





Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum der Pharmakologie  
Institut für Klinische Pharmakologie  
Direktor: Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. G.Geißlinger

**Bedeutung von genetisch-bedingter GCH1-  
Minderfunktion auf Schmerzen unter sensitisierten  
und nicht-sensitisierten Bedingungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Jan Adolph  
aus Bielefeld

*Frankfurt am Main, 2010*

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Jörn Lötsch
Korreferent:	Prof. Dr. Jochen Roeper
Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.2010

# Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	GCH1 und Tetrahydrobiopterin (BH4) .....	2
1.2	Fragestellung .....	6
2	Material und Methoden .....	7
2.1	Studienpopulation .....	7
2.1.1	Ethische Voraussetzungen.....	7
2.1.2	Probandenauswahl .....	7
2.2	Studiendesign .....	8
2.3	Genotypisierung.....	8
2.4	Phänotypisierung.....	10
2.4.1	Ablauf .....	10
2.4.2	Experimenteller Schmerz.....	11
2.4.3	Probengewinnung und Probenvorbereitung .....	17
2.4.4	Expressionsanalyse von GCH1 .....	18
2.4.5	Funktionsanalyse von GCH1.....	19
2.5	Statistische Auswertung.....	20
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Schmerzphänotyp.....	21
3.1.1	Schmerzmodelle mit Sensitisierung.....	21
3.1.2	Schmerzmodelle ohne Sensitisierung .....	23
3.2	Molekularbiologische Untersuchungen .....	24
3.2.1	Expression der GCH1 auf RNA-Ebene .....	24
3.2.2	Expression von GCH1 auf Proteinebene.....	24
3.2.3	Funktion der GCH1 (Konzentration von Biopterin) .....	25
3.2.4	Expression der <i>Sepiapterinreduktase</i> und der <i>Quinoid-Dihydropteridinreduktase</i> auf RNA-Ebene .....	27
3.2.5	Expression der induzierbaren <i>NO-Synthase (iNOS)</i> auf RNA-Ebene .....	27
4	Diskussion .....	28
4.1	Ausblick .....	35
5	Zusammenfassung.....	36

6	Abstract .....	38
7	Literaturverzeichnis .....	39
8	Danksagung .....	45
9	Lebenslauf.....	46
10	Schriftliche Erklärung.....	47

# 1 Einleitung

Schmerz ist nach der Definition der IASP („International Association for the Study of Pain“) „ein unangenehmes, heftiges Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlichen oder möglichen Gewebeschäden verbunden ist oder in solchen Kategorien beschrieben wird“ [1]. Während die akute Form dem Organismus als Warnfunktion dient, kann es bei anhaltenden oder wiederholten Schmerzereignissen zu pathophysiologischen Umstrukturierungen kommen, welche eine Schmerzchronifizierung begünstigen und den Schmerz abgekoppelt von der ursprünglichen Noxe zu einer eigenständigen Krankheitsentität werden lassen [2]. Chronische Schmerzen sind ein häufiges Problem in der Gesellschaft mit unterschiedlichen Prävalenzschätzungen, zwischen 2% und 40% [3] und einer Annahme von 15-16% Prävalenz behandlungsbedürftiger chronischer Schmerzzustände in der Bevölkerung [4]. Ungefähr 5 Millionen Deutsche leiden an chronischen Schmerzen [5]. Dies führt zu einer Reduktion der Lebensqualität, Arbeitsunfähigkeit und finanziellen Einbußen der Betroffenen. Auch das Sozialsystem hat enorme direkte und indirekte Kosten zu tragen [5].

Chronische Schmerzen lassen sich in Entzündungsschmerz und neuropathischen Schmerz unterteilen. Meist gehen sie mit Hyperalgesie und Allodynie einher. Die Genese der neuropathischen Schmerzen begründet sich häufig auf Störungen wie dem apoplektischen Insult, Multipler Sklerose, peripheren Nervenläsionen (Herpes-Zoster-Infektionen, diabetisch bedingter Polyneuropathie) oder mechanischer Nervenverletzung.

Die Chronifizierung des inflammatorischen Schmerzes kann aus einer Vielzahl von peripheren und zentralnervösen Umstrukturierungen resultieren. Aufgrund der vermehrten Übertragung von Aktionspotenzialen aus der Peripherie kommt es zu zentralnervösen Sensibilisierungsphänomenen, welche als neuronale Plastizität bezeichnet werden [6]. Hierzu gehört unter anderem die zentrale Bahnung der Schmerzimpulse [7] oder die Vergrößerung der rezeptiven Felder der Projektionsneurone im Hinterhorn [8].

Zu den Umstrukturierungsvorgängen im schmerzvermittelnden Reizleitungssystem gehören zudem eine verminderte Reizschwelle oder erhöhte Erregbarkeit primär sensorischer Nervenzellen [9], ein Verlust inhibitorischer Interneurone [10] oder eine veränderte synaptische Verarbeitung in der grauen Masse des Hinterhorns [11]. Auch eine Modifizierung der absteigenden, hemmenden Impulse aus dem Hirnstamm wurde gezeigt [12]. Auf molekularer Ebene wurden Prozesse beschrieben, welche an den peripheren und zentralen Umstrukturierungen der Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses beteiligt sind. Hier sind de-Novo-Gentranskription, post-transkriptionale Modifikation [13], neuroimmune Interaktion [14], neuronale Apoptose [10], Veränderungen der Rezeptorfunktion [15] und eine Änderung der Konduktivität bestimmter Ionenkanäle [16] zu erwähnen. Ein neuerer Mechanismus der genetischen Variabilität der Schmerzverarbeitung sind Mutationen des *GCH1*-Gens. Dies ist das Thema dieser Arbeit.

