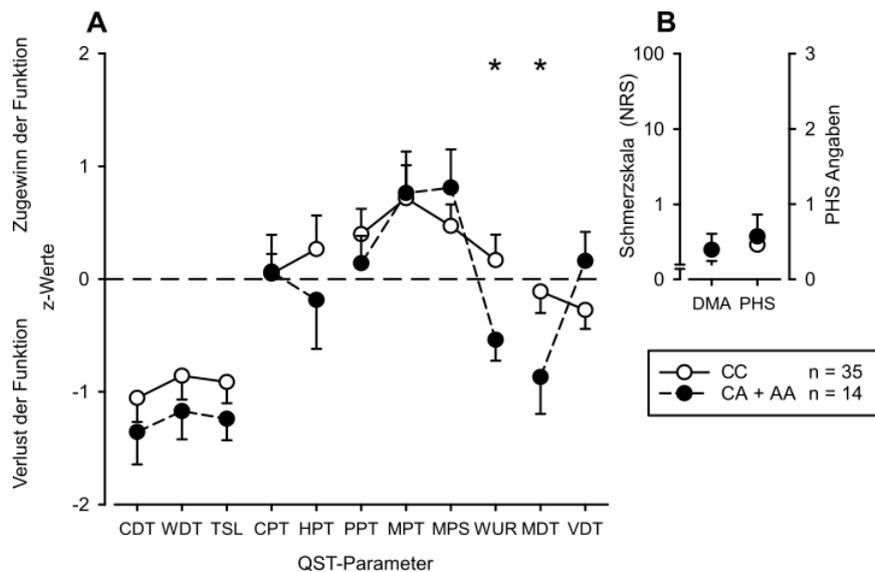


Abbildung 13 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) von männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

Männliche Patienten aus Cluster 1, die mindestens ein variantes Allel (A; n = 14) trugen, zeigten eine geringere Ausprägung der WUR und eine höhere MDT verglichen mit Wildtyp-Trägern (CC; n = 35). *<0,05.

Männliche Patienten mit überwiegend erhaltener sensorischer Funktion (Cluster 1), die mindestens ein variantes Allel (A; n = 14) trugen, entwickelten eine höhere mechanische Detektionsschwelle (MDT; -0,87 vs. -0,11; p = 0,045) im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (CC; n = 35). Das variante Allel (A) war in dieser Subgruppe mit einer geringeren Ausprägung des Wind-up Phänomens (WUR) assoziiert (-0,54 vs. 0,17; p = 0,020; Abbildung 13). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede der Häufigkeiten pathologischer QST-Werte zwischen den einzelnen Genotypen dieser Patientengruppe detektiert.

Zusammenfassend waren Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A) in -297G>T (rs10814130) trugen, im Vergleich zu Trägern des Wildtyps (CC) durch einen stärkeren Sensibilitätsverlust in thermischen (HPT, WDT) und mechanischen (PPT, VDT, WUR) Parametern gekennzeichnet und zeigten darüber hinaus ein vermehrtes Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS). Alle signifikanten Ergebnisse im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für -297G>T (rs10814130) sind im Anhang in Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführt.

3.2.2 SIGMAR1 5A>C (rs1800866)

Der zweite untersuchte 5A>C (rs1800866) SNV war bei Patienten, die mindestens ein variantes Allel (G; n = 41) trugen, im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (TT; n = 187) mit einem signifikant häufigeren Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) assoziiert (39% vs. 19%; p = 0,006; Abbildung 14).

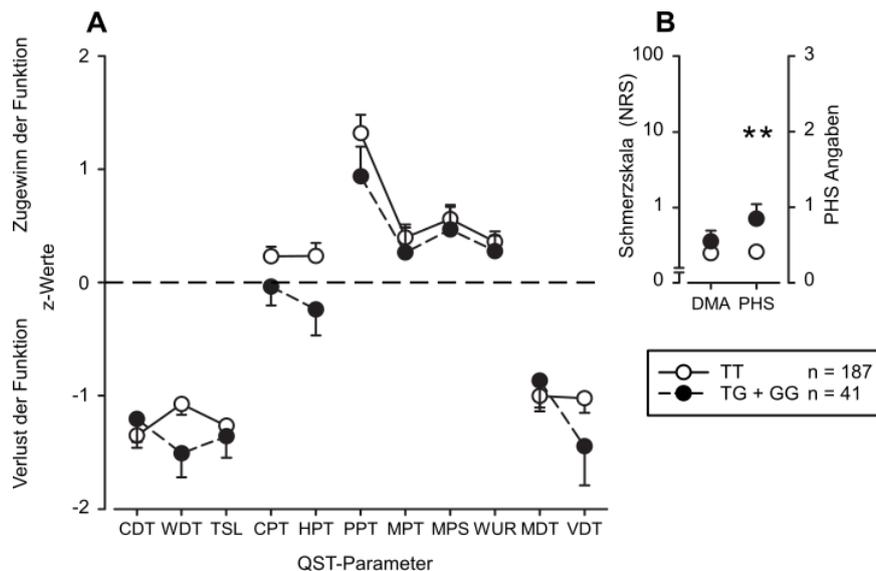


Abbildung 14 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) aller neuropathischen Schmerzpatienten. Das variante Allel (G; n = 41) war im Vergleich zum Wildtyp (TT; n = 187) mit einem vermehrten Auftreten von PHS assoziiert. **<0,01.

Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede im somatosensorischen Profil oder in der Frequenz pathologischer QST-Werte zwischen den Genotypengruppen beobachtet.

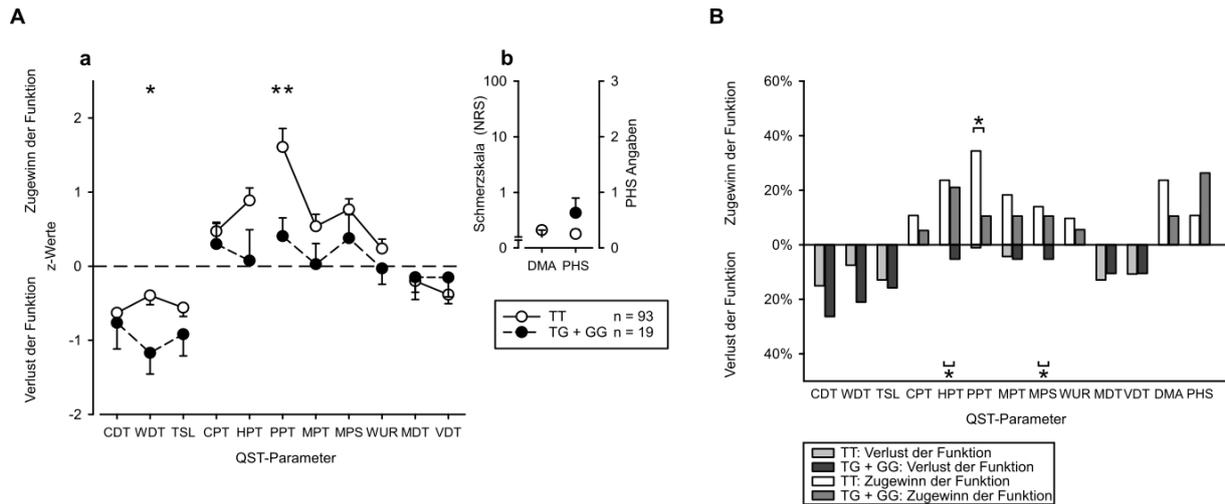


Abbildung 15 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) von Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

A: Das variante Allel (G; n = 19) war bei Patienten aus Cluster 1 im Vergleich zum Wildtyp (TT; n = 93) mit einer signifikant höheren WDT assoziiert. Patienten, die mindestens ein variantes Allel (G) trugen, reagierten weniger sensibel auf Druckschmerz.

B: Patienten aus Cluster 1, die mindestens ein variantes Allel (G; n = 19) trugen, entwickelten häufiger eine pathologisch verminderte Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT) und mechanischen Schmerz (MPS) und weniger häufig eine pathologisch gesteigerte Sensitivität für Druckschmerz (PPT) im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (TT; n = 93). * $<0,05$; ** $<0,01$.

Im somatosensorischen Profil bewirkte das variante Allel (G; n = 19) innerhalb der Gruppe der Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1) eine höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; -1,17 vs. -0,40; $p = 0,012$) und eine niedrigere Sensitivität für Druckschmerz (PPT; 0,41 vs. 1,61; $p = 0,001$) verglichen mit Wildtyp-Trägern (TT; n = 93; Abbildung 15A). Bei der Betrachtung der Häufigkeiten pathologischer QST-Werte entwickelten signifikant weniger Träger des varianten Allels (G) eine pathologisch gesteigerte Sensitivität für Druckschmerz (PPT; 11% vs. 34%; $p = 0,039$). Des Weiteren wiesen Patienten aus Cluster 1, die mindestens ein variantes Allel (G) trugen, eine pathologisch verminderte Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT; 6% vs. 0%; $p = 0,026$) sowie eine pathologische Abnahme der mechanischen Schmerzsensitivität (MPS; 6% vs. 0%; $p = 0,026$) auf. Wildtyp-Träger (TT) zeigten im Gegensatz dazu keinen pathologischen Sensitivitätsverlust in diesen beiden sensorischen Qualitäten (Abbildung 15B).

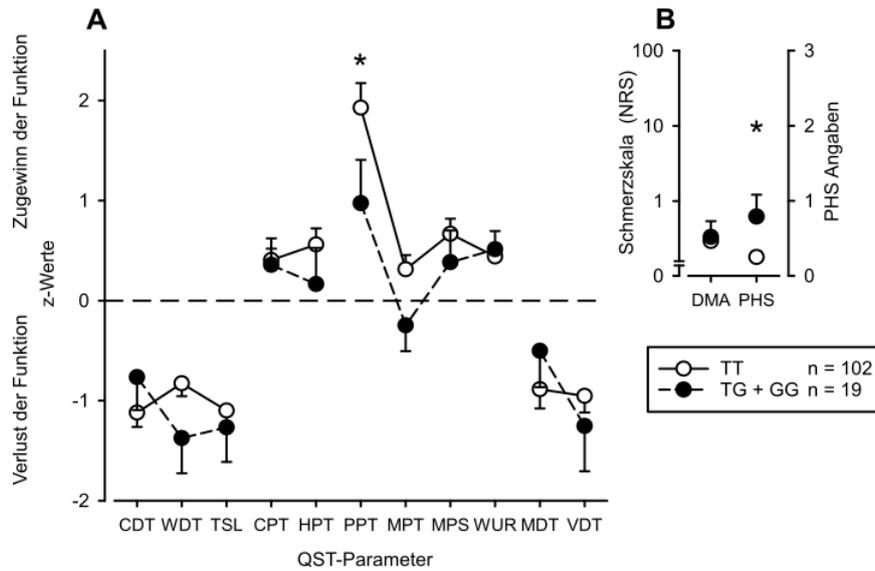


Abbildung 16 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B) aller weiblichen Patienten.

Weibliche Patienten, die mindestens ein variantes Allel (G; n = 19) trugen, zeigten eine höhere PPT und ein vermehrtes Auftreten von PHS im Vergleich zu Trägerinnen von zwei Wildtyp- Allelen (TT; n = 102). * $<0,05$.

Bei weiblichen Patienten war das variante Allel (G; n = 19) im Vergleich zum Wildtyp (TT; n = 102) mit einer signifikant niedrigeren Sensitivität für Druckschmerz (PPT; 0,87 vs. 1,92; $p = 0,045$) und einem häufigeren Auftreten paradoxer Hitzeempfindungen (PHS; 32% vs. 11%; $p = 0,017$) assoziiert. Darüber hinaus wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede im somatosensorischen Profil oder der Häufigkeit pathologischer QST-Werte beobachtet (Abbildung 16).

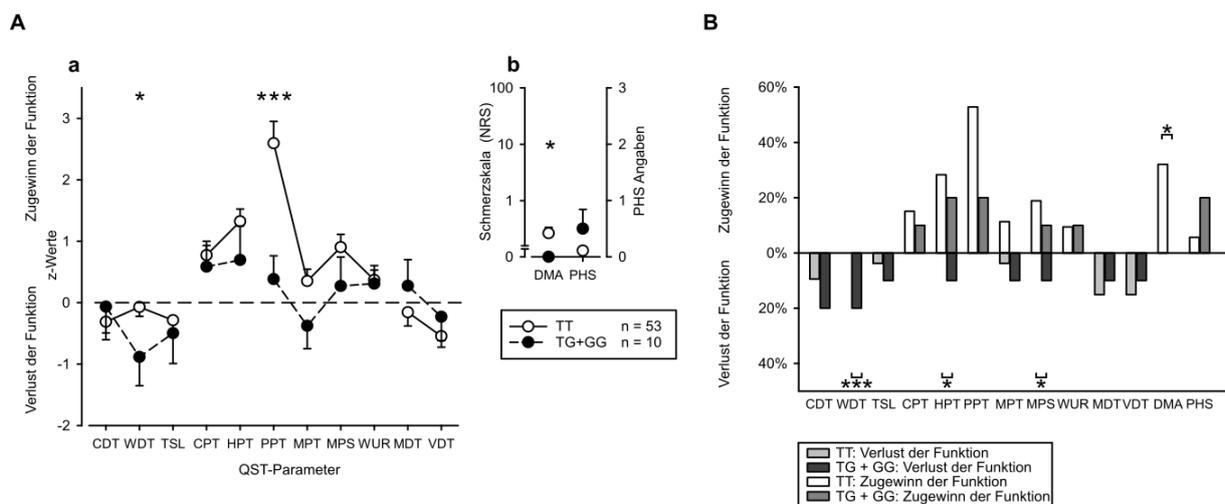


Abbildung 17 Einfluss von *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer

QST-Parameter (B) von weiblichen Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

A: Das variante Allel (G; n = 10) führte bei weiblichen Patienten aus Cluster 1 zu einer signifikant höheren WDT und PPT verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (TT; n = 53). Weibliche Patienten, die mindestens ein variantes Allel (G) trugen, entwickelten im Gegensatz zu Wildtyp-Trägerinnen (TT) keine DMA.

B: Weibliche Patienten aus Cluster 1 mit mindestens einem varianten Allel (G; n = 10) zeigten häufiger eine pathologisch erhöhte WDT, HPT und MPS und weniger häufig DMA verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (TT; n = 53). * <0.05 ; *** <0.001 .

Bei der Betrachtung weiblicher Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1) wurden die Unterschiede im somatosensorischen Profil noch deutlicher (Abbildung 17A). Weibliche Patienten dieser Subgruppe, die mindestens ein variantes Allel (G; n = 10) trugen, zeigten eine signifikant höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; -0,88 vs. -0,07; $p = 0,046$) und eine niedrigere Sensitivität für Druckschmerz (PPT; 0,38 vs. 2,60; $p = 0,0002$) verglichen mit Trägerinnen von zwei Wildtyp-Allelen (TT; n = 53). Außerdem entwickelten Trägerinnen des varianten Allels (G) anders als Wildtyp-Patientinnen (TT) keine pathologischen Werte bei der Messung der dynamisch mechanischen Allodynie (DMA; 0% vs. 32%; $p = 0,036$). Darüber hinaus zeigten sich für weibliche Patienten des Cluster 1 weitere Unterschiede in der Häufigkeit pathologischer QST-Parameter zwischen den beiden Genotypengruppen. Das variante Allel (G) war mit einer pathologisch verminderten Wärmeempfindung (WDT; 20% vs. 0%; $p = 0,001$), einer pathologisch verminderten Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT; 10% vs. 0%; $p = 0,020$) und für mechanische Schmerz (MPS; 10% vs. 0%; $p = 0,020$) assoziiert. Trägerinnen des Wildtyps (TT) zeigten in diesen drei Qualitäten hingegen keinen pathologischen Sensitivitätsverlust (Abbildung 17B).

Die Betrachtung männlicher Patienten ergab im Gegensatz zu den weiblichen Patienten weder im somatosensorischen Profil noch in Bezug auf die Häufigkeitsverteilung pathologischer QST-Parameter signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypengruppen.

Zusammenfassend waren insbesondere Patienten mit überwiegendem Erhalt der somatosensorischen Funktion (Cluster 1), die das variante Allel (G) von 5A>C (rs1800866) trugen, mit einem ausgeprägteren und zum Teil pathologischen Sensitivitätsverlust in einigen thermischen (WDT, HPT) und mechanischen (PPT, MPS) Parametern gekennzeichnet. Diese Unterschiede zeigten sich auch für die Gruppe weiblicher Patienten, wohingegen bei männlichen Patienten keine signifikanten Un-

terschiede detektiert werden konnten. Alle signifikanten Ergebnisse für 5A>C (rs1800866) sind im Anhang in Tabelle 11 aufgeführt.