### 1.1 GCH1 und Tetrahydrobiopterin (BH4)

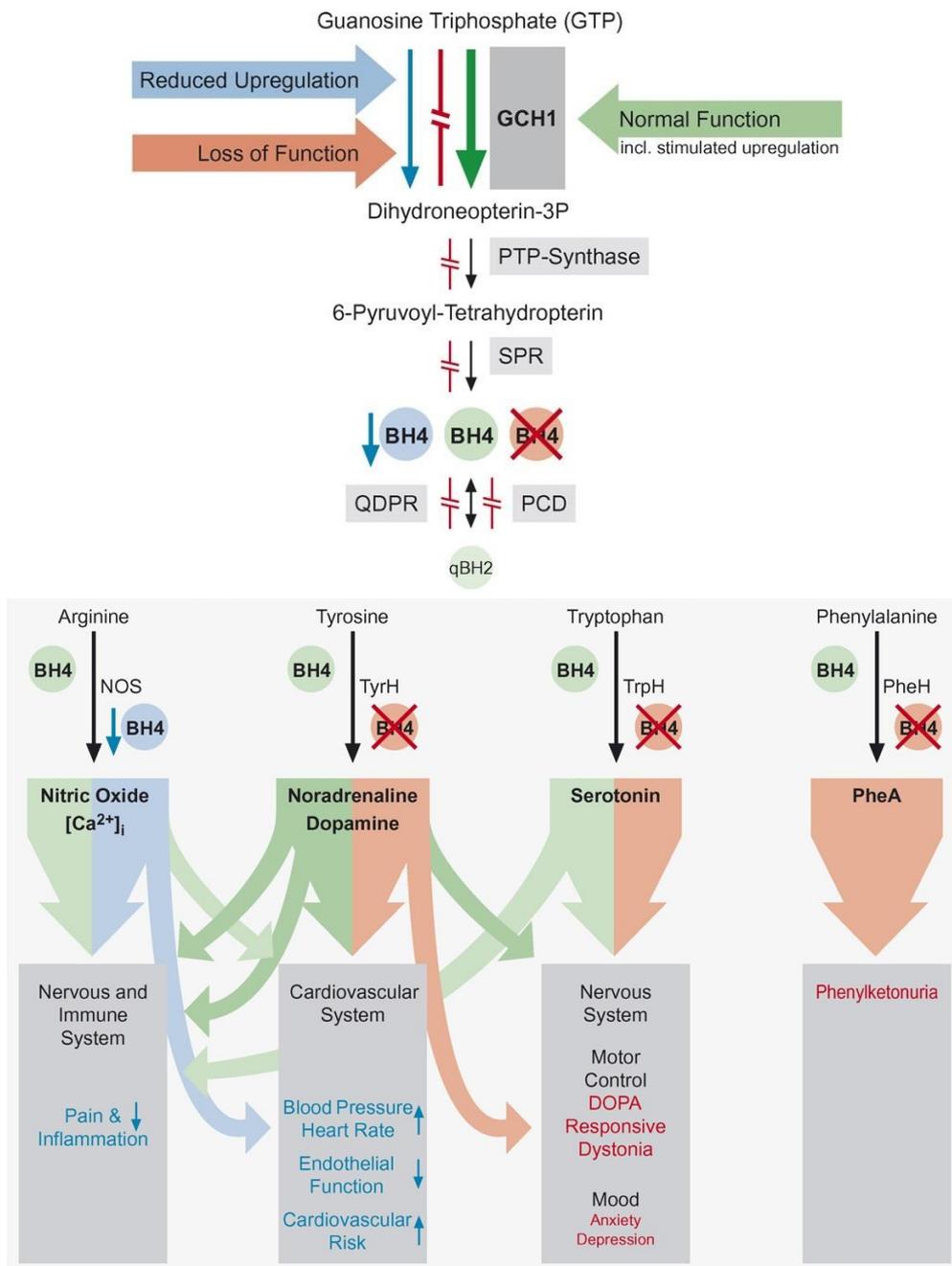
Zwillingsstudien [17, 18] und Untersuchungen mit Inzuchtnagetierstämmen [19] weisen auf eine bedeutende genetische Komponente bei der interindividuell unterschiedlichen Schmerzperzeption hin. Bei der Untersuchung von Regulierungsveränderungen im Anschluss an eine Ischiadikusnervläsion fielen zwei Gene auf, die hochreguliert wurden: Das Gen der Sepiapterinreduktase (SR) sowie der Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase-I (GCH1) [20]. In beiden Fällen handelt es sich um Enzyme, die essenzielle Rollen im Metabolismus von 6(R)-L-erythro-5,6,7,8-BH4 (BH4) spielen. Die GCH1 stellt den eng-regulierten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der BH4-Synthese dar.

BH4 spielt vor allem als Enzym-Co-Faktor eine Rolle in diversen Stoffwechselfvorgängen. So ist es unerlässlich für die Funktion der Phenylalaninhydroxylase [21], die für den Abbau und Umbau von Phenylalanin, unter anderem in Tyrosin, verantwortlich ist. Zudem für die Tyrosinhydroxylase [21], welche den Schritt von Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) katalysiert. DOPA wiederum kommt eine besondere Bedeutung in der Produktion von Katecholaminen wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin zu, spielt aber auch bei der Melanogenese in der Haut eine Rolle [22]. Als Co-Faktor für die Tryptophanhydroxylase ist BH4 essenziell für die Synthese von Serotonin [21].

Überdies wird es als Co-Faktor für drei Isoformen der NO-Synthase benötigt [21] und beeinflusst hierdurch die Blutplättchenaggregation [23], die Aktivität von Makrophagen [24], die Erweiterung von Blutgefäßen und das schmerzverarbeitende System [25]. Auch bei der Zellproliferation spielt es eine Rolle [26]. Neben der Co-Enzym-Funktion fand sich eine nicht NO-vermittelte Aktivierung von Kalziumströmen durch BH4 [27].

Variierung der Produktionsmenge von BH4 geschieht unter anderem durch Änderung der Transkriptionsrate des Gens [28], durch Modifizierung der enzymatischen Aktivität von GCH1 [29], durch posttranslationale Phosphorylierung der GCH1 [30], durch BH4-Rückkopplungs-Regulierung oder durch Vorwärtsaktivierung der GCH1 durch Phenylalanin [31].

Das *GCH1*-Gen wurde auf Chromosom 14q22.1-22.2 liegend identifiziert und besteht aus sechs kodierenden Abschnitten (Exons) [32]. Mutationen der kodierenden Regionen (Exons) des *GCH1*-Gens und des Gens für die Sepiapterinreduktase (SR) können zu einem Funktionsverlust und nachfolgenden Mangel oder der Abwesenheit von BH4 führen. Dieser Mangel kann beispielsweise zu atypischer Hyperphenylalaninämie führen, welche sich, ähnlich wie die typische Phenylketonurie (PKU) im Säuglingsalter manifestiert [33]. Als Folge der gestörten Funktion der Tyrosinhydroxylase und des Mangels an DOPA wird die, auf L-DOPA-Therapie ansprechende Dystonie (DRD = „dopa responsive dystonia“) beschrieben [34]. Sie wird auch als vererbliche progressive Dystonie (HPD) bezeichnet [32] und zeigt eine parkinsonoide Symptomkonstellation mit posturaler und tageszeitabhängig fluktuierender Dystonie und Tremor. Die autosomal dominante *GCH1*-Defizienz wird als Segawa-Erkrankung bezeichnet und tritt bei heterozygoten Trägern eines mutierten Haplotyps auf [35]. Darüber hinaus gibt es eine wesentlich seltenere rezessive Form der *GCH1*-Defizienz [36], welche im Säuglingsalter durch Rigidität, Tremor, Dystonie, Schluckstörungen und psychomotorische Retardierung auffällt. Als Ursache für die *GCH1*-Defizienz wurden mehrere unabhängige Mutationen des *GCH1*-Gens aufgedeckt. So wurden Exondeletionen [37, 38], verschiedene Polymorphismen, die zu nicht-konservierenden Aminosäureaustauschen führen [32], sowie eine Zwei-Basen-Insertion, welche direkt nach dem Startkodon zu einer Verschiebung des Leserasters führt [32] als ursächlich für einen Funktionsverlust der *GCH1* beschrieben.



**Abbildung 1** Synthese und Funktion von BH4

Tetrahydrobiopterin Synthesepfad, mit dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym GCH1 und den funktionellen, klinischen Auswirkungen. GCH1-Expression und GCH1-Aktivität werden durch Entzündung, Mastzell-Stimulation, ischämischen Infarkt oder periphere Nervenläsion hochreguliert. Dies führt zu einer verstärkten BH4-Synthese. Überschüssiges BH4 in peripheren, sensorischen Nervenzellen nach axonaler Verletzung trägt zum Phänomen des neuropathischen Schmerzes bei. Dies wird unter anderem durch erhöhten Kalziumeinstrom und Stickoxidproduktion bedingt. Inhibition der GCH1-Aktivität oder verminderte GCH1-Hochregulierung reduziert die Schmerzbewertungen in verschiedenen experimentellen Schmerzmodellen.

In Blutgefäßen ist die Endothel-ständige NO-Produktion durch eNOS abhängig von BH4. Relative BH4-Defizienz führt zu einer Verminderung von eNOS-vermittelten Oxidations-Reduktions-Schritten, woraufhin mehr reaktive Sauerstoffspezies anstatt NO vorhanden sind, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führen. Im Gehirn ist BH4 unerlässlich für die Produktion von Serotonin und Dopamin.

**Abkürzungen:** **GTP** Guanosintriphosphat; **GCH1** GTP-Cyclohydrolase-1; **PTPS** 6-Pyrovoyl-Tetrahydropterinsynthase; **SPR** Sepiapterinsynthase; **QDPR** Quinoid-Dihydropteridinreduktase; **PCD** Pterin-4 $\alpha$ -Carbinolamindehydratase; **BH4** Tetrahydrobiopterin; **BH2** Dihydrobiopterin; **nNOS** neuronale Stickoxidsynthase; **iNOS** induzierbare Stickoxidsynthase; **eNOS** endotheliale Stickoxidsynthase; **NO** Stickoxid; **PheH** Phenylalaninhydroxylase; **PheA** Phenylalanin; **TyrH** Tyrosinhydroxylase; **DA** Dopamin; **NA** Noradrenalin; **5-HT** Serotonin; **TrpH** Tryptophanhydroxylase; **ONOO-** Peroxynitrit; **BP** Blutdruck; **CAD** Kardiovaskuläre Erkrankung.

(Abbildung aus: Doebring, A., et al., *Clinical genetics of functionally mild non-coding GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) polymorphisms modulating pain and cardiovascular risk. Mutat Res, 2008. Sep-Oct;659(3):195-201. Epub 2008 Apr 26.*)

Mutationen des *GCH1*-Gens mit Funktionsverlust sind äußerst selten, häufig hingegen sind *GCH1*-Polymorphismen, die keine bedeutende Einschränkung der Basisfunktion des BH4-Stoffwechsels mit sich bringen und allenfalls die Nettomenge an BH4 verändern. So sind in der Datenbank des NCBI bisher 357 Polymorphismen des *GCH1*-Gens gelistet.

In einer prospektiven Beobachtungsstudie mit 168 chronischen Schmerzpatienten nach Diskektomie fanden sich von 15 Polymorphismen in den nicht-kodierenden Regionen des *GCH1*-Gens, welche sich gleichmäßig über die gesamte Länge des *GCH1*-Gens erstrecken eine reduzierte Schmerzempfindlichkeit für fünf SNPs [39, 40]. Hieraus konnte durch schrittweise Regressionsanalyse ein bestimmter *GCH1*-Haplotyp mit einer Allel-Frequenz von 15,4 % identifiziert werden, der mit besonders niedrigen Schmerzeinschätzungen korrelierte [41] und somit nachfolgend als schmerzprotektiver *GCH1*-Haplotyp bezeichnet wird. In einer weiteren Untersuchung wurden die Schmerzschwellen von gesunden Probanden für Druckschmerz, thermischen und Ischämie-bedingten Schmerz getestet. Hierbei zeigten sich für homozygote Probanden dieses Haplotyps signifikant niedrigere Schmerzbewertungen bei mechanischen Schmerzmodellen und Tendenzen für höhere Schmerzschwellen bei Hitze und Ischämie bedingtem Schmerz [27].

In Vollblutproben und isolierten mononukleären Blutzellen der homozygoten Träger des schmerzprotektiven Haplotyps fanden sich nach Stimulation niedrigere BH4- und GCH1-Werte als bei der Kontrollgruppe der Nichtträger [27]. Die Basiswerte zeigten jedoch keinen genotypabhängigen Effekt [27]. Dies könnte die Abwesenheit von schweren gesundheitlichen Beeinträchtigungen im Vergleich zu den seltenen Mutationen mit Funktionsverlust erklären [35-38, 42]. Auch liegt die Möglichkeit nahe, dass sich die Eigenschaften des schmerzprotektiven Haplotyps nur unter sensitisierten Bedingungen messbar auswirken.