3.2.3 SIGMAR1 445+400A>G (rs7865100)

Für 445+400A>G (rs7865100) zeigte sich im Gegensatz zu -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) nur bei der geschlechterabhängigen Untersuchung eine Assoziation mit Veränderungen im somatosensorischen Profil und mit der Häufigkeit pathologischer QST-Werte (Anhang, Tabelle 12).

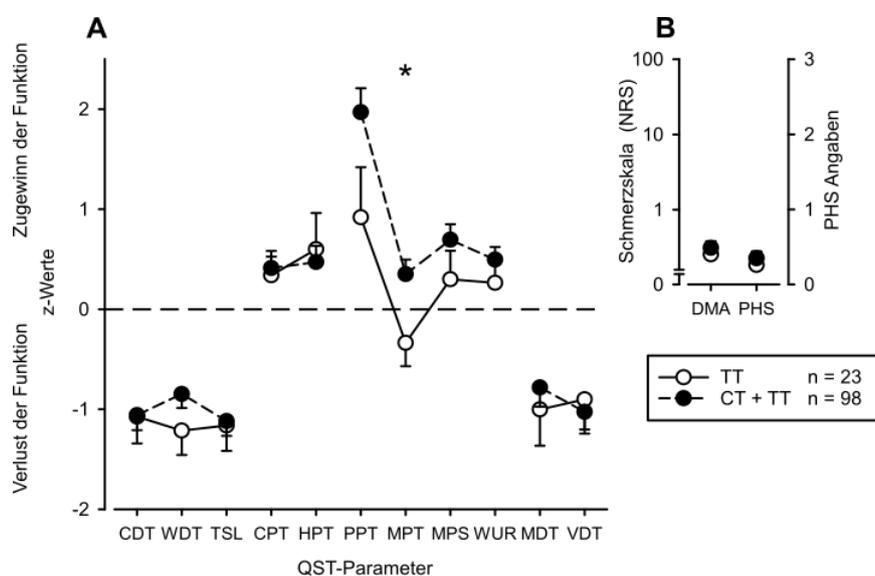


Abbildung 18 Einfluss von SIGMAR1 445+400A>G (rs7865100) auf das somatosensorische Profil mit z-transformierten QST-Werten (A) und der Häufigkeit von dynamischer mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (B).

A: Weibliche Patienten, die zwei Wildtyp-Allele (TT; n = 23) trugen, zeigten eine niedrigere Sensitivität für mechanischen Schmerz (MPT) im Vergleich zu Trägerinnen des varianten Allels (C; n = 98).

Weibliche Wildtyp-Träger (TT; n = 23) waren im somatosensorischen Profil durch einen Sensibilitätsverlust für mechanischen Schmerz gekennzeichnet, während Trägerinnen von mindestens einem varianten Allel (C; n = 98) ein gesteigertes mechanisches Schmerzempfinden zeigten (MPT; -0,34 vs. 0,37; p = 0,029; Abbildung 18). Im Hinblick auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede für die beiden Genotypengruppen.

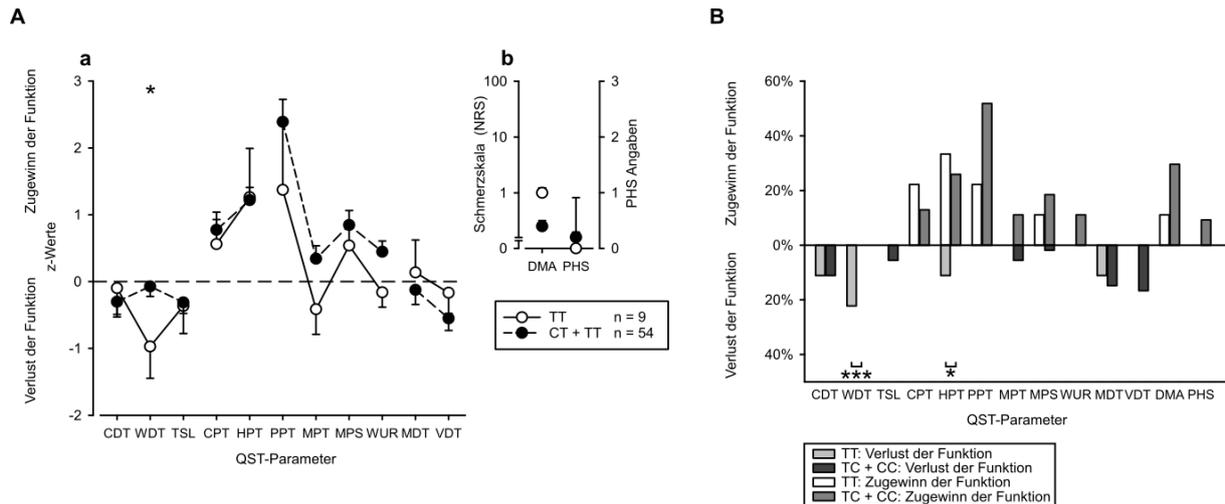


Abbildung 19 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamischer mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) von weiblichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1.)

A: Weibliche Patienten aus Cluster 1, die zwei Wildtyp-Allele (TT; n = 9) trugen, zeigten im Vergleich zu Trägerinnen der Variante (C; n = 54) eine höhere WDT.

B: Trägerinnen von zwei Wildtyp-Allelen (TT) entwickelten im Vergleich zu Trägern der Variante (C) signifikant häufiger eine pathologisch erhöhte WDT und eine pathologisch verminderte Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT). *<0,05; ***<0,001.

Weibliche Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1), die zwei Wildtyp-Allele (TT; n = 9) trugen, zeigten eine höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT; -0,97 vs. -0,07; p = 0,034) im somatosensorischen Profil, die sogar signifikant häufiger pathologisch erhöht war (22% vs. 0%; p = 0,0004), verglichen mit Trägerinnen des varianten Allels (C; n = 54). Außerdem bewirkte der Wildtyp (TT) bei Frauen aus Cluster 1 im Gegensatz zum varianten Allel (C) einen pathologischen Verlust der Sensibilität für Hitzeschmerz (HPT; 11% vs. 0%; p = 0,014; Abbildung 19).

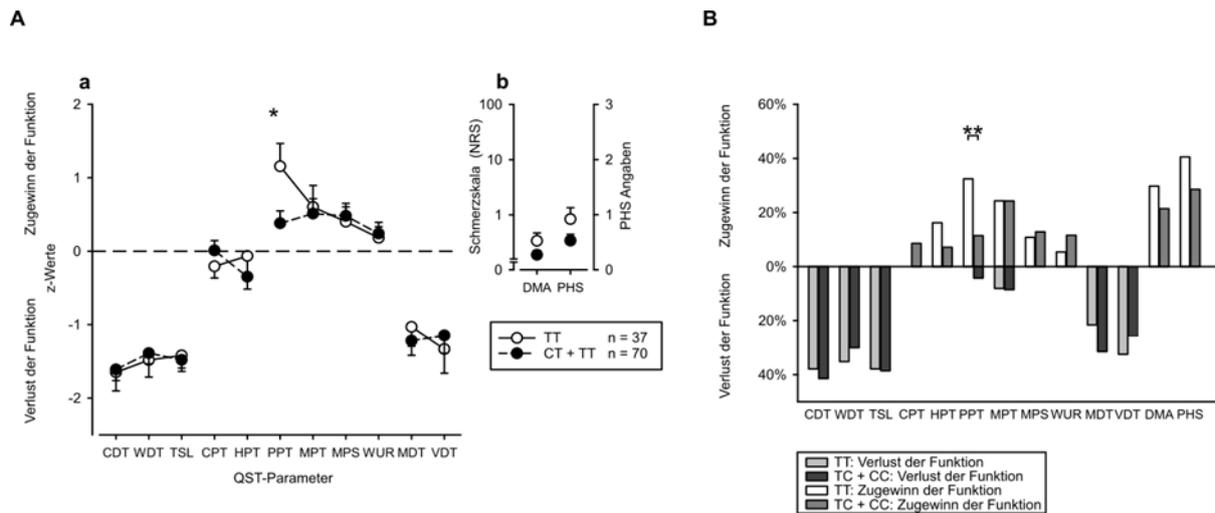


Abbildung 20 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) aller männlichen Patienten.

A: Männliche Träger zweier Wildtyp-Allele (TT; n = 37) zeigten eine höhere Sensitivität für Druckschmerz (PPT) verglichen mit Trägern der Variante (C; n = 70).

B: Der Wildtyp (TT) führte im Vergleich zur Variante (C) häufiger zu einer pathologisch gesteigerten Sensitivität für Druckschmerz (PPT). * $<0,05$; ** $<0,01$.

Für die Gruppe der männlichen Patienten wurden konträre Ergebnisse beobachtet. Männliche Träger des Wildtyps (TT; n = 37) zeigten bei der Betrachtung des somatosensorischen Profils eine höhere Sensitivität für Druckschmerz (PPT) im Vergleich zu Trägern von mindestens einem varianten Allel (C; n = 70; 1,16 vs. 0,38; $p = 0,032$; Abbildung 20A). Mit einem Anteil von etwa 32% entwickelten männliche Träger des Wildtyps (TT) sogar signifikant häufiger eine pathologisch erhöhte Sensitivität für Druckschmerz (PPT) als Träger des varianten Allels (C; 11%; $p = 0,008$; Abbildung 20B).

Für die Subgruppe der männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1) konnten zwar keine signifikanten Unterschiede im somatosensorischen Profil zwischen den einzelnen Genotypengruppen festgestellt werden, allerdings war der Wildtyp (TT; n = 17) im Vergleich zur Variante (C; n = 32) bei dieser Patientengruppe signifikant häufiger mit einer pathologisch gesteigerten Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT) assoziiert (35% vs. 9%; $p = 0,026$; Abbildung 21).

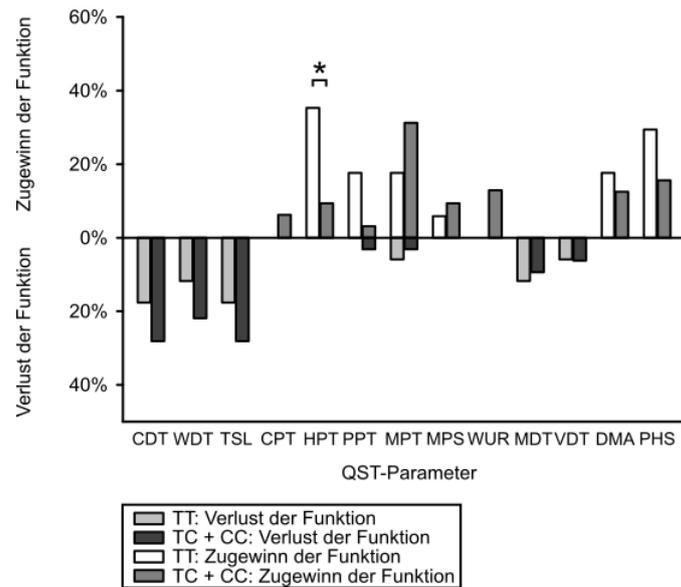


Abbildung 21 Einfluss von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter von männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1).

Träger zweier Wildtyp-Allele (TT; n = 17) zeigten häufiger eine pathologisch erhöhte Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT) verglichen mit Trägern der Variante (C; n = 32). * $<0,05$.

Zusammenfassend führte der Wildtyp (TT) in 445+400A>G (rs7865100) zu unterschiedlichen, zum Teil konträren, Ergebnissen für weibliche und männliche Patienten. Insbesondere weibliche Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1), die zwei Wildtyp-Allele (TT) trugen, reagierten im Vergleich zu Trägerinnen von mindestens einer Variante (C) weniger sensibel auf einige thermische Reize (WDT, HPT). Im Gegensatz dazu zeigten männliche Wildtyp-Träger (TT) eine stärkere Schmerzempfindlichkeit für Druck und Hitze (PPT, HPT) als Träger von mindestens einem varianten Allel (C).

3.2.4 Haplotypenanalyse und logistische Regression

Die Haplotypenanalyse wurde nur für die Genotypenkombination von *SIGMAR1* - 297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) durchgeführt, da die Auswertung von 445+400A>G (rs7865100) für Männer und Frauen gegensätzliche Ergebnisse zeigte. Hierfür wurden Träger von mindestens einem varianten Allel in beiden SNVs (CA + AA und TG + GG) zu einer Gruppe zusammengefasst und Wildtyp-Träger beider SNVs (CC und TT) zu einer anderen. Dabei konnten ähnliche Ergebnisse wie für die getrennte Analyse der beiden SNVs beobachtet werden (Anhang, Tabelle 13). In der Gesamtgruppe der Patienten waren die varianten Allele (n = 161) mit einem signifi-

kant häufigeren Auftreten paradoxer Hitzeempfindungen (PHS) gekennzeichnet verglichen mit dem Wildtyp (n = 41; 39% vs. 19%; p = 0,005). Es wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede im somatosensorischen Profil oder der Häufigkeit pathologischer QST-Parameter detektiert. Im Gegensatz dazu waren die varianten Allele bei Patienten aus Cluster 1 (n = 19) im Vergleich zum Wildtyp (n = 84) mit einer höheren Wärmedetektionsschwelle (WDT; -1,17 vs. -0,38; p = 0,013) und einer niedrigeren Sensitivität für Druckschmerz (PPT; 0,41 vs. 1,65; p = 0,001) im somatosensorischen Profil assoziiert. Des Weiteren führten die varianten Allele zu einem gehäuf- ten Auftreten einer pathologisch verminderten Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT; 5% vs. 0%; p = 0,035) und mechanischen Schmerz (MPS; 5% vs. 0%; p = 0,035) sowie einem selteneren Auftreten einer pathologisch erhöhten Sensitivität für Druck- schmerz (PPT; 11% vs. 35%; p = 0,039).

Die logistische Regressionsanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss von -297G>T (rs10814130) auf die Vibrationsdetektionsschwelle (VDT), wonach das variante Allel (A) mit einem im Vergleich zum Wildtyp (CC) etwa 3fach erhöhten Risiko zur Ent- wicklung einer pathologischen Hyposensitivität für Vibration (VDT) assoziiert war (p = 0,015). Zudem scheinen die einzelnen Krankheitsentitäten und das Geschlecht einen Einfluss auf einzelne QST-Parameter zu haben. Die signifikanten Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse sind im Anhang in Tabelle 14 aufgeführt.

3.2.5 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Mittels PCA konnten 12 der 13 QST-Parameter (mit Ausnahme von PHS) entspre- chend des Scree-Kriteriums (Eigenwerte >1) vier somatosensorischen Hauptkompo- nenten (*principal components*, PC) zugeordnet werden, durch die insgesamt 59% der Unterschiede erklären werden konnten (Tabelle 7). Die erste Hauptkomponente (PC1) umfasste alle thermischen Detektionsparameter (CDT, WDT, TSL) und erklärt 20,4% der Varianz. PC2 (15,2% der Varianz) war definiert durch Parameter der punktuellen mechanischen Nozizeption (MPT, MPS) und DMA. PC3 (13,1% der Va- rianz) umfasste Parameter der thermischen Nozizeption, Schmerzen infolge von stumpfem Druck und temporale Summation (CPT, HPT, PPT, WUR), während PC4 (10,3% der Varianz) durch Parameter der mechanischen Detektion (MDT, VDT) cha- rakterisiert war.

Tabelle 7 Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit Faktorladungen der 13 QST-Parameter für die vier Hauptkomponenten (PC1-4).

QST-Parameter	PC1	PC2	PC3	PC4
CDT	0.7938*	0.0185	0.1292	0.1129
WDT	0.8201*	-0.0995	0.1629	0.0329
TSL	0.8823*	-0.1098	0.0917	0.1142
CPT	0.0995	0.0566	0.7337*	0.1800
HPT	0.4743	0.1380	0.5450*	0.1259
PPT	0.0672	0.3492	0.6088*	0.0514
MPT	0.1264	0.7655*	-0.0053	0.1641
MPS	0.0707	0.8564*	0.1216	0.1117
WUR	-0.0365	-0.3886	0.5620*	-0.2869
MDT	0.3643	0.1544	0.0130	0.5681*
VDT	-0.0329	0.0825	0.1784	0.8087*
PHS	-0.4244	-0.1107	0.0542	-0.0068
DMA	-0.1247	0.5450*	0.2835	-0.3976
% der erklärten Varianz	20.4%	15.2%	13.1%	10.3%
Interpretation	Thermische Detektion	Mechanische Hyperalgesie	Thermische Nozizeption/ Druckschmerzhyperalgesie	Mechanische Detektion

Um Teil einer Hauptkomponente zu sein, wurden nur QST-Werte mit einer Faktorladung $\geq 0,50$ akzeptiert.

Thermische Detektion (PC1)

Für -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) konnte ein signifikanter Einfluss auf Parameter der thermischen Detektion (CDT, WDT, TSL) für Cluster 1 vs. Cluster 2 gezeigt werden ($p < 0,0001$). In der Gesamtkohorte der Patienten wurde für die beiden SNVs kein signifikanter Einfluss auf PC1 detektiert. Allerdings zeigte sich eine signifikante Interaktion von Clustern und Genotypen (-297G>T (rs10814130), $p = 0,026$; 5A>C (rs1800866), $p = 0,047$). Homozygote Wildtyp-Träger von -297G>T (rs10814130) aus Cluster 1 waren im Vergleich zu Cluster 2 mit einem weniger ausgeprägten somatosensorischen Verlust der thermischen Detektion assoziiert (-0,51 vs. -1,97, $p < 0,0001$). Diese Unterschiede waren nur etwa halb so groß bei Trägern der Variante (-0,87 vs. -1,68, $p < 0,005$; Abbildung 22A). Ähnliche Ergebnisse konnten für 5A>C (rs1800866) beobachtet werden (Abbildung 22B). Die Haplotypenanalyse ergab hingegen keine signifikanten Unterschiede, sondern lediglich einen Trend ($p < 0,10$) für die verschiedenen Genotypenkombinationen. Während homozygote Wildtyp-Träger aus Cluster 1 nur eine leichte thermische Hypoästhesie zeigten (-0,512), war diese bei heterozygoten Patienten bereits ausgeprägter (-0,688) und am deutlichsten bei homozygoten Trägern der Variante mit signifikantem Trend im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (-0,952, $p = 0,08$; Abbildung 22C).

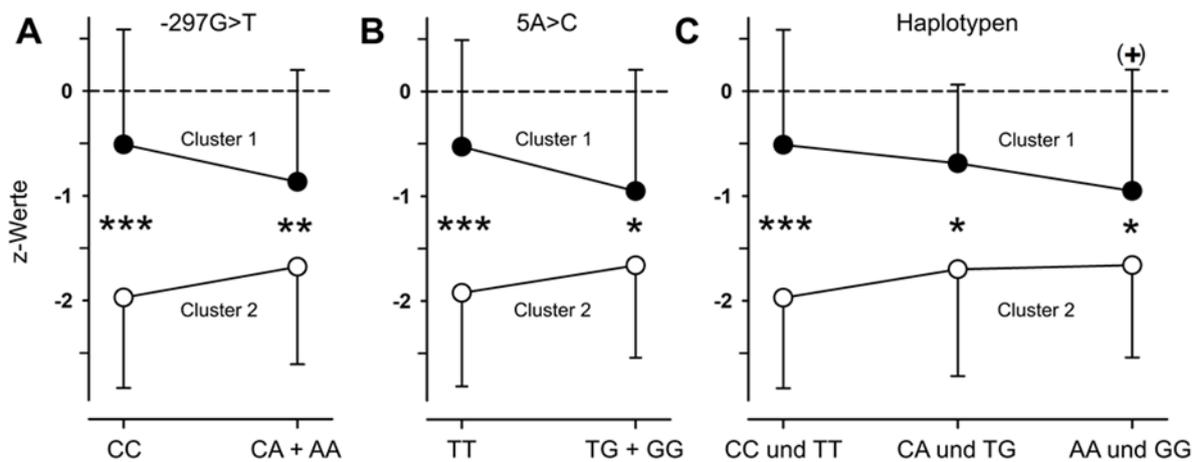


Abbildung 22 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der thermischen Detektion (PC1) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).

A: Das -297G>T (rs10814130) variante Allel (n = 28) führte in Cluster 1 zu einem stärkeren Verlust der thermischen Detektion im Vergleich zum Wildtyp (n = 84).

B: Für 5A>C (rs1800866) zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie für -297G>T (rs10814130).

C: Die Haplotypenanalyse ergab für homozygote Wildtyp-Träger (n = 84) aus Cluster 1 nur eine leichte thermische Hypoästhesie, während diese bei heterozygoten Patienten bereits ausgeprägter und am deutlichsten bei homozygoten Trägern der Variante war.

Bonferroni korrigierte p-Werte mit * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,0001$ (Cluster 1 vs. Cluster 2); (+) $<0,10$ für homozygoter Wildtyp vs. homozygote Variante. Modifiziert nach Sachau *et al.* ⁷⁴.

Thermische Nozizeption/Druckschmerzhyperalgesie (PC3)

Die Analyse der thermischen Nozizeption und Druckschmerzhyperalgesie (PC3) ergab andere Ergebnisse. Für -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) wurde ein weniger starker Einfluss auf Parameter der thermischen Nozizeption und Druckschmerzhyperalgesie (CPT, HPT, PPT, WUR) für Cluster 1 vs. Cluster 2 beobachtet ($p = 0,0015$). Während -297G>T einen signifikanten Einfluss auf PC3 hatte ($p = 0,021$), wurde keine signifikante Cluster-Genotypen-Interaktion detektiert. Wildtyp-Träger und Träger der Variante von -297G>T (rs10814130) unterschieden sich signifikant in Cluster 1 (+0,84 vs. +0,27, $p = 0,007$) aber nicht in Cluster 2 (Abbildung 23A). Ähnliche Effekte wurden für 5A>C (rs1800866) beobachtet (Abbildung 23B). Die Haplotypenanalyse ergab deutlichere Unterschiede für Patienten aus Cluster 1. Homozygote Wildtyp-Träger zeigten eine thermische Hyperalgesie, während Heterozygote und homozygote Träger der Variante nur durch eine leicht gesteigerte Hyperalgesie charakterisiert waren (für das dominante Modell $p = 0,009$). Für Cluster 2 Patienten zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23C).

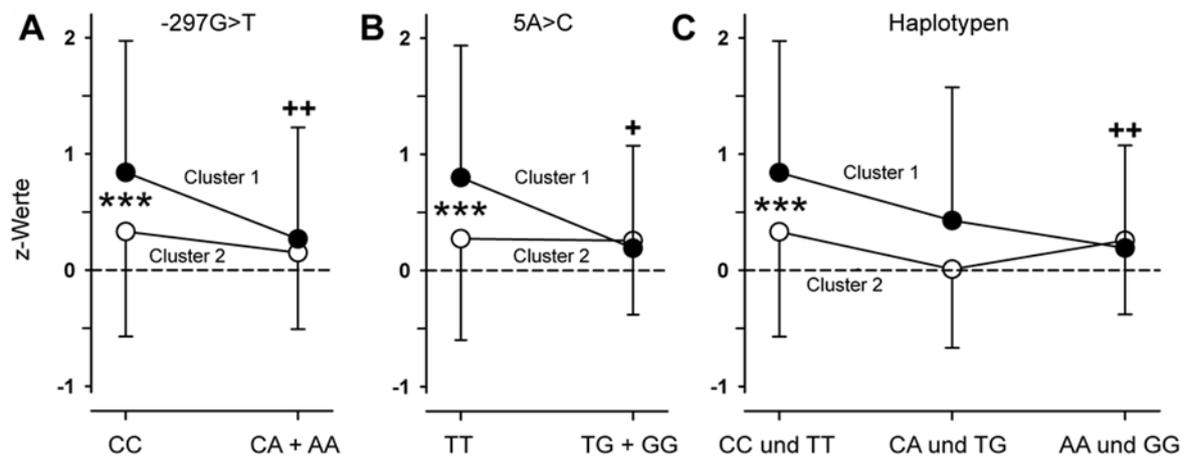


Abbildung 23 Einfluss von SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der thermischen Nozizeption/Druckschmerzhyperalgesie (PC3) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).

Träger des -297G>T (rs10814130) oder 5A>C (rs1800866) varianten Allels (n = 28 oder n = 18) aus Cluster 1 zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (n = 84 oder n = 93) einen Verlust der thermischen/Druckschmerzhyperalgesie (A, B). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Haplotypen (C).

Bonferroni korrigierte p-Werte mit ***<0,0001 (Cluster 1 vs. Cluster 2); +<0,05; ++<0,01 für homozygoter Wildtyp vs. Variante (A, B) oder homozygoter Wildtyp vs. homozygote Variante (C). Modifiziert nach Sachau *et al.* ⁷⁴.

Mechanische Detektion und mechanische Nozizeption (PC4 und PC2)

Für -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) konnte ein signifikanter Einfluss von Cluster 1 vs. Cluster 2 auf Parameter der mechanischen Detektion (PC4; MDT, VDT) beobachtet werden ($p < 0,0001$; Abbildung 24). In der Gesamtkohorte der Patienten wurde keine Assoziation der SNVs mit PC4 beobachtet. Für PC2 (MPT, MPS, DMA) wurden weder signifikante Effekte für die zwei Cluster noch für die Genotypen detektiert (Abbildung 25). Die Post-hoc-Analyse zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Trägern und Trägern der Variante für PC2 und PC4.

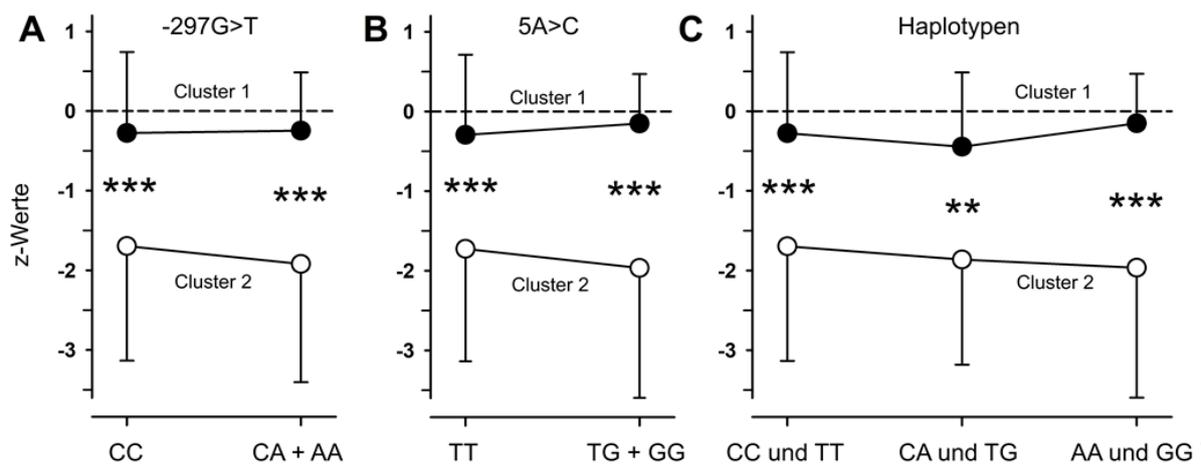


Abbildung 24 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der mechanischen Detektion (PC4) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).

Cluster 2 war durch einen Verlust der mechanischen Detektion charakterisiert, wohingegen Cluster 1 Patienten eine annähernd normale mechanische Detektionsschwelle zeigten. Es konnte kein Einfluss der beiden -297G>T (rs10814130) (A) und 5A>C (rs1800866) (B) Genotypen oder der Haplotypen (C) auf PC4 detektiert werden. Bonferroni korrigierte p-Werte mit **<0,01; ***<0,0001 (Cluster 1 vs. Cluster 2). Modifiziert nach Sachau et al. ⁷⁴.

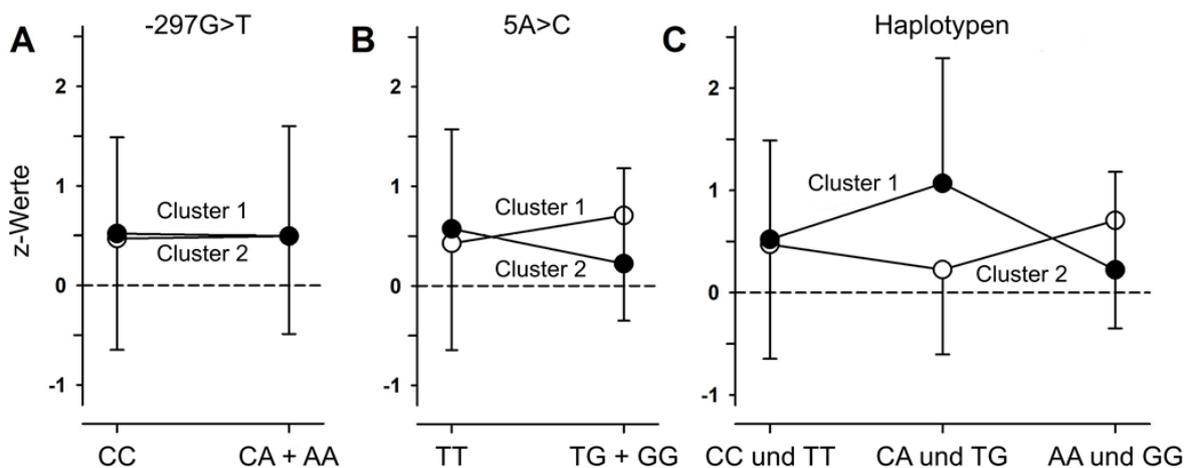


Abbildung 25 Einfluss von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) und deren Haplotypen auf die Hauptkomponente mit Parametern der mechanischen Hyperalgesie (PC2) von Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster1) und Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2).

Beide Cluster waren durch eine mechanische Hyperalgesie gekennzeichnet, ohne einen signifikanten Unterschied. Zudem konnte kein Einfluss der genetischen Varianten auf PC2 detektiert werden.

3.3 Assoziation von *AGTR2*-Genvarianten mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen

Bei der Auswertung der Ergebnisse für die Polymorphismen im *AGTR2*-Gen wurden beide Geschlechter getrennt voneinander betrachtet (siehe Kapitel 2.4).

3.3.1 *AGTR2* 199G>T (rs5193)

Für den 199G>T (rs5193) Polymorphismus wurden keine signifikanten genotypenbedingten Unterschiede im somatosensorischen Profil innerhalb der Gesamtgruppe der weiblichen Patienten sowie innerhalb der Gruppe weiblicher Patienten mit überwiegend erhaltener sensorischer Funktion (Cluster 1) beobachtet. Allerdings waren weibliche Patienten, die mindestens ein variantes Allel (T; n = 60) trugen, verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (GG; n = 61) signifikant häufiger durch eine pathologisch gesteigerte Sensitivität für Kälteschmerz (CPT; 15% vs. 2%; p = 0,008) und für mechanischen Schmerz (MPS; 27% vs. 10%; p = 0,016) gekennzeichnet (Abbildung 26).

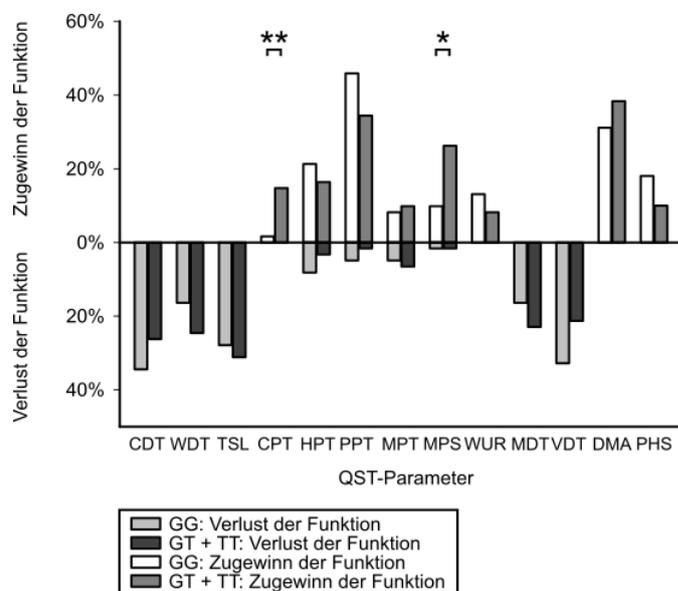


Abbildung 26 Einfluss von *AGTR2* 199G>T (rs5193) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter aller weiblichen Patienten.

Das variante Allel (T; n = 60) war verglichen mit dem Wildtyp (GG; n = 61) signifikant häufiger mit einer pathologisch gesteigerten Sensitivität für Kälteschmerz (CPT) und für mechanischen Schmerz (MPS) assoziiert. *<0,05; **<0,01.

Bei weiblichen Patienten aus Cluster 1 war das variante Allel (T; n = 29) im Vergleich zum Wildtyp (GG; n = 34) ebenfalls häufiger mit einer pathologisch gesteigerten Sensitivität für Kälteschmerz (CPT; 28% vs. 3%; p = 0,009) assoziiert (Abbildung 27).