## 1.2 Fragestellung

Nachfolgend soll der Einfluss des schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyps auf die Funktion und Expression von GCH1 und BH4 und auf den Schmerzphänotyp unter nicht-sensitisierten und insbesondere unter sensitisierten Bedingungen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienpopulation

#### 2.1.1 Ethische Voraussetzungen

Das Studienprotokoll steht in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki 1996, betreffend Forschung am Menschen im biomedizinischen Bereich (Somerset West Novelle). Es wurde zudem von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland anerkannt.

#### 2.1.2 Probandenauswahl

Als Einschlusskriterien galten neben der Volljährigkeit und Mündigkeit eine freiwillige Teilnahme nach Aufklärung über Nutzen und Risiko der Prüfungen mit schriftlichem Einverständnis sowie der Bereitschaft zur Blutentnahme und Genotypisierung. Zudem wurde vorausgesetzt und durch Blut- und körperliche Untersuchung seitens des Studienarztes validiert, dass die Probanden eine unauffällige medizinische Anamnese hatten. Diese zielte vor allem auf Intaktheit des Herz-Lungen-, Leber- und Nierensystems ab. Ein „Body Mass Index“ (BMI) von weniger als  $30 \text{ Kg} / \text{m}^2$  wurde vorausgesetzt.

Als Ausschlusskriterien galten die gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung, regelmäßige Medikamenteneinnahme (mit Ausnahme von Kontrazeptiva) oder eine bestehende Schwangerschaft. Ein pathologischer Alkoholkonsum oder Abhängigkeit von Drogen oder Medikamenten führte ebenfalls zu einem Ausschluss von der Studie. Weiterhin wurden chronische Erkrankungen, akute oder chronische Schmerzen und jegliche Störungen, die Nerven und Nozizeption beeinträchtigen, als Ausschlusskriterien gewertet.

Die Studienpopulation bestand aus elf homozygoten Trägern (davon acht männliche und drei weibliche Subjekte; Alter  $28.1 \pm 2.9$  Jahre) und dreiundzwanzig Nichtträgern des schmerzprotektiven GCH1-Haplotyps (davon vierzehn männliche und neun weibliche Subjekte; Alter  $28.6 \pm 5.2$  Jahre). Die Studie war, den GCH1-Genotyp betrachtend, doppelblind konzipiert.

## 2.2 Studiendesign

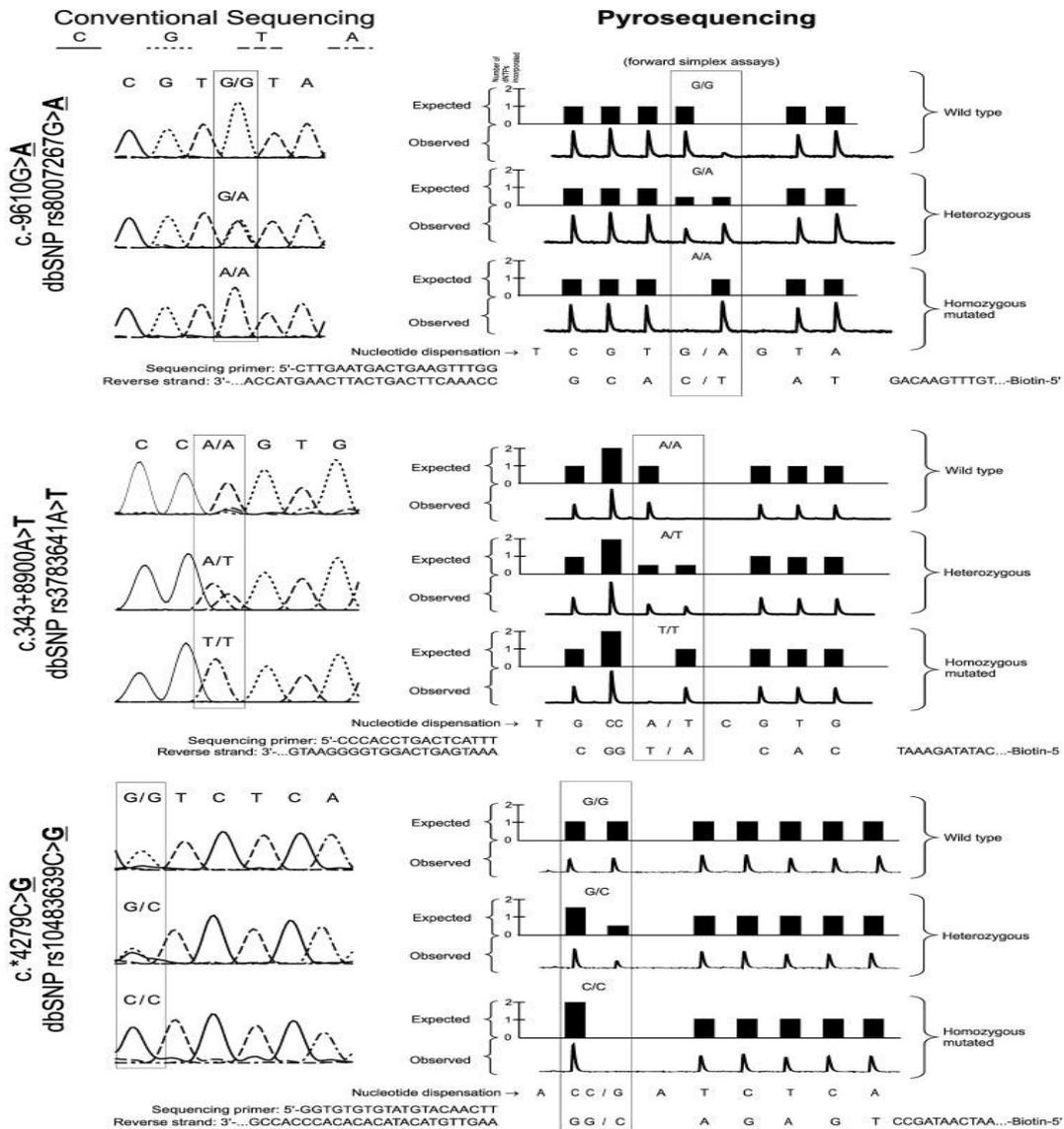
Die Experimente fanden für die Studienteilnehmer unter identischen Bedingungen in einem ruhigen Raum im Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland statt. Die Studienteilnehmer hatten keine Sicht auf die Testgeräte, zudem gab es keine sichtbaren oder hörbaren Zeichen, die einen Rückschluss auf die Reizintensität geben könnten.