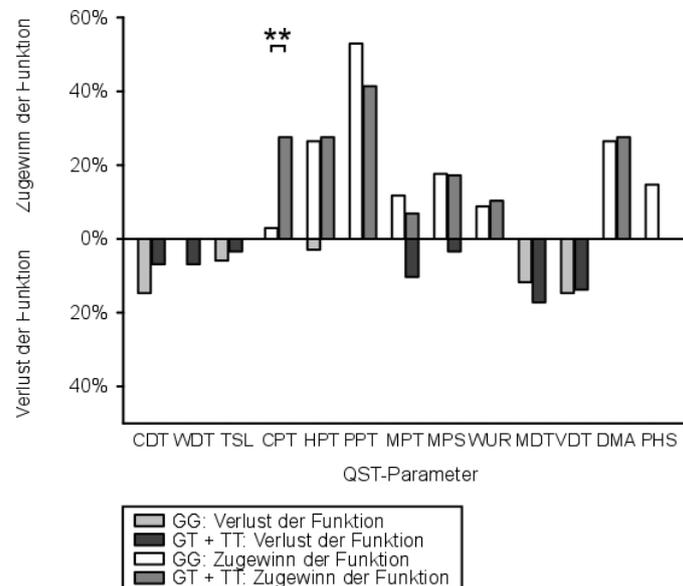


Abbildung 27 Einfluss von AGTR2 199G>T (rs5193) auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter von weiblichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

Weibliche Patienten aus Cluster 1, die mindestens ein variantes Allel (T; n = 29) trugen, zeigten signifikant häufiger eine pathologisch gesteigerte Sensitivität für Kälteschmerz (CPT) verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (GG; n = 34). **<0,01.

Weibliche Patienten mit einem überwiegenden Verlust der somatosensorischen Funktion (Cluster 2), die mindestens ein variantes Allel (T; n = 31) trugen, zeigten im somatosensorischen Profil im Vergleich zu Trägerinnen von zwei Wildtyp-Allelen (GG; n = 27) eine höhere Sensitivität für mechanischen Schmerz (MPS; 0,90 vs. -0,12; p = 0,007) und ein weniger stark ausgeprägtes Wind-up Phänomen (WUR; 0,10 vs. 1,06; p = 0,003; Abbildung 28A). Darüber hinaus entwickelten weibliche Patienten dieser Subgruppe, die mindestens ein variantes Allel (T) trugen, signifikant seltener ein pathologisch erniedrigtes Vibrationsempfinden verglichen mit Trägerinnen von zwei Wildtyp-Allelen (GG), von denen über 56% eine pathologisch erhöhte Vibrationsdetektionsschwelle (VDT) zeigten (26% vs. 56%; p = 0,021) und signifikant häufiger eine pathologisch erhöhte Sensitivität für mechanischen Schmerz (MPS; 35% vs. 0%; p = 0,001; Abbildung 28B).

Die Betrachtung der männlichen Patienten ergab hingegen weder im somatosensorischen Profil noch in Bezug auf die Häufigkeitsverteilung der QST-Parameter signifi-

kante Unterschiede. Alle signifikanten Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle 15 zusammengefasst.

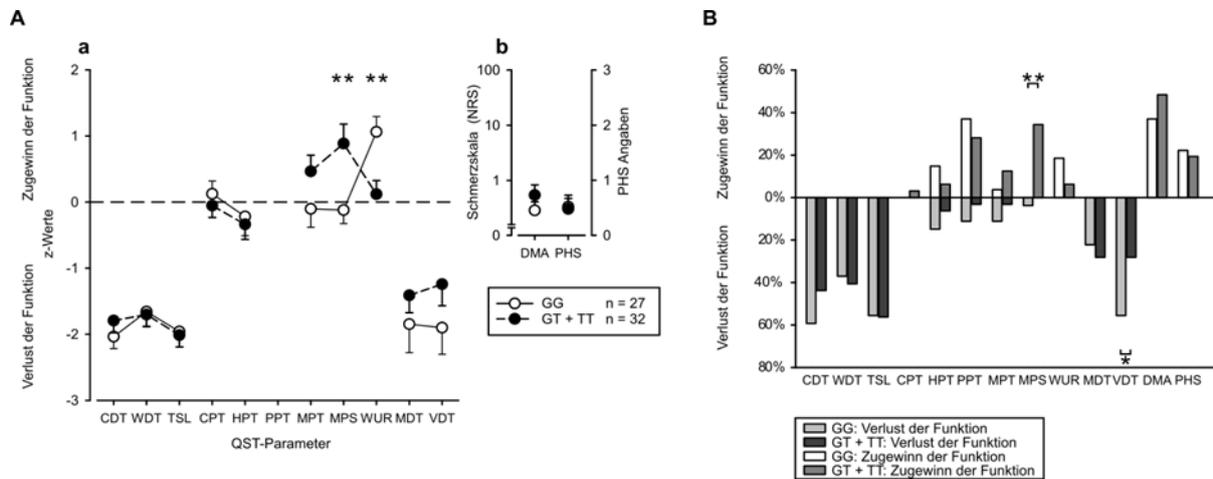


Abbildung 28 Einfluss von *AGTR2* 199G>T (rs5193) auf das somatosensorische Profil (A) mit z-transformierten QST-Werten (a) und der Häufigkeit von dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) (b) und auf die Häufigkeit pathologischer QST-Parameter (B) von weiblichen Patienten mit einem überwiegenden Verlust der somatosensorischen Funktion (Cluster 2).

A: Das variante Allel (T; n = 31) war im Vergleich zum Wildtyp (GG; n = 27) mit einer höheren Sensitivität für mechanischen Schmerz (MPS) und einer weniger stark ausgeprägten WUR assoziiert.

B: Weibliche Patienten des Cluster 2, die mindestens ein variantes Allel (T; n = 31) trugen, zeigten signifikant seltener eine pathologisch erhöhte VDT und häufiger eine pathologisch erhöhte MPS verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (GG; n 27). *<0,05; **<0,01.

3.3.2 *AGTR2* 205G>A (rs5194)

Für den 205G>A (rs5194) SNV wurden ausschließlich in den Clustern der männlichen Patienten signifikante genotypenbedingte Unterschiede im somatosensorischen Profil beobachtet (Anhang, Tabelle 16). Die Genotypen unterschieden sich jedoch nicht signifikant in der Häufigkeit der pathologischen QST-Parameter.

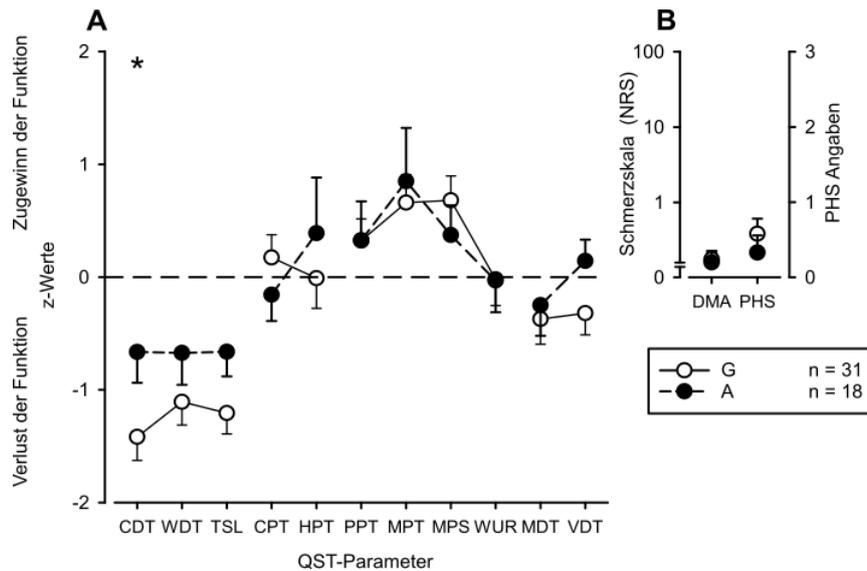


Abbildung 29 Einfluss von *AGTR2* 205G>A (rs5194) auf das somatosensorische Profil (A) und die Häufigkeit dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxer Hitzeempfindungen (PHS) (B) von männlichen Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1).

Das variante Allel (A; n = 18) war bei männlichen Patienten aus Cluster 1 mit einer niedrigeren CDT assoziiert verglichen mit Trägern des Wildtyps (G; n = 31). * $<0,05$.

Der 205G>A (rs5194) Polymorphismus war bei männlichen Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1), die das variante Allel (A; n = 18) trugen, im Vergleich zu Wildtyp Trägern (G; n = 31) mit einer signifikant niedrigeren Kältdetektionsschwelle (CDT; -0,67 vs. -1,42; $p = 0,033$) assoziiert (Abbildung 29).

Bei männlichen Patienten mit einem überwiegenden Verlust der sensorischen Funktion (Cluster 2) führte das variante Allel (A; n = 24) zu einer erhöhten mechanischen Schmerzschwelle (MPT), während das Wildtyp-Allel (G; n = 34) mit einem gesteigerten mechanischen Schmerzempfinden assoziiert war (-0,21 vs. 0,80; $p = 0,033$; Abbildung 30).

Bei der Betrachtung der weiblichen Patienten wurden weder im somatosensorischen Profil noch in der Häufigkeit pathologischer QST-Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Genotypengruppen detektiert.

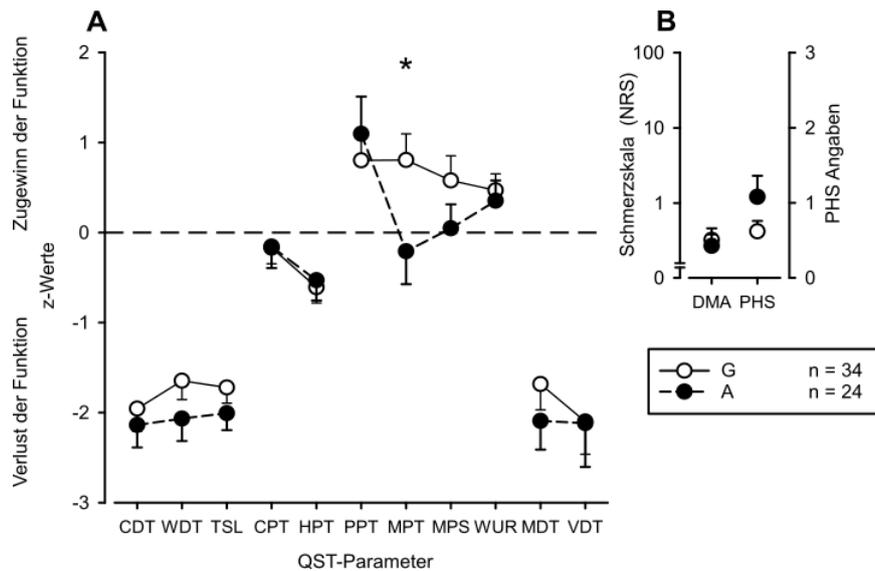


Abbildung 30 Einfluss von *AGTR2* 205G>A (rs5194) auf das somatosensorische Profil (A) und die Häufigkeit dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) und paradoxer Hitzeempfindungen (PHS) (B) von männlichen Patienten mit einem überwiegenden Verlust der somatosensorischen Funktion (Cluster 2).

Das variante Allel (A; n = 24) war bei männlichen Patienten aus Cluster 2 im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (G; n = 34) mit einer niedrigeren Sensitivität für mechanischen Schmerz (MPT) assoziiert. * $<0,05$.

3.3.3 Haplotypenanalyse und logistische Regression

Die Haplotypenanalyse, die geschlechterabhängig durchgeführt wurde, ergab keine Assoziation der Genotypenkombination von *AGTR2* 199G>T (rs5193) und 205G>A (rs5194) mit den QST-Parametern. Patienten, die mindestens ein variantes Allel in beiden SNVs (TG + GG und AG + GG) trugen, wurden zu einer Gruppe und Wildtyp-Träger beider SNVs (TT und AA) zu einer zweiten Gruppe zusammengefasst.

Bei der Auswertung der logistischen Regression zeigte sich ein signifikanter Einfluss von 199G>T (rs5193) auf die Entwicklung einer pathologisch gesteigerten mechanischen Schmerzsensitivität (MPS) bei weiblichen Patienten. Das variante Allel (T) war mit einem im Vergleich zu dem Wildtyp (GG) 3,8fach erhöhten Risiko zur Entwicklung einer pathologisch gesteigerten mechanischen Schmerzsensitivität assoziiert ($p = 0,022$). Darüber hinaus zeigte sich eine Assoziation einzelner Krankheitsentitäten mit dem Risiko zur Entwicklung pathologischer QST-Werte (Anhang, Tabelle 17).

4 Diskussion

Die Untersuchung des Einflusses ausgewählter Varianten in *SIGMAR1* und *AGTR2* hat keinen signifikanten Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen neuropathischen Schmerzpatienten und Kontrollen ergeben. Allerdings war das variante Allel (A) in *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) mit einem gesteigerten Sensibilitätsverlust in thermischen (HPT, WDT) und mechanischen (VDT, WUR) Parametern sowie einem vermehrten Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS) assoziiert. Das variante Allel (G) in *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866) bewirkte insbesondere bei weiblichen Patienten mit vorwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1) eine verminderte Sensibilität gegenüber thermischen (WDT, PHS) und mechanischen (PPT, DMA) Parametern. Für *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) zeigten sich konträre Ergebnisse für männliche und weibliche Patienten. So war der Wildtyp (TT) bei weiblichen Patienten insbesondere aus Cluster 1 mit einer verminderten Sensibilität für Hitzeschmerz und Wärme (HPT, WDT) und bei männlichen Patienten mit einer gesteigerten Sensibilität für Hitze- und Druckschmerz (HPT, PPT) assoziiert. Für *AGTR2* 199G>T (rs5193) und 205G>A (rs5194) wurden insgesamt konträre Auswirkungen auf die Ausprägung neuropathischer Schmerzen beobachtet.

4.1 *Single nucleotide variant (SNV) Auswahl*

In der *SIGMAR1*-Genregion wurden bislang über 400 und in der *AGTR2*-Genregion über 300 SNVs identifiziert ⁷⁵. Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten SNVs erfolgte auf Grundlage verschiedener Kriterien. Um die Polymorphismen in der zur Verfügung stehenden Kohorte (228 Patienten, 248 Kontrollen) nachweisen zu können, wurden SNVs mit einer hohen Allelfrequenz (mindestens 10%) bevorzugt untersucht. Ein weiteres Auswahlkriterium war die Position der SNVs im *SIGMAR1*- bzw. *AGTR2*-Gen. *Missense*-SNVs, die in einem Exon liegen, führen zu einem Aminosäureaustausch und können so eine veränderte Proteinfunktion bewirken. Genetische Varianten, die in der 3'-UTR eines Gens lokalisiert sind, können die Genexpression über eine veränderte Proteinbindung oder eine veränderte Regulation durch microRNAs beeinflussen. Für SNVs in der Promotorregion ist hingegen eine Beeinflussung der Transkription denkbar ⁶⁰. Da von *Missense*-Varianten die größte Wahrscheinlichkeit für einen funktionellen Einfluss zu erwarten ist, wurden in dieser Studie bevor-

zugt solche Varianten untersucht. 5A>C (rs18000866) ist der einzige SNV in *SIGMAR1*, der eine ausreichend hohe Allelfrequenz hat und gleichzeitig einen *Missense*-Aminosäureaustausch (Glutamin>Prolin) bewirkt. *SIGMAR1* 446-42C>T (rs11559048) wurde trotz niedriger Frequenz von unter 1% (siehe Tabelle 5) als weitere *Missense*-Variante (Arginin > Tryptophan) in diese Studie miteingeschlossen. Darüber hinaus wurden Polymorphismen bevorzugt, die bereits in der Literatur beschrieben wurden und für die ein funktioneller Einfluss in anderen Erkrankungen gezeigt werden konnte. Bislang liegen keine Assoziationsstudien bezüglich SNVs im *SIGMAR1*-Gen bzw. im *AGTR2*-Gen und der Schmerzsensitivität vor, so dass auf Varianten in *SIGMAR1* zurückgegriffen wurde, die bisher im Zusammenhang mit neurodegenerativen und psychologischen Erkrankungen untersucht wurden. Die funktionellen Polymorphismen -296C>T (rs1799729) (G>A) bzw. -297G>T (rs10814130) (C>A) und 5A>C (rs1800866) (Glutamin > Prolin) waren in früheren Studien durch ein hohes LD gekennzeichnet, wobei das AA-241-240 Allel mit dem Pro2 Allel gekoppelt vorlag ⁷⁶. Der Basenaustausch G>A in der Promotorregion von -296C>T (rs1799729) bedingt vermutlich eine verminderte Expression und damit Funktion von *SIGMAR1* ⁷⁷. In einer Studie von Fehér *et al.* ⁷⁸ konnte eine Assoziation von *SIGMAR1* -296C>T (rs1799729) und 5A>C (rs1800866) mit dem Risiko zur Entwicklung einer Alzheimer Demenz gezeigt werden. 5A>C (rs1800866) scheint darüber hinaus eine Rolle bei der Entstehung von depressiven Erkrankungen zu spielen ⁷⁹. Polymorphismen im *AGTR2*-Gen sind in der Literatur vor allem im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, z.B. mit arterieller Hypertonie, beschrieben. Zhang *et al.* ⁸⁰ eruierten in einer Studie eine mögliche Assoziation von genetischen Varianten in *AGTR2* mit der Entwicklung einer essentiellen Hypertonie in einer chinesischen Subpopulation. Die dabei untersuchten Polymorphismen 199G>T (rs5193) und 205G>A (rs5194) waren zwar nicht mit essentieller Hypertonie assoziiert, es wurde jedoch eine mögliche protektive Funktion des T-A Haplotypen bei der Entwicklung einer linksventrikulären Herzhypertrophie bei hypertensiven Patienten postuliert. Miranda *et al.* ⁸¹ zeigten eine mögliche Assoziation von 205G>A (rs5194) mit der Pathogenese einer Ureterabgangsstenose. Für den im Intron 1 von *AGTR2* lokalisierten Polymorphismus -95-29A>G (rs1403543) konnte eine Assoziation mit linksventrikulärer Herzhypertrophie bei Männern und Koronarischämie bei Frauen beobachtet werden ^{82,83}. In einer Studie von Warnecke *et al.* ⁸⁴ konnte gezeigt werden, dass das A Allel in -95-29A>G (rs1403543) vermutlich eine geringere Protein-

expression bewirkt, ohne den Spleißvorgang der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) zu beeinflussen.