## 2.3 Genotypisierung

Es waren im Vorfeld der Studie DNS Proben von 741 nicht-verwandten Subjekten mitteleuropäischer Abstammung verfügbar. Diese wurden zu einem Großteil von Medizinstudenten zur Verfügung gestellt. Alle gaben nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Genotypisierung. Zudem wurde für das Prozedere eine Genehmigung des Ethikrates eingeholt. Die DNS wurde aus 200 µl Vollblut extrahiert. Hierzu wurde das "blood and body fluid spin protocol", zugehörig zum „EZ1 DNS Blood 200 µl Kit“ der „BioRobot EZ1“ Arbeitseinheit (Qiagen, Hilden, Deutschland) angewendet.

Der schmerzprotektive Haplotyp wurde unter Zuhilfenahme eines validierten Pyrosequencing<sup>TM</sup> Raster Essays [43] festgestellt. Wie zuvor beschrieben [41, 43], ist die Diagnose des schmerzprotektiven GCH1-Haplotyps mit einer Verifizierung von lediglich drei GCH1-Polymorphismen möglich, welche den gesamten DNS-Abschnitt des Haplotyps umfassen:  $c.-9610G>A$  ( $rs8007267G>A$ ) in der 5' nicht-translatierten Region,  $c.343+8900A>T$  ( $rs3783641A>T$ ) im Intron 1, und  $c.*4279$  ( $rs10483639C>G$ ) in der 3' nicht-translatierten Region. Diese Methode hat eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%, den schmerzprotektiven GCH1-Haplotyp zu identifizieren.

Abbildung 2 Design des Genotypisierungsassays mit erwarteten und beobachteten Pyrogrammen zur Feststellung der *GCHI*-SNPs



Bei der Pyrosequenzierung wird dem Primer folgende Base für Base der komplementäre DNS-Strang synthetisiert. Wird eine Base eingebaut, zeigt sich dies durch einen Lichtimpuls. Die neun Pyrogramme zeigen die drei möglichen Genotypen für jede DNS-Position. Der initiale Teil, der mit der Lösung von Enzym und Substrat korreliert, wurde weggelassen. Für die konventionelle *GCHI*-Sequenzanalyse werden lediglich die Fragmente, die mit den Pyrogrammen korrelieren und für die Identifikation der SNPs (*relevante Positionen der SNPs für die Genotypenidentifizierung sind eingerahmt*) von Bedeutung sind angezeigt. Hierbei wurden die Nukleoside mit verschiedenen Linientypen differenziert. Es sei angemerkt, dass die Sequenzen von einigen SNPs der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) als reverser Strang geführt werden, entsprechend der Sequenz des Ensembl Gene ID ENSG00000131979.

Bei neun der homozygoten Träger dieses Haplotyps wurden die gesamten fünfzehn *GCH1*-Polymorphismen des schmerzprotektiven Haplotyps festgestellt, um die Rasteruntersuchungsmethode weitergehend zu validieren [43].

Die Allelfrequenz des schmerzprotektiven Haplotyps ist 14.7% mit einem binomial verteilten Konfidenzintervall von 12.9% bis 16.6%. Die Feststellung von 543 Nichtträgern, 178 heterozygoten sowie 20 homozygoten Trägern des *GCH1*-Haplotyps aus einer Gesamtpopulation von 741 genotypisierten Subjekten ist in Übereinstimmung mit den Erwartungen bei Verwendung des Hardy-Weinberg-Gesetzes [44].

## 2.4 Phänotypisierung

### 2.4.1 Ablauf

Mindestens 24 Stunden vor der Ergebniserhebung mussten die Probanden zu einer Trainingssitzung erscheinen, um sich mit den angewendeten Schmerzmodellen und den Experimentbedingungen vertraut zu machen. Die Probanden sollten ihre individuelle Schmerzschwelle vor der Aufzeichnung der Daten fühlen und verbalisieren können. Hierzu wurde zunächst der Unterschied zwischen Schmerzschwelle und Schmerztoleranz erklärt und im Verlauf der Experimente betont, bei welchem Schmerztest welcher Parameter zu beurteilen ist.

Da die Schmerzschwelle ein minimales Schmerzereignis darstellt, muss der Proband trainiert werden, sich auf die erzeugte Sensation zu konzentrieren. Bei kleinsten Schmerzreizen kann Ablenkung zu einer falsch-negativen Einschätzung führen. Hinsichtlich der Schmerztoleranz ist das Training erforderlich, da es ein sehr unangenehmer Vorgang ist, sich freiwillig an die Schmerzgrenze heranzutasten. In der Trainingssitzung brechen die Probanden häufig bei einer niedrigeren Intensität ab, da eine ängstliche Erwartungshaltung besteht. Ziel der Trainingseinheit ist hier, diese zu minimieren und einen hohen Grad an Compliance zu erreichen.

Die punktuell-mechanische Druckschmerzschwelle wurden mit Hilfe der von Frey-Haare ermittelt. Der Proband war gegenüber der Teststelle und den Testinstrumenten verblindet und sollte beurteilen, ob es sich bei dem erzeugten Reiz lediglich um ein Druckgefühl handelt - also kein Schmerz, oder ob eine minimale Schmerzsensation in Form eines Stechens oder „Piekens“ wahrnehmbar ist. Auch für die stumpfe Druckschmerzschwelle und die thermische Schmerzschwelle wurden die Probanden instruiert, auf ein minimales Schmerzereignis zu achten und dies anzuzeigen. Es wurde jeweils ein Durchlauf der Experimente durchgeführt.

Für das elektrische Schmerzmodell und die Ermittlung der Schmerztoleranz gliederte sich das Training in zwei Modi. Zunächst wurde den Getesteten die volle Eigenkontrolle gegeben. Die Intensität konnte im Sinne der Stromstärke mit einer Steigerungsrate von 0.2 Milliampere pro Sekunde graduell vom Ausgangswert Null Milliampere bis 20 Milliampere erhöht werden. Dies wurde durch gedrückt halten eines Knopfes erreicht und konnte durch Loslassen unterbrochen werden, wenn der Schmerz intolerabel wurde.

Dieses Prozedere wurde einige Male wiederholt, wobei der Proband sich im Verlauf der Trainingssitzung an die tatsächliche Schmerztoleranzschwelle annäherte. Im Anschluss wurde der eigentliche Experimentmodus einmal trainiert. Hierbei muss der Getestete verschiedene Reize von je zwei Sekunden Dauer als tolerabel oder intolerabel bewerten, bis die Schmerztoleranzschwelle eingegrenzt werden kann.