4.2 Assoziation von genetischen Varianten in *SIGMAR1* und *AGTR2* mit neuropathischem Schmerz

Die Hauptaussage der vorliegenden Arbeit ist, dass die untersuchten Polymorphismen im *SIGMAR1*-Gen mit Veränderungen der somatosensorischen Funktion neuropathischer Schmerzpatienten assoziiert sind, während für die ausgewählten Varianten im *AGTR2*-Gen keine eindeutige Assoziation gezeigt werden konnte. Da keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen Patienten und gesunden Kontrollen beobachtet wurden, scheinen die ausgewählten genetischen Varianten im *SIGMAR1*- und *AGTR2*-Gen keine Suszeptibilitätsfaktoren für die Entwicklung neuropathischer Schmerzen zu sein. Durch den Einsatz von *SIGMAR1*- und *AGTR2*-Antagonisten konnte in verschiedenen Studien eine Schmerzlinderung erzielt werden^{40,44}, daher scheint ein Funktionsverlust dieser Gene eine Schmerzreduktion zu bewirken.

Tabelle 8 Bezeichnungen der *single nucleotide variants* (SNVs), Lokalisation im Gen und Funktion

Gen	HGVS-Name	rs-Nummer	Lokalisation	Protein
<i>SIGMAR1</i>	-297G>T	rs10814130	naher 5'-Bereich (Promotorregion)	-
	-296C>T	rs1799729	naher 5'-Bereich (Promotorregion)	-
	445+400A>G	rs7865100	Intron 3	-
	5A>C	rs1800866	Exon Missense Austausch (Gln>Pro)	Gln>Pro
	446-42C>T	rs11559048	Exon Missense Austausch (Arg>Trp)	Arg>Trp
<i>AGTR2</i>	199G>T	rs5193	3'-UTR	-
	205G>A	rs5194	3'-UTR	-
	501C>A	rs11091046	3'-UTR	-
	-95-29A>G	rs1403543	Intron 1	-

HGVS, *Human Genome Variation Society*; *SIGMAR1*, Sigma-1-Rezeptor; *AGTR2*, Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2; Gln, Gultamin; Pro, Prolin; Arg, Arginin; Trp, Tryptophan

4.3 Assoziation von genetischen Varianten in *SIGMAR1* mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA)

In der vorliegenden Arbeit konnte die Anzahl der 13 untersuchten QST-Parameter mithilfe der Hauptkomponentenanalyse auf vier Hauptkomponenten reduziert werden, die näherungsweise das gesamte somatosensorische Profil der Patienten abbilden. Für -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) wurde ein signifikanter Einfluss insbesondere auf die erste und dritte Hauptkomponente mit Parametern der thermischen Detektion (PC1; CDT, WDT, TSL) und der Nozizeption (PC3; CPT, HPT, PPT, WUR) beobachtet. Dieser Einfluss war besonders ausgeprägt bei Patienten mit überwiegendem Erhalt der somatosensorischen Funktion (Cluster 1). Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der mechanischen Komponenten (PC2; PC4) keine signifikanten Unterschiede für die beiden SNVs in *SIGMAR1*. Somit scheinen *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) vor allem die thermische somatosensorische Funktion neuropathischer Schmerzpatienten zu beeinflussen.

4.4 Assoziation von *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) mit der Ausprägung von neuropathischem Schmerz



Abbildung 31 Darstellung der untersuchten *single nucleotide variants* (SNVs) im *SIGMAR1*-Gen.

5A>C (rs1800866) ist im Exon 1 und 446-42C>T (rs11559048) im Exon 4 von *SIGMAR1* lokalisiert. 445+400A>G (rs7865100) befindet sich im Intron 3. -297G>T (rs10814130) und -296C>T (rs1799729) liegen in der Promotorregion.

Da *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) mit -296C>T (rs1799729) ($R^2 = 0,984$) gekoppelt vorlag, gelten die hier aufgeführten Ergebnisse entsprechend auch für -296C>T (rs1799729). Insgesamt war das variante Allel (A) in -297G>T (rs10814130) mit einem Funktionsverlust verschiedener Fasern, insbesondere der Schmerzfasern (C-Fasern, A δ -Fasern) bzw. des *Tractus spinothalamicus* assoziiert, wodurch Träger von mindestens einem varianten Allel (A) weniger sensibel auf einzelne Reize reagierten. Die höhere Wärmedetektionsschwelle (WDT) und Hitzeschmerzschwelle (HPT) bei Träger von mindestens einem varianten Allel (A) deuten auf einen Verlust der C-Faserfunktion hin ¹⁷.

4.4.1 Assoziation von -297G>T (rs10814130) mit dem Wind-up Phänomen

Das variante Allel (A) führte im Vergleich zum Wildtyp (CC) seltener zu einem pathologisch gesteigerten Wind-up Phänomen (WUR) bei allen Patienten. Unter Wind-up versteht man eine frequenzabhängige Steigerung der Erregbarkeit von Neuronen im Rückenmark, die durch eine repetitive Stimulation afferenter C-Fasern hervorgerufen wird¹⁸. Ein Schlüsselmechanismus bei der Entstehung des Wind-up Phänomens ist die gesteigerte Signalübertragung über NMDA-Rezeptoren¹⁸. Durch den Einsatz von NMDA-Rezeptor-Antagonisten konnte in früheren Studien eine Abschwächung des Wind-up Phänomens erzielt werden. Bei normalem Membranpotential wird der NMDA-Rezeptor-Kanal durch Mg^{2+} -Ionen blockiert. Eine wiederholte Stimulation der C-Fasern führt über eine vermehrte Aktivierung von AMPA-Rezeptoren zu einer Depolarisierung der Zellmembran und infolgedessen zu einer Aufhebung der Mg^{2+} -Blockade. Über die aktivierten NMDA-Rezeptoren strömt vermehrt Ca^{2+} in die Zelle, was eine Aktivierung der PKC und somit eine Phosphorylierung und gesteigerte Öffnungswahrscheinlichkeit von NMDA-Rezeptoren bewirkt. Darüber hinaus sind auch präsynaptische Mechanismen, wie eine vermehrte Neurotransmitterfreisetzung aus primär afferenten C-Fasern, in der Entstehung vom Wind-up Phänomen involviert. Die Freisetzung von Substanz P induziert über Bindung an den NK1-Rezeptor die Produktion von Diacylglycerol (DAG) und IP3. Die resultierende Aktivierung der PKC führt wie zuvor bereits beschrieben über die NMDA-Rezeptor-Aktivierung zum Wind-up Phänomen. Ähnliche Pathomechanismen sind für die Entstehung der zentralen Sensibilisierung und der sekundären Hyperalgesie verantwortlich (siehe Kapitel 1.3.3). Allerdings handelt es sich hierbei um unterschiedliche Phänomene, die getrennt voneinander auftreten können und sich in ihrer zeitlichen Dauer unterscheiden. Während die zentrale Sensibilisierung mit einer längerfristigen Steigerung der Erregbarkeit einhergeht, handelt es sich beim Wind-up Phänomen um eine kurzzeitige Erregungssteigerung von nur wenigen Minuten¹⁸. Für SIGMAR1-Antagonisten konnte eine Hemmung des durch die wiederholte Reizung von C-Fasern induzierten Wind-up Phänomens gezeigt werden⁴⁴. *SIGMAR1 Knockout* Mäuse zeigten außerdem eine abgeschwächte Wind-up Antwort, was die regulatorische Funktion von SIGMAR1 bei der Entwicklung vom Wind-up Phänomen unterstreicht⁸⁵. Ein möglicher Pathomechanismus könnte dabei die in Kapitel 1.4 beschriebene postsynaptische Regulation der NMDA-Rezeptor-Aktivität durch SIGMAR1-Liganden sein⁴⁴. SIG-

MAR1-Antagonisten hemmen NMDA-Rezeptor vermittelte Effekte und könnten somit eventuell die Entstehung des Wind-up Phänomens mindern.

-297G>T (rs10814130) liegt in der Promotorregion von *SIGMAR1*. Der Promotor ist eine dem Gen vorgelagerte DNA-Sequenz und dient als Startpunkt der Transkription. Zur Bindung der RNA-Polymerase an die Promotorregion werden verschiedene Transkriptionsfaktoren benötigt ⁸⁶. Mittels UCSC konnte ermittelt werden, dass in verschiedenen Zelllinien im Bereich von -297G>T (rs10814130) die RNA-Polymerase II Untereinheit A (POLR2A) bindet, die für die Synthese der mRNA verantwortlich ist ⁸⁷. Für das variante Allel (A) in -296C>T (rs1799729) konnte bereits eine verminderte Expression und somit ein Funktionsverlust von *SIGMAR1* gezeigt werden ⁷⁷. Da in dieser Studie -296C>T (rs1799729) mit -297G>T (rs10814130) gekoppelt vorlag (siehe Abbildung 5), könnte das variante Allel (A) in -297G>T (rs10814130) eine verminderte oder fehlerhafte Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor bewirken und so die Transkription und letzten Endes die Genexpression vermindern. Der daraus resultierende Funktionsverlust von *SIGMAR1* könnte eine verminderte NMDA-Rezeptor-Aktivierung bewirken, was sich u.a. in einem selteneren Auftreten von pathologisch gesteigertem Wind-up äußern würde.

4.4.2 Assoziation von -297G>T (rs10814130) mit paradoxen Hitzeempfindungen

Neben dem überwiegenden sensorischen Funktionsverlust zeigten Patienten, die mindestens ein variantes Allel (A) trugen, verglichen mit Wildtyp-Trägern (CC) ein vermehrtes Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS). Unter paradoxen Hitzeempfindungen versteht man schmerzhaftes Hitzewahrnehmungen als Reaktion auf einen applizierten Kältereiz ¹⁷. Verschiedene Mechanismen sind in der Entstehung von PHS involviert ⁸⁸. Ein kalter Reiz wird unter physiologischen Bedingungen über A δ -Fasern zu Kältezellen im Thalamus weitergeleitet, während Wärmeempfindungen über C-Fasern an *heat-pinch-cold* (HPC) Zellen im Thalamus vermittelt werden. Niedrige Temperaturen aktivieren vermutlich sowohl die A δ - als auch die C-Fasern und generieren somit zum einen die Kälteempfindung und zum anderen Hitzewahrnehmung und Schmerz. Normalerweise hemmen die A δ -Fasern die C-Fasern sowohl peripher bei der Verschaltung im Hinterhorn des Rückenmarks (*gate control*), als auch zentral auf Thalamusebene, wo die HPC-Zellen durch die Kältezellen inhi-

biert werden. Durch diese Hemmung wird ein Kältereiz dann auch nur als kalt empfunden. PHS gilt als positives somatosensorisches Symptom, das durch einen peripheren oder zentralen Funktionsverlust verursacht wird. Auf der einen Seite scheint ein peripherer Funktionsverlust von A δ -Fasern über eine Enthemmung der C-Nozizeptoren im Rückenmark zu PHS zu führen. Auf der anderen Seite wird die Entstehung von PHS bei Patienten mit Multipler Sklerose auf eine durch fehlerhafte Kältezellen verursachte Enthemmung zentraler HPC-Zellen im Thalamus zurückgeführt. Das variante Allel (A) in -297G>T (rs10814130) könnte wie zuvor beschrieben zu einer verminderten Transkription und somit eventuell auch zu einer verminderten Proteinexpression von SIGMAR1 führen. Der Funktionsverlust von SIGMAR1 könnte eine Schädigung der A δ -Faserfunktion oder thalamischer Zellen bewirken und damit eine vermehrte Enthemmung und Entstehung von PHS begünstigen.

4.4.3 Geschlechterabhängige Assoziation von -297G>T (rs10814130)

Das variante Allel (A) in -297G>T (rs10814130) bewirkte bei Männern und Frauen unterschiedliche Veränderungen der somatosensorischen Funktion. Das variante Allel (A) führte bei der Gesamtzahl der männlichen Patienten zu einem Funktionsverlust der A β -Fasern bzw. der Hinterstrangbahnen (VDT). Im Gegensatz dazu waren weibliche Träger der Variante (A) durch QST-Veränderungen gekennzeichnet, die eher auf einen Verlust der Schmerzfasernfunktion (C-Fasern, A δ -Fasern) hindeuten. In verschiedenen Studien konnte bereits ein geschlechterabhängiger genetischer Einfluss auf das Schmerzempfinden gezeigt werden ⁶⁵. Greenspan *et al.* ⁸⁹ haben daher die Untersuchung beider Geschlechter und deren Vergleich hinsichtlich Schmerzempfinden und Analgesie in allen Schmerzstudien empfohlen.

4.5 Assoziation von SIGMAR1 5A>C (rs1800866) mit der Ausprägung von neuropathischem Schmerz

Da SIGMAR1 das Schmerzempfinden vermutlich nur unter vorsensibilisierten Bedingungen beeinflusst ⁴⁴, waren die stärksten Unterschiede der QST-Parameter generell für die Gruppe der Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion (Cluster 1) zu erwarten. Dies passt zu der Beobachtung, dass sich für 5A>C (rs1800866) die deutlichsten genotypenbedingten Unterschiede der sensorischen

Funktion für die Gruppe der Frauen aus Cluster 1 zeigten. Das gehäufte Auftreten einer pathologisch verminderten Sensitivität für mechanischen Schmerz (MPS) und Ausbleiben dynamisch mechanischer Allodynie (DMA) innerhalb der Gruppe der Trägerinnen des varianten Allels (G) sind Zeichen einer verminderten zentralen Sensibilisierung¹⁷. Darüber hinaus scheint das variante Allel (G) auch zu einer verminderten peripheren Sensibilisierung zu führen, was sich in einem gehäuften Auftreten einer pathologisch verminderten Sensitivität für Hitzeschmerz (HPT) äußerte¹⁷. Diese Beobachtungen sind zum einen vereinbar mit der Lokalisation von SIGMAR1 in Arealen des ZNS und in Neuronen der Spinalganglien und zum anderen mit der schmerzhemmenden Wirkung von SIGMAR1-Antagonisten sowohl auf zentraler Ebene, u.a. durch eine verminderte Aktivierung der NMDA-Rezeptoren (siehe Kapitel 1.4), als auch auf peripherer Ebene durch Regulation von Bradykinin und NO vermittelten Signalwegen⁹⁰. 5A>C (rs1800866) führt zu einem Austausch der polaren, ungeladenen Aminosäure Glutamin mit dem unpolaren Prolin im Exon 2 von *SIGMAR1*. Prolin hat eine aliphatische Seitenkette mit zyklischer Struktur (Abbildung 32) und beeinflusst die Sekundärstruktur von Proteinen. Polypeptidgruppen, die Prolin enthalten, sind aufgrund der starren Konformation der Iminogruppe strukturell weniger flexibel. Prolin kommt nur selten in α -Helices vor, da der starre Ring des Prolingerüsts einen destabilisierenden Knick bewirkt und das Stickstoffatom keinen Wasserstoffsubstituenten für die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung besitzt. Vielmehr führt Prolin zur Bildung enger β -Schleifen, die benachbarte Abschnitte eines β -Faltblattes verbinden⁹¹. Das variante Allel (G) in 5A>C (rs1800866) könnte zu einer veränderten Sekundärstruktur von SIGMAR1 führen und somit zur Bildung eines instabilen, funktionslosen Proteins und einer verminderten Schmerzwahrnehmung.

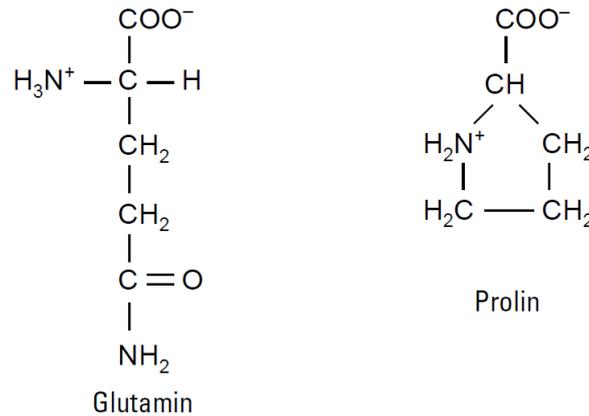


Abbildung 32 Strukturformeln von Glutamin und Prolin.

Prolin besitzt eine Seitenkette mit zyklischer Struktur, die zu einem destabilisierenden Knick in der α -Helix führt, und eine Iminogruppe mit einem Stickstoffatom ohne freien Wasserstoffsubstituenten.

4.6 Assoziation von *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100) mit der Ausprägung von neuropathischem Schmerz

445+400A>G (rs7865100) führte bei Männern und Frauen zu gegensätzlichen Änderungen des Schmerzempfindens. Männliche Wildtyp-Träger (TT) reagierten sensibler auf Druckschmerz und aus Cluster 1 auf Hitzeschmerz, was auf eine Sensibilisierung der Schmerzfasern hindeutet. Im Gegensatz dazu waren weibliche Wildtyp-Träger (TT) durch einen Sensibilitätsverlust charakterisiert, der einen Verlust der Faserfunktion impliziert. 445+400A>G (rs7865100) liegt im Intron 3 von *SIGMAR1*. Introns enthalten nicht kodierende Sequenzen und werden im Rahmen der Transkription während des *Splicings* durch verschiedene *small nuclear* RNAs (snRNA) und Spleißfaktoren aus der RNA herausgeschnitten. Gleichzeitig werden die kodierenden Sequenzen, die Exons, zusammengefügt. Alternatives *Splicing* ermöglicht die Bildung unterschiedlicher Proteine aus einem Gen ⁸⁶, indem beispielsweise Introns nicht entfernt werden. Mutationen oder genetische Varianten in der Spleißregion oder in regulatorischen Sequenzen von Introns können den Spleißvorgang beeinflussen und Veränderungen in der Genexpression bewirken, die das Entstehen von Krankheiten begünstigen ⁹².

Konträre Auswirkungen von genetischen Polymorphismen auf das Schmerzempfinden von Männern und Frauen sind bereits in der Literatur beschrieben. Fillin-gim *et al.* ⁶⁵ beobachteten eine Assoziation vom 118A>G (rs1799971) Polymorphismus im Opioidrezeptor (*OPRM1*-Gen) mit der Sensitivität für Druckschmerz (PPT)

bei Männern aber nicht bei Frauen. Außerdem zeigten Frauen, die das variante Allel (G) trugen, ein gesteigertes Schmerzempfinden, während die Variante bei männlichen Trägern zu einer Schmerzabnahme führte. Diese Beobachtungen konnten in einer klinischen Studie zur Schmerzsensitivität nach Bandscheibenvorfall bestätigt werden ⁹³. Die gegensätzlichen Auswirkungen von 445+400A>G (rs7865100) auf das Schmerzempfinden von Männern und Frauen könnten durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren bedingt sein. Frauen geben generell häufiger Schmerzen an als Männer, was u.a. an dem antinozizeptiven Einfluss von Testosteron liegen könnte ⁹⁴. Darüber hinaus sind auch hormonbedingte Unterschiede in der Expression zerebraler Opioidrezeptoren bekannt, die zu Unterschieden im Schmerzempfinden von Männern und Frauen beitragen. Möglicherweise ist der 445+400A>G (rs7865100) Polymorphismus in SIGMAR1 mit anderen Polymorphismen gekoppelt, die geschlechterabhängig auftreten und das Schmerzempfinden in ihrer Gesamtheit beeinflussen.

4.7 SIGMAR1 und TRPV1

In einer Studie von Ortiz-Rentería *et al.* ⁹⁵ konnte eine Interaktion von SIGMAR1 mit TRPV1 gezeigt werden. TRPV1 ist ein unselektiver Kationenkanal, der für die Weiterleitung schädigender Reize wie z.B. hoher Temperaturen ab ca. $\geq 42^{\circ}\text{C}$ oder chemischer Stimuli (Capsaicin) verantwortlich ist. Infolge einer Nervenfaserschädigung kommt es u.a. durch eine gesteigerte TRPV1-Expression entweder auf den betroffenen Nervenfasern oder auf den umliegenden nicht verletzten Fasern zu einer peripheren Sensibilisierung im Sinne einer Hitzehyperalgesie ⁸. Dabei wird die TRPV1-Aktivität über eine Interaktion mit verschiedenen Proteinen reguliert, die entweder die TRPV1-Funktion oder deren Translokation an die Plasmamembran steigern. TRPV1 ist am ER mit SIGMAR1 in Form eines Protein-Protein-Komplexes kolokalisiert. Der SIGMAR1-Rezeptor scheint als Chaperon-Protein (siehe Kapitel 1.4) für die korrekte Faltung von TRPV1 verantwortlich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass SIGMAR1-Antagonisten zu einer Fehlfaltung der TRPV1-Kanäle führen und so deren Transport zum Golgi-Apparat verhindern. Im Golgi-Apparat findet unter physiologischen Bedingungen eine Hyperglykosylierung von TRPV1 statt, also eine Überführung in dessen reifen Zustand. Bei Ausbleiben der Hyperglykosylierung kann der TRPV1-Kanal nicht zur Plasmamembran transportiert werden und wird im Proteasom

degradiert. Somit führen SIGMAR1-Antagonisten zu einer verminderten Expression von TRPV1-Kanälen in der Plasmamembran sensorischer Neurone, wodurch letztlich die Reizantwort auf Capsaicin-induzierte nozizeptive Stimuli ausbleibt⁹⁵. Insgesamt stützt diese Beobachtung die Ergebnisse dieser Studie, dass die varianten Allele in SIGMAR1 -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) mit einer erhöhten Hitzeschmerzschwelle assoziiert sind. Das variante Allel könnte somit über einen Funktionsverlust von SIGMAR1 zu einer verminderten TRPV1 Expression führen, wodurch die TRPV1 vermittelte periphere Sensibilisierung im Sinne einer Hitzehyperalgesie ausbleiben könnte.

4.8 Assoziation von *single nucleotide variants* (SNVs) in *AGTR2* mit der Ausprägung von neuropathischen Schmerzen

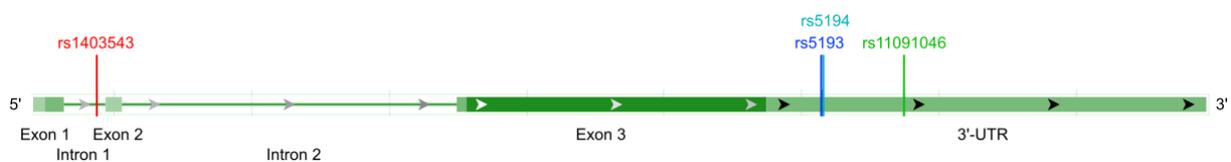


Abbildung 33 Darstellung der untersuchten *single nucleotide variants* (SNVs) im *AGTR2*-Gen. -95-29A>G (rs1403543) ist im Intron 1 des *AGTR2*-Gens lokalisiert. 199G>T (rs5193), 205G>A (rs5194) und 501C>A (rs11091046) befinden sich in der 3'-UTR.

Für 199G>T (rs5193) (G>T) wurden genotypenbedingte Unterschiede in der Ausprägung neuropathischer Schmerzen innerhalb der Gruppe der weiblichen Patienten, aber nicht der männlichen Patienten detektiert. 199G>T (rs5193) ist in der 3'-UTR von *AGTR2* lokalisiert. Verschiedene Proteine können über Bindung an die 3'-UTR die Initiationsphase der Translation beeinflussen. Mazumder *et al.*⁹⁶ postulierten eine Kommunikation der 3'-UTR mit dem 5'-Ende der mRNA, die zu einer verbesserten Ribosomen-Rekrutierung zum 5'-Ende führt und somit die Translation beschleunigt. Das variante Allel (T) in 199G>T (rs5193) könnte die Bindung von Proteinen an die 3'-UTR verstärken. Dadurch könnte die 3'-5'-Kommunikation und somit die Translation beschleunigt werden, was eine gesteigerte Genexpression von *AGTR2* zur Folge hätte. Ein weiterer denkbarer Mechanismus für die Regulation von *AGTR2* durch Varianten in der 3'-UTR ist die Beeinflussung der Bindung von microRNAs an diesen Bereich. MicroRNAs sind kleine, nichtkodierende RNAs, die über eine Destabilisierung der mRNA eine Hemmung der Translation bewirken können. Hierfür ist eine vollständige Komplementarität zur mRNA in der *seed*-Region der microRNA notwen-

dig⁹⁷. Mittels der Software TargetScan 7.1, die Vorhersagen für die Wahrscheinlichkeit der Bindung von microRNAs an mögliche Zielgene durchführt, wurde ermittelt, dass die *seed*-Region der microRNA miR-643 im Bereich von 199G>T (rs5193) liegt. Daher könnte das variante Allel (T) in 199G>T (rs5193) zu einer schlechteren microRNA Bindung führen, was die Proteinmenge von AGTR2 letztendlich erhöhen könnte. Der Funktionsgewinn von AGTR2 würde eine Sensibilitätszunahme bewirken. Diese Sensibilitätszunahme äußert sich innerhalb der Gesamtgruppe der Frauen, die mindestens ein variantes Allel (T) trugen, in einem häufigeren Auftreten einer pathologisch gesteigerten Sensitivität für Kälte- und mechanischen Schmerz (CPT, MPS) verglichen mit Wildtyp-Trägerinnen (GG). Variante Trägerinnen aus Cluster 2 waren hingegen neben einer gesteigerten Sensitivität in zwei mechanischen Parametern (MPS, VDT) auch durch ein weniger stark ausgeprägtes Wind-up Phänomen (WUR) gekennzeichnet.

In 205G>A (rs5194) bewirkte das variante Allel (A) bei der Betrachtung der männlichen Patienten aus Cluster 1 und 2 konträre Unterschiede in zwei QST-Parametern, die die A δ -Faserfunktion repräsentieren (CDT, MPT). Warnecke *et al.*⁸⁴ haben gezeigt, dass das variante Allel (A) in -95-29A>G (rs1403543) mit einer geringeren Proteinexpression assoziiert ist. In dieser Studie lag -95-29A>G (rs1403543) mit 205G>A (rs5194) gekoppelt vor (siehe Kapitel 3.1). Daher könnte das variante Allel (A) in 205G>A (rs5194) eventuell über eine Hemmung der Translation ebenfalls eine verminderte Proteinexpression bewirken. Diese verminderte Proteinexpression könnte eine Sensibilitätsabnahme begünstigen und sich in einer höheren mechanischen Schmerzschwelle (MPT) für Träger der Variante (A) aus Cluster 2 äußern. In Cluster 1 führte das variante Allel (A) jedoch zu einer Sensibilitätszunahme in Form einer verminderten Kälteerkennungsschwelle (CDT).

Diese jeweils konträren Auswirkungen von 199G>T (rs5193) und von 205G>A (rs5194) auf die Ausprägung neuropathischer Schmerzen könnten aufgrund der kleinen Patientensubgruppen zustande gekommen sein (siehe Kapitel 4.5). Eine Wiederholung der Untersuchung in einer größeren Patientenkohorte ist nötig, um die Ergebnisse zu überprüfen.

4.9 Limitationen

Es gibt einige limitierende Faktoren für diese Studie. Zunächst handelt es sich bei dieser Studie um eine reine Assoziationsstudie. Es existieren bislang kaum funktionelle Studien, die potenzielle molekulare Auswirkungen der ausgewählten SNVs auf die SIGMAR1-Funktion untersuchen. Weiterhin wurden nur die p-Werte der primären Fragestellung zur Assoziation genetischer Varianten in *SIGMAR1* und *AGTR2* mit dem Auftreten neuropathischer Schmerzen nach der Bonferroni-Methode für multiples Testen korrigiert. Eine Korrektur der p-Werte zur Assoziation genetischer Varianten mit dem somatosensorischen Profil bzw. der Frequenz pathologischer QST-Werte der neuropathischen Schmerzpatienten erfolgte hingegen nicht. Die beobachteten genotypenbedingten Unterschiede sind daher lediglich als Trend zu werten und sollten in einer größeren Kohorte verifiziert werden. Darüber hinaus handelt es sich bei der untersuchten Patientengruppe (n = 228) um eine relativ kleine Kohorte. Die Unterteilung der Patienten in Cluster, insbesondere für Männer und Frauen getrennt voneinander, führte zu noch kleineren Genotypengruppen. Diese umfassten vor allem in der Gruppe der heterozygoten und homozygoten Variante zum Teil weniger als 10 Patienten, wodurch genotypenbedingte Unterschiede der somatosensorischen Funktion eventuell nicht detektiert werden konnten oder sich fälschlicherweise Unterschiede zeigten. Des Weiteren litten die untersuchten Patienten an verschiedenen Grunderkrankungen (siehe Tabelle 2), die durch unterschiedliche sensorische Symptome und sensible Defizite gekennzeichnet sind. Beispielsweise sind Patienten, die unter einer Polyneuropathie leiden, allgemein eher durch einen Verlust der sensorischen Funktion gekennzeichnet, während Patienten mit postherpetischer Neuralgie vor allem Symptome einer mechanischen Hyperalgesie zeigen⁹⁸. Die Genotypenfrequenz unterschied sich zum Teil signifikant innerhalb der verschiedenen Krankheitsentitäten, was zu Unterschieden in den somatosensorischen Profilen beigetragen haben könnte. Eine separate Untersuchung von Patienten mit dergleichen Krankheitsentität war nicht möglich, da beispielsweise insgesamt nur 11 Patienten an zentralem Schmerz litten. Allerdings sollten neuropathische Schmerzpatienten ohnehin nicht mehr primär anhand ihrer Grunderkrankung sondern anhand ihres individuellen somatosensorischen Profils charakterisiert werden, um Schmerzen Mechanismenbasiert und somit effektiver therapieren zu können⁹⁹.

4.10 Fazit

Zusammenfassend handelt es sich bei dieser Arbeit um die erste Studie zur Untersuchung einer möglichen Assoziation von genetischen Varianten in *SIGMAR1* und *AGTR2* zur Ausprägung neuropathischer Schmerzen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen neuropathischen Schmerzpatienten und gesunden Kontrollen beobachtet, was vermuten lässt, dass die untersuchten Varianten keinen Einfluss auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass insbesondere die untersuchten Varianten im *SIGMAR1*-Gen mit der somatosensorischen Funktion neuropathischer Schmerzpatienten assoziiert sind. Das variante Allel in -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) führte insgesamt zu einem somatosensorischen Funktionsverlust von *SIGMAR1*, was mit einem verminderten Schmerzempfinden vor allem auf thermische Reize einherging. Diese genotypenbedingten Unterschiede in der Sensibilität zeigten sich für 5A>C (rs1800866) vor allem in der Gruppe der weiblichen Patienten aus Cluster 1, was auf einen geschlechterabhängigen Einfluss der genetischen Varianten hindeutet. Dieser Einfluss des Geschlechts wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in 445+400A>G (rs7865100) der Wildtyp (TT) bei Frauen eine verminderte Sensitivität für einige thermische und mechanische Reize und bei Männern eine stärkere Schmerzempfindlichkeit für Druck und Hitze (PPT, HPT) bewirkte. Für die untersuchten SNVs im *AGTR2*-Gen wurden hingegen zum Teil konträre und weniger eindeutige Assoziationen mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen beobachtet.