Die Experimente fanden in einem Zeitraum von 48 Stunden statt. Im Anschluss an einen vollständigen ersten Durchlauf der Experimente am ersten Tag wurde die Kälteläsion erzeugt und das venöse Vollblut für die Laboruntersuchungen abgenommen. 24 Stunden später begann die Durchführung des zweiten Testdurchlaufs. Anschließend wurde die Capsaicin-Creme aufgetragen und weitere drei Testdurchläufe mit Test-zu-Test Abstand von jeweils 90 Minuten durchgeführt.

#### 2.4.2 Experimenteller Schmerz

Die Probanden wurden im Rahmen der experimentellen Schmerzmessung durch Modelle mit (Wärme und punktueller Druck durch von Frey-Haare) und ohne Sensitisierung (stumpfer Druck und biphasischer Konstantstrom) auf ihre individuelle Schmerzschwelle, beziehungsweise Schmerzgrenze hin getestet.

### 2.4.2.1 Punktuell-mechanischer Druck und Kälteläsion

Einen Tag vor dem eigentlichen Schmerzexperiment wurde dem Probanden eine vorübergehende hautständige Entzündung zugefügt, indem ein kleines Hautareal an der volaren Unterarmseite kurzzeitig eingefroren wurde [45-48]. Ein Kupferzylinder mit 15 Millimeter Durchmesser und 290 Gramm Gewicht wurde mit Hilfe von Trockeneis gekühlt und unter permanenter Temperaturüberwachung bei genau minus 30°C in einem rechten Winkel zum Unterarm mit der Bodenseite auf das zu gefrierende Areal gesetzt. Die Applikationszeit betrug genau acht Sekunden. Es wurde kein Druck zusätzlich zum Eigengewicht des Kupferzylinders appliziert. Um einen optimalen thermischen Kontakt des Zylinders zur Haut zu gewährleisten, wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung getränktes Filterpapier zwischen Kupferstab und Haut gelegt, welches ebenso einen Durchmesser von 15 Millimeter hatte.



**Abbildung 3 Applikation der Kälteläsion**

Durch achtsekundige Aufbringung eines minus 30°C kalten Kupferzylinders auf die Haut des medialen, volaren Unterarms wird eine hyperpigmentierte Kälteläsion erzeugt, welche im Sinne einer lokalen Entzündung 24 Stunden nach Applikation eine stabile Hyperalgesie erzeugt. Mit Hilfe eines Widerstandsmessgeräts wird über einen, am Kupferstab befindlichen Kupferdraht die exakte Temperatur bestimmt. Die Kühlung wird durch Trockeneis gewährleistet.

Das Prozedere löst eine brennend-stechende Schmerzsensation aus, welche ungefähr ein bis zwei Stunden anhält [46]. Jeglicher Spontanschmerz legt sich in einem Zeitraum von ein bis zwei Stunden nach Anbringen der Kälteläsion. Die Läsion bleibt für einige Tage gerötet und sensitisiert für mechanische Schmerzreize. Wir nutzten in dem Experiment die zuvor beschriebene stabile Hyperalgesie, welche in dem Zeitraum 24 Stunden nach Setzen der Kälteläsion besteht [47]. In genau diesem Zeitraum fanden die Schmerzversuche an der Läsion statt.



**Abbildung 4 Schmerztestung mit einem von Frey-Haar auf einer Kälteläsion**

Die 24 Stunden zuvor applizierte Kälteläsion stellt sich als kreisrundes, hyperpigmentiertes Hautareal in der Bildmitte dar. Hierauf wird mit Hilfe von von Frey-Haaren die Schwelle für punktuell-mechanischen Druckschmerz ermittelt. Zwanzig verschiedene Haare

mit Applikationsdrücken von 0.008g bis 300g werden im 90°-Winkel in randomisierter Reihenfolge auf die Kälteläsion gesetzt und leicht durchgebogen. Der verblindete Proband muss angeben, ob hierbei Schmerz spürbar ist.

Die Schmerzschwelle für punktuelle mechanische Druckstimuli wurde mit Hilfe von von Frey-Haaren ermittelt. Diese sind in verschiedenen Stärken von 0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26, 60, 100, 180 und 300 Gramm verfügbar [49].

Die von Frey-Haare wurden rechtwinklig auf das Areal der Kälteläsion gesetzt und leicht durchgebogen, um den Gewichtsdruck des Haares aufzubauen. Die verschiedenen Stärken der von Frey-Haare wurden in randomisierter Reihenfolge getestet und die Probanden gebeten, einzuschätzen, ob ihre Schmerzschwelle überschritten wurde.

Die Schmerzschwelle für punktuelle mechanische Druckstimuli wurde durch logistische Regression der „ja/nein“ Antworten für die verschiedenen von Frey-Haare ermittelt. Die Schmerzschwellen wurden vor Setzen der Kälteläsion mit je zwei Basiswerten, sowie 24, 26 und 28 Stunden nach Gefrierung des Hautareals ermittelt. Für den Schwellenwert unter Hyperalgesie Bedingungen wurde das geometrische Mittel der drei Schmerzschwellenmesswerte nach Setzen der Kälteläsion bestimmt. Drei der homozygoten Träger des schmerzprotektiven Haplotyps verweigerten die Applikation der Kälteläsion.

#### 2.4.2.2 Thermischer Schmerz und Sensitisierung mit Capsaicin

Capsaicin ist der scharfe Inhaltsstoff in Chilischoten und Cayennepfeffer und wird aus Pflanzen der Gattung *Capsicum* gewonnen. Capsaicin-induzierte Hyperalgesie äußert sich als eine brennende Sensation [50] aufgrund einer spezifischen Reizung der Vanilloidrezeptoren [51]. Die Stimulierung dieser Rezeptoren führt zu einer Hyperämie, die mit Erwärmung und Rötung der Haut einhergeht. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Vanilloidrezeptoren gleichsam durch Hitze im noxischen Bereich gereizt werden und der Körper durch die Mehrdurchblutung eine Wärmeabfuhr aus dem betreffenden Hautareal bewirken will. Im klinischen Alltag wird es in Form von Wärmepflastern für rheumatische oder muskuloskeletale Schmerzbeschwerden verwendet und wegen seiner durchblutungsfördernden Wirkung in der oralen Therapie eingesetzt, um die Magensaftsekretion und Darmperistaltik anzuregen. Bei häufiger Anwendung kann es zu einer Desensibilisierung kommen, wie zum Beispiel beim regelmäßigen Verzehr scharfer Speisen zu beobachten ist. Eine übermäßige Exposition eines Hautareals mit Capsaicin kann sekundär eine Analgesie bewirken, da die Nozizeptoren durch eine Überreizung absterben können und sich regenerieren müssen.

Wird Capsaicin unter die Haut injiziert, wirkt es stark schmerzhaft und hat anhaltende sensorische Veränderungen zur Folge [52, 53]. Durch lokale Applikation von 0.1-1.0-prozentiger Capsaicin-Creme lässt sich eine kurzzeitige kontrollierte Hyperalgesie erzeugen [53-55].

Der thermische Schmerzschwellenwert wurde mithilfe des TSA II, eines Wärmeapplikationsgerätes von „Medoc Advanced Medical Systems Ltd.“ (Ramat Yishai, Israel) ermittelt. Dies ist ein computergestütztes Gerät zur quantitativen Erfassung der Funktion von dünn myelinisierten A-Fasern sowie unmyelinisierten C-Fasern [56]. Den Probanden wurde eine drei mal drei Zentimeter breite Metallthermode auf die volare Unterarmseite aufgesetzt und mit einem Klettband rutschsicher befestigt. Eine schmerzhafteste Drucksensation durch die Thermodenbefestigung wurde durch Nachfrage ausgeschlossen. Die Thermode wurde vom Computer aus bedient und ließ die Temperatur, welche auf die Haut übertragen wurde, stetig von einem Anfangswert von 30 Grad Celsius bis maximal 53 Grad Celsius ansteigen.

Der Proband wurde angewiesen, bei der ersten wahrnehmbaren Schmerzempfindung einen Knopf zu drücken, welcher für den Verlauf des Experiments in Reichweite der Hand des Subjekts untergebracht war. Dieser Wert ist definiert als die thermale Schmerzschwelle. Nach Drücken des Knopfes kühlt sich die Thermode rapide auf die Grundtemperatur von 30 Grad Celsius zurück. Hitzestimuli sind in dieser Form acht Mal pro Versuchsdurchgang angewendet worden. Nach den Abkühlungen fand jeweils eine Pause von randomisierter Länge zwischen 30 und 45 Sekunden statt. Das arithmetische Mittel der acht Schmerzschwellenwerte wurde als Hitzeschmerzschwelle des jeweiligen Probanden errechnet.

Nach Durchführung der ersten zwei Messläufe wurden diese Schmerzschwellenwerte als Basiswerte definiert. Darauf folgend wurde auf die drei mal drei Zentimeter große Messstelle Capsaicincreme aufgetragen (0.1 Prozent, hergestellt von der Apotheke der Frankfurter Uniklinik) und das Areal mit einem transparenten Pflaster abgedeckt. Bis zu einem letzten Wert drei Stunden nach Capsaicinauftragung wurden stündlich weitere Messläufe durchgeführt. Die thermale Schmerzschwelle unter Hyperalgesiebedingungen wurde als Median der drei postapplikatorisch gemessenen Werte festgelegt.

#### 2.4.2.3 Stumpfer Druck

Um die Druckschmerzschwelle zu erfassen, wurde ein Algometer mit einem flachen Zylinder von einem Zentimeter Durchmesser (Commander Algometer, J Tech Medical Industries, Midvale, Utah; maximum output = 111.6 N/cm<sup>2</sup>) bestückt. Dieser wurde rechtwinklig auf der Mittelphalanx des rechten Mittelfingers aufgesetzt und der Druck auf dieses Areal stetig erhöht. Die maximale Steigerungsgeschwindigkeit betrug neun N/cm<sup>2</sup> pro Sekunde. Die Drucksteigerung wurde beendet, sobald der Proband eine Schmerzempfindung benennen konnte und dieser Wert als Druckschmerzschwelle notiert. Dieses Vorgehen wurde pro Versuchsdurchgang mit einer Pause zwischen den Drucksteigerungen von 30 Sekunden jeweils vier Mal wiederholt. Schließlich wurde der Median der fünf Messungen als Schmerzschwelle für stumpfen Druck errechnet. Insgesamt wurden auf diese Art und Weise fünf Schmerzschwellen ermittelt und das arithmetische Mittel für den interindividuellen statistischen Vergleich herangezogen.

#### 2.4.2.4 Elektrischer Schmerz

Elektrischer Schmerz wurde mit Hilfe eines Konstantstromgeräts (Neurometer<sup>®</sup> CPT, Neurotron Inc., Baltimore, MD) erzeugt. Es liefert biphasische Stimuli mit einer Frequenz von fünf Hertz, für welche die vorwiegende Aktivierung von C-Fasern bekannt ist [57-59]. Die elektrischen Reize wurden durch zwei Goldelektroden abgegeben, welche jeweils an der lateralen sowie medialen Flanke des distalen Fingerglieds befestigt wurden und zur stabilen Positionierung durch ein 1.5 Zentimeter langes Plastikband verbunden sind. Der Hautwiderstand wurde durch die Anwendung einer Scheuerpaste (Prep-Paste, Neurotron Inc., Baltimore, MD, USA) und Anbringung eines Elektrodengels (GTGL-10 Electrode Gel, Neurotron Inc., Baltimore, MD, USA) reduziert. Der Anbringungsort war der Mittelfinger der rechten Hand. Analog zum zweiten Trainingsmodus wurden die Probanden Stromreizen von je zwei Sekunden Dauer ausgesetzt. Die Stimulation begann mit einer nicht schmerzhaften Stromstärke. Hierfür wurde ein niedriger und randomisierter Startwert gewählt. Bei den folgenden Reizen wurde die Stromstärke jeweils erhöht, bis der Proband einen Reiz als nicht tolerierbar angab.