4.11 Ausblick

In dieser Assoziationsstudie wurde zum ersten Mal untersucht, ob Polymorphismen in *SIGMAR1* und *AGTR2* mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen assoziiert sind. Um die hier beobachteten genotypenbedingten Unterschiede im Schmerzempfinden bekräftigen zu können, ist eine Wiederholung in einer größeren Patientenkohorte notwendig. Dabei sollten die Patienten zusätzlich in Subgruppen nach Grunderkrankung und in Abhängigkeit ihres Geschlechts untersucht werden, was eine ausreichend große Patientenzahl voraussetzt. Darüber hinaus sollten die Patienten anhand einer überarbeiteten Clustereinteilung klassifiziert werden. Bei der hier ver-

wendeten Clustereinteilung sind Patienten mit überwiegend erhaltener somatosensorischer Funktion zwar Cluster 1 zugeordnet, zeigen aber in einigen QST-Parametern (CDT, WDT, TSL, VDT) auch einen sensorischen Verlust (siehe Abbildung 4). Eine neue Studie von Baron *et al.*⁹⁸ teilt neuropathische Schmerzpatienten entsprechend ihres somatosensorischen Profils in drei Cluster ein. Patienten, die in dieser Studie Cluster 1 zugeordnet waren, zeigten einen Verlust der Faserfunktion. Patienten aus Cluster 2 waren hingegen durch eine thermische und aus Cluster 3 durch eine mechanische Hyperalgesie charakterisiert. -297G>T (rs10814130) und 5A>C (rs1800866) in *SIGMAR1* zeigten die deutlichste Assoziation mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen. Eine zukünftige Studie könnte untersuchen, ob sich die verschiedenen Genotypen im Ansprechen auf einen *SIGMAR1*-Antagonisten voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Träger des varianten Allels schlechter auf *SIGMAR1*-Antagonisten ansprechen, da die Variante einen Funktionsverlust des Rezeptors zu bewirken scheint. Funktionelle Studien sind notwendig, um genaue Aussagen über die Auswirkungen der untersuchten SNVs auf die Genexpression treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Neuropathischer Schmerz entsteht als Folge einer Schädigung oder Erkrankung somatosensorischer Nervenstrukturen. Patienten, die an neuropathischen Schmerzen leiden, entwickeln sowohl positive (Hypersensitivität) als auch negative sensorische Symptome (Hyposensitivität). Die derzeitige Therapie neuropathischer Schmerzen beruht auf der Klassifikation der Patienten nach der verursachenden Grunderkrankung und ist häufig unzureichend. Eine optimierte individuelle Therapie sollte daher Mechanismen-basiert, d.h. gegen diese Pathomechanismen gerichtet sein, die zur Entwicklung der patientenspezifischen somatosensorischen Symptome führen. Zwei potenzielle neue Zielstrukturen für neue Medikamente sind der Sigma-1-Rezeptor (*SIGMAR1*) und der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 (*AGTR2*). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Auswirkungen ausgewählter genetischer Polymorphismen im *SIGMAR1*- und *AGTR2*-Gen auf die Ausprägung neuropathischer Schmerzen zu analysieren. Im Rahmen dieser Assoziationsstudie wurden insgesamt fünf genetische Polymorphismen im *SIGMAR1*-Gen (-297G>T (rs10814130), -296C>T (rs1799729), 5A>C (rs1800866), 445+400A>G (rs7865100), 446-42C>T (rs11559048)) und vier im *AGTR2*-Gen (199G>T (rs5193), 205G>A (rs5194), rs1493543, 501C>A (rs11091046)) untersucht. Mithilfe der Pyrosequenziermethode wurden 228 neuropathische Schmerzpatienten und 248 gesunde Kontrollen genotypisiert. Patienten und Kontrollen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Häufigkeit der untersuchten Varianten in *SIGMAR1* und *AGTR2*. Die Varianten scheinen somit keinen Einfluss auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen zu haben. Daneben wurde untersucht, ob die ausgewählten Polymorphismen mit Veränderungen der somatosensorischen Funktion der neuropathischen Schmerzpatienten assoziiert sind, die mithilfe der Quantitativ sensorischen Testung quantifiziert wurde. Insbesondere drei der ausgewählten Polymorphismen im *SIGMAR1*-Gen waren mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen assoziiert. In -297G>T (rs10814130) führte das variante Allel zu einem Sensibilitätsverlust in thermischen (WDT, $p = 0,049$; HPT, $p = 0,027$) und mechanischen (PPT, $p = 0,047$, VDT, $p = 0,004$) Parametern und einem vermehrten Auftreten von paradoxen Hitzeempfindungen (PHS, $p = 0,020$). In 5A>C (rs1800866) war das variante Allel insbesondere bei weiblichen Patienten aus Cluster 1 (Erhalt der sensorischen Funktion) mit einem Sensibilitätsverlust in Parametern der zentralen (MPS, DMA) als auch peripheren (HPT) Sensibilisierung assoziiert,

während sich für die Gruppe der männlichen Patienten keine Sensibilitätsunterschiede zeigten. Für 445+400A>G (rs7865100) zeigten sich konträre Ergebnisse für männliche und weibliche Patienten. Für die untersuchten genetischen Varianten im *AGTR2*-Gen zeigte sich keine eindeutige Assoziation mit neuropathischen Schmerzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten erstmals auf eine mögliche Assoziation von genetischen Varianten im *SIGMAR1*-Gen mit der Ausprägung neuropathischer Schmerzen, insbesondere mit Veränderungen der thermischen Sensibilität, hin. Eine Wiederholung dieser Untersuchung in einer größeren Patientenkohorte ist notwendig, um die erhobenen Ergebnisse zu verifizieren. Funktionelle Studien sollten folgen, um genauere Aussagen über die Auswirkungen der untersuchten Polymorphismen auf die Genexpression treffen zu können. In Zukunft könnten die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit den Daten aus Folgestudien als Grundlage dienen, das Ansprechen auf eine medikamentöse Behandlung mit *SIGMAR1*-Antagonisten zu beurteilen. So könnten neuropathische Schmerzen zukünftig effektiver therapiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Treede, R.-D. *et al.* A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* **156**, 1003–1007 (2015).
2. Tölle, T. R. & Baron, R. Neuropathische Schmerzen - auf dem Weg vom Mechanismus zur Therapie: Deutscher Forschungsbund Neuropathischer Schmerz DFNS.
3. Brookes, A. J. The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177–186 (1999).
4. Dubin, A. E. & Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 3760–3772 (2010).
5. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. *Physiologie*. (Georg Thieme Verlag, 2009).
6. Trepel, M. *Neuroanatomie - Struktur und Funktion*. (Urban & Fisher, 2012).
7. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl* **3**, S1-226 (1986).
8. Baron, R., Koppert, W., Strumpf, M. & Willweber-Strumpf, A. *Praktische Schmerztherapie*. (Springer Verlag, 2011).
9. Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R. & Gallacher, D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain* **10**, 287–287 (2006).
10. Baron, R., Binder, A. & Wasner, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *The Lancet Neurology* **9**, 807–819 (2010).
11. Treede, R.-D. *et al.* Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* **70**, 1630–1635 (2008).
12. Kosek, E. *et al.* Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* **157**, 1382–1386 (2016).
13. Haanpää, M. L. *et al.* Assessment of neuropathic pain in primary care. *Am. J. Med.* **122**, S13-21 (2009).
14. Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B. & Touboul, C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* **136**, 380–387 (2008).

15. van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H. & Torrance, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* **155**, 654–662 (2014).
16. Maier, C. *et al.* Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): Somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes: *Pain* **150**, 439–450 (2010).
17. Rolke, R. *et al.* Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* **123**, 231–243 (2006).
18. Herrero, J. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Progress in Neurobiology* **61**, 169–203 (2000).
19. Diener, H. & Weimer, C. *S1 Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. (Thieme Verlag, 2012).
20. Krause, S. J. & Backonja, M.-M. Development of a neuropathic pain questionnaire. *Clin J Pain* **19**, 306–314 (2003).
21. Bouhassira, D. *et al.* Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* **114**, 29–36 (2005).
22. Freynhagen, R., Baron, R., Gockel, U. & Tölle, T. R. painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Curr Med Res Opin* **22**, 1911–1920 (2006).
23. Gierthmühlen, J., Binder, A., Förster, M. & Baron, R. Do We Measure What Patients Feel?: An Analysis of Correspondence Between Somatosensory Modalities Upon Quantitative Sensory Testing and Self-reported Pain Experience. *Clin J Pain* **34**, 610–617 (2018).
24. Haanpää, M. *et al.* NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment: *Pain* **152**, 14–27 (2011).
25. Colloca, L. *et al.* Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers* **3**, 17002 (2017).
26. Pergolizzi, J. *et al.* The development of chronic pain: physiological CHANGE necessitates a multidisciplinary approach to treatment. *Current Medical Research and Opinion* **29**, 1127–1135 (2013).
27. Moore, K. A. *et al.* Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord. 8

28. Engel, G. L. The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science* **196**, 129–136 (1977).
29. Gangadhar, M., Mishra, R. K., Sriram, D. & Yogeeswari, P. Future directions in the treatment of neuropathic pain: a review on various therapeutic targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **13**, 63–81 (2014).
30. Sabatowski, R. *et al.* Pregabalin reduces pain and improves sleep and mood disturbances in patients with post-herpetic neuralgia: results of a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Pain* **109**, 26–35 (2004).
31. Freynhagen, R., Strojek, K., Griesing, T., Whalen, E. & Balkenohl, M. Efficacy of pregabalin in neuropathic pain evaluated in a 12-week, randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled trial of flexible- and fixed-dose regimens. *Pain* **115**, 254–263 (2005).
32. Siddall, P. J. *et al.* Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: a placebo-controlled trial. *Neurology* **67**, 1792–1800 (2006).
33. Finnerup, N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **14**, 162–173 (2015).
34. Binder, A. *et al.* Topical 5% Lidocaine (Lignocaine) Medicated Plaster Treatment for Post-Herpetic Neuralgia: Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled, Multi-national Efficacy and Safety Trial. *Clinical Drug Investigation* **29**, 393–408 (2009).
35. Backonja, M. M., Malan, T. P., Vanhove, G. F. & Tobias, J. K. NGX-4010, a High-Concentration Capsaicin Patch, for the Treatment of Postherpetic Neuralgia: A Randomized, Double-Blind, Controlled Study with an Open-Label Extension. *Pain Medicine* **11**, 600–608 (2010).
36. Simpson, D. M. *et al.* Capsaicin 8% Patch in Painful Diabetic Peripheral Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *The Journal of Pain* **18**, 42–53 (2017).
37. Vinik, A. I. *et al.* Capsaicin 8% patch repeat treatment plus standard of care (SOC) versus SOC alone in painful diabetic peripheral neuropathy: a randomised, 52-week, open-label, safety study. *BMC Neurology* **16**, (2016).
38. Waldfoegel, J. M. *et al.* Pharmacotherapy for diabetic peripheral neuropathy pain and quality of life: A systematic review. *Neurology* **88**, 1958–1967 (2017).
39. Baron, R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain—a clinical perspective. *Nature Clinical Practice Neurology* **2**, 95–106 (2006).

40. Rice, A. S. C. *et al.* EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. *The Lancet* **383**, 1637–1647 (2014).
41. Bruna, J. *et al.* Efficacy of a Novel Sigma-1 Receptor Antagonist for Oxaliplatin-Induced Neuropathy: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIa Clinical Trial. *Neurotherapeutics* **15**, 178–189 (2018).
42. Vidal-Torres, A. *et al.* Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: Enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects. *European Journal of Pharmacology* **711**, 63–72 (2013).
43. Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S. & Ruoho, A. E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**, 557–566 (2010).
44. Zamanillo, D., Romero, L., Merlos, M. & Vela, J. M. Sigma 1 receptor: A new therapeutic target for pain. *European Journal of Pharmacology* **716**, 78–93 (2013).
45. Smith, M. T., Wyse, B. D. & Edwards, S. R. Small Molecule Angiotensin II Type 2 Receptor (AT₂R) Antagonists as Novel Analgesics for Neuropathic Pain: Comparative Pharmacokinetics, Radioligand Binding, and Efficacy in Rats. *Pain Medicine* **14**, 692–705 (2013).
46. Smith, M. T. & Muralidharan, A. Targeting angiotensin II type 2 receptor pathways to treat neuropathic pain and inflammatory pain. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**, 25–35 (2015).
47. Smith, M. T., Anand, P. & Rice, A. S. C. Selective small molecule angiotensin II type 2 receptor antagonists for neuropathic pain: preclinical and clinical studies. *Pain* **157 Suppl 1**, S33-41 (2016).
48. Su, T.-P. & Hayashi, T. Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2073–2080 (2003).
49. Walter, S. & Buchner, J. Molecular Chaperones—Cellular Machines for Protein Folding. *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 1098–1113 (2002).
50. Hanner, M. *et al.* Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 8072–8077 (1996).

51. Chen, Y., Hajipour, A. R., Sievert, M. K., Arbabian, M. & Ruoho, A. E. Characterization of the Cocaine Binding Site on the Sigma-1 Receptor †. *Biochemistry* **46**, 3532–3542 (2007).
52. Prasad, P. D. *et al.* Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J. Neurochem.* **70**, 443–451 (1998).
53. Ruscher, K. & Wieloch, T. The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *Journal of Pharmacological Sciences* **127**, 30–35 (2015).
54. Hayashi, T. The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. 14
55. ALONSO, G. IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF THE SIGMA1 RECEPTOR IN THE ADULT RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM. 16
56. Hayashi, T. & Su, T.-P. Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca²⁺ Signaling and Cell Survival. *Cell* **131**, 596–610 (2007).
57. Roh, D.-H. *et al.* Spinal neuronal NOS activation mediates sigma-1 receptor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in mice: involvement of PKC-dependent GluN1 phosphorylation: Role of nNOS on sigma-1 receptor's action. *British Journal of Pharmacology* **163**, 1707–1720 (2011).
58. Danser, A. H. J. & Anand, P. The Angiotensin II Type 2 Receptor for Pain Control. *Cell* **157**, 1504–1506 (2014).
59. Anand, U. *et al.* Mechanisms underlying clinical efficacy of Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) antagonist EMA401 in neuropathic pain: clinical tissue and in vitro studies. *Mol Pain* **11**, (2015).
60. Diatchenko, L. *et al.* Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Human Molecular Genetics* **14**, 135–143 (2005).
61. Kapur, B. M., Lala, P. K. & Shaw, J. L. V. Pharmacogenetics of chronic pain management. *Clinical Biochemistry* **47**, 1169–1187 (2014).
62. Hugot, J. P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599–603 (2001).
63. Rakvåg, T. T. *et al.* The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients: *Pain* **116**, 73–78 (2005).

64. Janicki, P. K. *et al.* A Genetic Association Study of the Functional A118G Polymorphism of the Human μ -Opioid Receptor Gene in Patients with Acute and Chronic Pain: *Anesthesia & Analgesia* **103**, 1011–1017 (2006).
65. Fillingim, R. B. *et al.* The A118G single nucleotide polymorphism of the μ -opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans. *The Journal of Pain* **6**, 159–167 (2005).
66. Binder, A. *et al.* Transient Receptor Potential Channel Polymorphisms Are Associated with the Somatosensory Function in Neuropathic Pain Patients. *PLoS ONE* **6**, e17387 (2011).
67. Gierthmühlen, J. *et al.* Who is healthy? Aspects to consider when including healthy volunteers in QST-based studies—a consensus statement by the EURO-PAIN and NEURO-PAIN consortia: *PAIN* **156**, 2203–2211 (2015).
68. Dean, F. B. *et al.* Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 5261–5266 (2002).
69. Fakhrai-Rad, H., Pourmand, N. & Ronaghi, M. Pyrosequencing?: An accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Human Mutation* **19**, 479–485 (2002).
70. PyroMark® Gold Q96 Reagents Handbook. (2014).
71. Sanger, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**, 687–695 (1977).
72. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
73. 1000 Genomes Project Consortium *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
74. Sachau, J. *et al.* SIGMA-1 Receptor Gene Variants Affect the Somatosensory Phenotype in Neuropathic Pain Patients. *J Pain* (2018).
doi:10.1016/j.jpain.2018.08.011
75. Belfer, I. *et al.* Candidate Gene Studies of Human Pain Mechanisms: Methods for Optimizing Choice of Polymorphisms and Sample Size. *Anesthesiology* **100**, 1562–1572 (2004).
76. Ishiguro, H. *et al.* Association between polymorphisms in the type 1 sigma receptor gene and schizophrenia. *Neuroscience Letters* **257**, 45–48 (1998).

77. Miyatake, R., Furukawa, A., Matsushita, S., Higuchi, S. & Suwaki, H. Functional polymorphisms in the sigma1 receptor gene associated with alcoholism. *Biological Psychiatry* **55**, 85–90 (2004).
78. Fehér, Á. *et al.* Association between a variant of the sigma-1 receptor gene and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* **517**, 136–139 (2012).
79. Kishi, T. *et al.* Association analysis of SIGMAR1 with major depressive disorder and SSRI response. *Neuropharmacology* **58**, 1168–1173 (2010).
80. Zhang, M., Ma, H., Wang, B. & Zhao, Y. Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphisms and cardioprotective role in essential hypertension. *Heart and Vessels* **21**, 95–101 (2006).
81. Miranda, D. M. *et al.* Association of angiotensin type 2 receptor gene polymorphisms with ureteropelvic junction obstruction in Brazilian patients: *AGTR2* gene and UPJO. *Nephrology* **19**, 714–720 (2014).
82. Schmieder, R. E., Jacobi, J., Fleck, E., Hilgers, K. & Regitz-Zagrosek, V. Effect of the Angiotensin II Type 2-Receptor Gene (21675 G/A) on Left Ventricular Structure in Humans. **37**, 8 (2001).
83. Herrmann, S.-M. *et al.* Angiotensin II type 2 receptor gene polymorphism and cardiovascular phenotypes: the GLAECO and GLAOLD studies. *European Journal of Heart Failure* **4**, 707–712 (2002).
84. Warnecke, C. *et al.* Intronic ANG II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **289**, R1729–R1735 (2005).
85. Puente, B. de la *et al.* Sigma-1 receptors regulate activity-induced spinal sensitization and neuropathic pain after peripheral nerve injury: *Pain* **145**, 294–303 (2009).
86. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. *Duale Reihe Biochemie*. (Georg Thieme Verlag, 2012).
87. Kent, W. J. *et al.* The Human Genome Browser at UCSC. 11
88. Susser, E., Sprecher, E. & Yarnitsky, D. Paradoxical heat sensation in healthy subjects: peripherally conducted by A δ or C fibres? *Brain* **122**, 239–246 (1999).
89. Greenspan, J. D. *et al.* Studying sex and gender differences in pain and analgesia: A consensus report: *Pain* **132**, S26–S45 (2007).

90. Romero, L., Merlos, M. & Vela, J. M. Antinociception by Sigma-1 Receptor Antagonists. in *Advances in Pharmacology* **75**, 179–215 (Elsevier, 2016).
91. Nelson, D. & Cox, M. *Lehninger Biochemie*. (Springer Verlag).
92. Ward, A. J. & Cooper, T. A. The pathobiology of splicing. *The Journal of Pathology* n/a-n/a (2009). doi:10.1002/path.2649
93. Olsen, M. B. *et al.* Pain Intensity the First Year after Lumbar Disc Herniation Is Associated with the A118G Polymorphism in the Opioid Receptor Mu 1 Gene: Evidence of a Sex and Genotype Interaction. *Journal of Neuroscience* **32**, 9831–9834 (2012).
94. Bartley, E. J. & Fillingim, R. B. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *British Journal of Anaesthesia* **111**, 52–58 (2013).
95. Ortíz-Rentería, M. *et al.* TRPV1 channels and the progesterone receptor Sig-1R interact to regulate pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E1657–E1666 (2018).
96. Mazumder, B., Seshadri, V. & Fox, P. L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 91–98 (2003).
97. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
98. Baron, R. *et al.* Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *PAIN* **158**, 261–272 (2017).
99. Binder, A. & Baron, R. Mechanism-based therapy for neuropathic pain—a concept in danger? *Pain* **156**, 2113–2114 (2015).

7 Anhang

Tabelle 9 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil für *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130)

Genotyp	N	Somatosensorisches Profil									
		WDT		HPT		PPT		WUR		MDT	
		z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert
Alle Patienten											
CC	161	-1,03 ± 0,11	0,049	0,30 ± 0,13	0,027	1,41 ± 0,18	0,047	-	n.s.*	-	n.s.*
CA + AA	67	-1,41 ± 0,15		-0,20 ± 0,18		0,84 ± 0,22		-		-	
Cluster 1											
CC	84	-0,38 ± 0,13	0,031	-	n.s.*	1,65 ± 0,26	0,018	0,32 ± 0,14	0,043	-	n.s.*
CA + AA	28	-0,96 ± 0,23		-		0,66 ± 0,31		-0,21 ± 0,16		-	
Frauen											
CC	89	-0,74 ± 0,14	0,032	-	n.s.*	2,02 ± 0,27	0,049	-	n.s.*	-	n.s.*
CA + AA	32	-1,33 ± 0,25		-		1,04 ± 0,36		-		-	
Frauen Cluster 1											
CC	49	-0,04 ± 0,15	0,048	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*
CA + AA	14	-0,75 ± 0,38		-		-		-		-	
Männer Cluster 1											
CC	35	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	0,17 ± 0,23	0,020	-0,11 ± 0,17	0,045
CA + AA	14	-		-		-		-0,54 ± 0,19		-0,87 ± 0,33	

N, Anzahl; WDT, Wärmedetektionsschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; WUR, Wind-up Ratio; MDT, mechanische Detektionsschwelle; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 10 Signifikante p-Werte für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130)

Genotyp	N	Häufigkeiten pathologischer QST-Werte							
		WDT Verlust		WUR Zugewinn		VDT Verlust		PHS	
		%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert		p-Wert
Alle Patienten									
CC	161	-	n.s.*	13	0,027	22	0,004	19	0,020
CA + AA	67			3		40		33	
Frauen									
CC	89	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	10	0,038
CA + AA	33							25	
Frauen Cluster 1									
CC	49	0	0,047	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*
CA + AA	14	14							
Männer									
CC	73	-	n.s.*	-	n.s.*	21	0,017	-	n.s.*
CA + AA	35					43			

N, Anzahl; WDT, Wärmedetektionsschwelle; WUR, Wind-up Ratio; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 11 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866)

Genotyp	N	Somatosensorisches Profil				Häufigkeiten pathologischer QST-Werte											
		WDT		PPT		WDT Verlust		HPT Verlust		PPT Zugewinn		MPS Verlust		DMA		PHS	
		z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert
Alle Patienten																	
TT	18																
TG + GG	7	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*		n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	19	0,006
	41															39	
Cluster 1																	
TT	93	-0,40 ± 0,12	0,012	1,61 ± 0,25	0,001	-	n.s.*	0	0,026	34	0,039	0	0,026	-	n.s.*	-	n.s.*
TG + GG	19	-1,17 ± 0,29		0,41 ± 0,25				6		11		6					
Frauen																	
TT	10			1,92 ± 0,25	0,045	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	11	0,017
TG + GG	2	-	n.s.*	0,87 ± 0,44												32	
	19																
Frauen Cluster 1																	
TT	53	-0,07 ± 0,15	0,046	2,60 ± 0,37	0,0002	0	0,001	0	0,020	-	n.s.*	0	0,020	32	0,036	-	n.s.*
TG + GG	10	-0,88 ± 0,47		0,38 ± 0,38		20		10				10		0			

N, Anzahl; WDT, Wärmedetektionsschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzsensitivität; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 12 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für *SIGMAR1* 445+400A>G (rs7865100)

Genotyp	N	Somatosensorisches Profil						Häufigkeiten pathologischer QST-Werte							
		WDT		PPT		MPT		WDT Verlust		HPT Zuge- winn		HPT Verlust		PPT Zuge- winn	
		z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert
Frauen															
TT	23	-	n.s.*	-	n.s.*	-0,34 ± 0,23	0,029	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*
TC + CC	98	-	n.s.*	-	n.s.*	0,37 ± 0,14	0,029	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*
Frauen Cluster 1															
TT	9	-0,97 ± 0,48	0,034	-	n.s.*	-	n.s.*	22	0,0004	-	n.s.*	11	0,014	-	n.s.*
TC + CC	54	-0,07 ± 0,15	0,034	-	n.s.*	-	n.s.*	0	0,0004	-	n.s.*	0	0,014	-	n.s.*
Männer															
TT	37	-	n.s.*	1,16 ± 0,31	0,032	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	32	0,008
TC + CC	70	-	n.s.*	0,38 ± 0,17	0,032	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	11	0,008
Männer Cluster 1															
TT	17	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	35	0,026	-	n.s.*	-	n.s.*
TC + CC	32	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	9	0,026	-	n.s.*	-	n.s.*

N, Anzahl; WDT, Wärmedetektionsschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 13 Haplotypenanalyse für *SIGMAR1* -297G>T (rs10814130) und *SIGMAR1* 5A>C (rs1800866)

Genotyp	N	Somatosensorisches Profil											
		WDT		CPT		PPT							
		z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert						
Cluster 1													
CC und TT	84	-0,38 ± 0,13		-		n.s.*		1,65 ± 0,26					
CA + AA und TG + GG	19	-1,17 ± 0,29						0,41 ± 0,25					
Frauen													
CC und TT	89	-		n.s.*				2,02 ± 0,27					
CA + AA und TG + GG	19							0,87 ± 0,44					
Frauen Cluster 1													
CC und TT	49	-0,44 ± 0,15		0,040				2,55 ± 0,37					
CA + AA und TG + GG	10	-0,88 ± 0,47						0,38 ± 0,38					
Männer													
CC und TT	72			0,07 ± 0,13									
CA + AA und TG + GG	22			-0,40 ± 0,18		0,040							
Genotyp	N	Häufigkeiten pathologischer QST-Werte											
		WDT Verlust		HPT Verlust		PPT Zugewinn		MPS Verlust		DMA		PHS	
		%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert
Alle Patienten													
CC und TT	161	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	19	0,005
CA + AA und TG + GG	41										39		
Cluster 1													
CC und TT	84	-	n.s.*	0	0,035	35	0,039	0	0,035	-	n.s.*	-	n.s.*
CA + AA und TG + GG	19			5		11		5					
Frauen													
CC und TT	89	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	-	n.s.*	10	0,014
CA + AA und TG + GG	19										32		
Frauen Cluster 1													
CC und TT	49	0	0,001	0	0,026	-	n.s.*	0	0,026	33	0,034	-	n.s.*
CA + AA und TG + GG	10	20		10				10		0			

N, Anzahl; WDT, Wärmedetektionsschwelle; HPT, Hitzeschmerzschwelle; CPT, Kälteschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzsensitivität; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 14 Logistische Regressionsanalyse für die SNVs in *SIGMAR1*, Geschlecht und Krankheitsentitäten

QST-Werte		Kovariaten										
		446-42 C>T	5A>C	445+400 A>G	-297G>T	Geschlecht	PNP	PHN	PNI	CRPS	Zentral	Andere
TSL Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,028 1,25 3,5	0,002 2,15 8,6	n.s.*	n.s.*	0,013 2,00 7,3	n.s.*
HPT Zugewinn	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,045 1,60 4,95	n.s.*	n.s.*
MDT Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,011 1,75 5,73	n.s.*	n.s.*	4,9	n.s.*	n.s.*
VDT Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,015 1,13 3,10	n.s.*	0,008 2,81 16,57	0,03 2,46 11,75	0,019 2,75 15,71	0,032 2,28 9,78	n.s.*	0,019 2,75 15,71
PPT Zugewinn	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,048 0,74 2,09	n.s.*	0,014 2,15 8,60	0,016 2,04 7,71	0,000 2,90 18,20	n.s.*	0,009 2,50 12,22
MPT Zugewinn	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,001 -1,48 0,23	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,021 1,82 6,20
MPS Zugewinn	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,045 1,81 6,11	n.s.*
DMA	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,049 1,49 4,43

SNV, *single nucleotide variant*; PNP, Polyneuropathie; PHN, Postherpetische Neuralgie; PNI, Peripherer Nervenschaden; CRPS, Komplexes regionales Schmerzsyndrom; TSL, thermisch sensorisches Limen; HPT, Hitzeschmerzschwelle; PPT, Druckschmerzschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzsensitivität; MDT, mechanische Detektionsschwelle; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; p, p-Wert; R, Regressionskoeffizient; OR, Odds Ratio, n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 15 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil und für die Häufigkeiten pathologischer QST-Werte für *AGTR2* 199G>T (rs5193)

Genotyp	N	Somatosensorisches Profil				Häufigkeiten pathologischer QST-Werte							
		MPS		WUR		CPT Zugewinn		MPS Zugewinn		VDT Verlust		PHS	
		z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert	%	p-Wert
Frauen													
GG	61					2		10					
GT + TT	60	-	n.s.*	-	n.s.*	15	0,008	27	0,016	-	n.s.*		
Frauen Cluster 1													
GG	34					3							
GT + TT	29	-	n.s.*	-	n.s.*	28	0,009	-	n.s.*	-	n.s.*	-	
Frauen Cluster 2													
GG	27	-0,12 ± 0,20		1,06 ± 0,23				0		56			
GT + TT	31	0,90 ± 0,30	0,007	0,10 ± 0,21	0,003	-	n.s.*	35	0,001	26	0,021		

N, Anzahl; CPT, Kälteschmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzsensitivität; WUR, Wind-up Ratio; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; PHS, paradoxe Hitzeempfindungen; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 16 Signifikante p-Werte im somatosensorischen Profil für *AGTR2* 205G>A (rs5194)

Genotyp	N	Somatosensorisches Profil			
		CDT		MPT	
		z-Wert	p-Wert	z-Wert	p-Wert
Männer Cluster 1					
G	31	-1,42 ± 0,21			
A	18	-0,67 ± 0,27	0,033	-	n.s.*
Männer Cluster 2					
G	34			0,80 ± 0,29	
A	24	-	n.s.*	-0,21 ± 0,36	0,033

N, Anzahl; CDT, Kälteerkennungsschwelle; MPT, mechanische Schmerzschwelle; n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet.

Tabelle 17 Logistische Regressionsanalyse für die SNVs in *AGTR2* und Krankheitsentitäten

QST-Werte		Kovariaten									
		199G>T	205G>A	-95-29 A>G	501C>A	PNP	PHN	PNI	CRPS	Zentral	Andere
Frauen (n = 121)											
CDT Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,036 -1,300 3,182	n.s.*	n.s.*
VDT Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,022 3,182 24,083
MPS Zugewinn	p R OR	0,022 1,338 3,812	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*
PPT Zugewinn	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,040 1,886 6,590	n.s.*	0,002 2,508 12,278	n.s.*	0,046 2,390 10,918
DMA	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,021 2,997 20,025	n.s.*
Männer (n = 107)											
CDT Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,025 2,217 9,181	n.s.*
TSL Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,044 2,196 8,986		0,041 2,422 11,270	0,047 2,307 10,042	0,003 4,023 55,857	n.s.*
MDT Verlust	p R OR	n.s.*	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,046 2,189 8,925	n.s.*	n.s.*	n.s.*	0,038 2,624 13,789	n.s.*

SNV; *single nucleotide variant*; PNP, Polyneuropathie; PHN, Postherpetische Neuralgie; PNI, Peripherer Nervenschaden; CRPS, Komplexes regionales Schmerzsyndrom; CDT, Kälteschmerzschwelle; TSL, thermisch sensorisches Limen; PPT, Druckschmerzschwelle; MPS, mechanische Schmerzssensitivität; MPS, mechanische Schmerzssensitivität; MDT, mechanische Detektionsschwelle; VDT, Vibrationsdetektionsschwelle; DMA, dynamisch mechanische Allodynie; p, p-Wert; R, Regressionskoeffizient; OR, Odds Ratio, n.s.*, nicht signifikant; der Übersicht halber sind nur die signifikanten z-Werte und Häufigkeiten pathologischer QST-Werte aufgelistet

8 Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte meine Dissertation in der hier vorliegenden Form nicht realisiert werden können. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei allen beteiligten Personen und Institutionen herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ingolf Cascorbi, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in seinem Institut durchzuführen und mir hierfür stets alle Räumlichkeiten, Materialien und seine Hilfe zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dr. rer. nat. Henrike Bruckmüller danke ich für die hervorragende Betreuung, ihre konstruktiven Anregungen und ihre Hilfsbereitschaft, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte vollenden können.

Daneben danke ich Frau Dr. rer. nat. Meike Kähler für die Einarbeitung und Hilfestellung im Labor. Frau Dipl. Math. Dipl. Phys. Dr. Amke Caliebe danke ich für die Unterstützung und Geduld bei der statistischen Auswertung. Ferner danke ich PD Dr. rer. biol. hum. Walter Magerl aus der Neurophysiologie, Centrum für Biomedizin und Medizin-technik Mannheim (CBTM) der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg für seine Anregungen und Ideen bei der Auswertung der vorliegenden Daten.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit. Daneben danke ich auch den Mitarbeitern der Sektion für Neurologische Schmerzforschung und -therapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Anregungen und Hilfe bei der Einordnung der Daten vor dem klinischen Hintergrund.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Geduld und Unterstützung auf diesem Weg.