Die Stärke der darauf folgenden Stimuli wurde in Abhängigkeit von den zwei vorangehenden Antworten des Probanden ermittelt. Falls die vorherigen Antworten „tolerierbar – tolerierbar“ oder „nicht tolerierbar – nicht tolerierbar“ waren, wurde der nächste Stimulus wie folgt festgelegt: Die letzte verabreichte Reizstärke plus respektive minus 130% der Differenz der letzten und der vorletzten verabreichten Reizstärke. War die Antwortkonstellation auf die vorangegangenen zwei Reizstärken „nicht tolerierbar – tolerierbar“ oder „tolerierbar – nicht tolerierbar“, wurde die Stärke des nächsten Reizes wie folgt ermittelt: Die vorletzte verabreichte Reizintensität plus 75%, respektive plus 25% der Differenz der Stromstärke zwischen dem letzten und vorletzten verabreichten Stimulus. Die Absicht dieses Algorithmus ist, die Reizstärke schneller zu verändern, solange die Probanden uniforme Antworten geben, wenn eine Änderung der Antwort auftritt jedoch den aktuellen Stromstärkebereich mit einer größeren Auflösung zu testen. Dies führt dazu, dass man die tatsächliche Schmerztoleranz des Subjekts mit zehn oder weniger Reizen auf einen fünfprozentigen Bereich eingrenzen kann und die Probanden nicht durch eine hohe Quantität an schmerzhaften Reizen überstrapaziert werden.

Zwischen den Reizen wurden den Getesteten Pausen von mindestens 60 Sekunden eingeräumt, welche gerade bei höheren Stromstärken bedarfsweise erweiterbar waren. Im Anschluss wurde die Toleranzschwelle durch logistische Regression aus den Antworten „tolerierbar“ und „nicht – tolerierbar“ (analog zu „0“ und „1“) ermittelt. Auf diese Art und Weise wurden insgesamt fünf Schmerztoleranzwerte ermittelt. Die Abstände zwischen den Messungen betragen mindestens 90 Minuten. Dieses Schmerzmodell ist zuvor etabliert worden [47, 60, 61].

### 2.4.3 Probengewinnung und Probenvorbereitung

Um mononukleäre Blutzellen zu isolieren, wurden den Probanden zunächst peripheres venöses Blut in neun Milliliter BD Vacutainer™ CPT™ Röhrchen abgenommen, welche mit Natrium-Heparin vorbestückt sind. Nach Zentrifugierung wurde die mononukleäre Zellschicht in 15mL Falcon Röhrchen mit einem Kulturmedium übertragen und nach Pelletierung die Zellen im Medium resuspendiert, gezählt und gleichmäßig auf sechs Kulturplatten (Durchmesser: 5 Zentimeter) aufgeteilt.

Es erfolgte eine Kultivierung in RPMI 1640 Medium mit 5% FCS (hitzeinaktiviertes, fetales Kalbsserum), 2 mM L-Glutamin, 100 IU/mL Penicillin und 1 µg/mL Streptomycin bei 37°C in fünf-prozentiger CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Drei Kulturplatten wurden als unstimulierte Kontrollen verwendet und drei weitere mit 1 µg/mL Lipopolysacchariden (LPS) für 24 Stunden stimuliert. Die Kontrollplatten und die stimulierten Platten wurden schließlich der mRNA-, Protein- und Biopterinanalyse zugeführt. Für die Vollblutgewinnung und Stimulation wurden peripher, venöse Vollblutproben in zwei neun Milliliter BD Vacutainer™ CPT™ Röhrchen gegeben, welche zur Antikoagulation Natrium-Heparin enthalten. Eine Probe wurde mit Forskolin bestückt, sodass eine Konzentration von 10 µM erreicht wurde. Die zweite Probe wurde als Kontrolle nativ belassen. Die Proben wurden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 4.5% Kohlendioxid und 90% relativer Luftfeuchtigkeit für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden beide Röhrchen für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert und das Blutplasma abpipettiert. Bis zur flüssig-chromatographischen Messung der Biopterinkonzentration wurden die Proben konstant bei -80°C gelagert.

## 2.4.4 Expressionsanalyse von GCH1

### 2.4.4.1 Expressionsanalyse auf RNA-Ebene

Die Zellen wurden mit Trypsin in Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung geerntet, pelletiert, lysiert und die gesamte RNA extrahiert. Dies geschah in Anlehnung an das „spin protocol“ des „EZ1 RNA Cell Mini Kit“ an einem „BioRobot EZ1 Workstation“ unter Gebrauch der „EZ1 RNA Karte (Qiagen, Hilden, Germany)“. Die quantitative Echtzeit PCR für die Enzyme *GCH1*, Sepiapterinreduktase (*SPR*), Guinoid-Dihydropteridinreduktase (*QDPR*), und induzierbare NO-Synthase (*iNOS2*) ist vom IMG Labor, Martinsried, Deutschland auf einem TaqMan AB7900HT (Applied Biosystems) durchgeführt worden. Für die Quantifizierung ist die  $\Delta\Delta CT$ -Methode benutzt worden. Für jede Probe wurde die Differenz zwischen der Zyklusanzahl (Zyklusanzahl, um die Nachweisschwelle zu erreichen) der Ziel mRNA und jener des Referenz Gens Beta-Aktin (*Actb*) errechnet.

Dieser  $\Delta CT$ -Wert wurde mit dem arithmetischen Mittel der  $\Delta CT$  von den unstimulierten Basiswert - Proben der Nichtträger des schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyps normalisiert. Hierzu wurde die folgende Formel verwendet:

$$2^{(-\Delta CT)} / 2^{(-\Delta CT_{\text{baseline-non-carriers}})}$$

Um die interindividuellen Veränderungen zu berechnen, wurden mit folgender Formel die unstimulierten Werte gegen die Werte nach LPS Stimulation gesetzt:

$$2^{(-\Delta CT_{\text{LPS}})} / 2^{(-\Delta CT_{\text{baseline}})}$$

#### 2.4.4.2 Expressionsanalyse auf Proteinebene

Die Zellen wurden in Phosphosafe® (Novagen) Zellyse- und Extraktionspuffer überführt, mit 16000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen gegeben. Für die Proteinanalyse wurde Bradford Reagenz benutzt. Die Proteine wurden auf 12% Polyacrylamidfertiggel (Biorad) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen (Millipore) transferiert und die Membranen mit Hilfe von Odyssey® Blockierungspuffer verriegelt. Daraufhin wurden die Membranen mit primären Antikörpern inkubiert. Hierbei kamen Anti-GCH1-Serum vom Kaninchen, welches sich gegen rekombinante GCH1 richtet, sowie Maus-Mab, das sich gegen die Erk2-Kontrolle (SantaCruz Biotechnology) richtet, zum Einsatz. Die Verbindung wurde mit IRDye™ 800 (Licor) sichtbar gemacht, und Alexa-Fluor 680 (Molekular Proben) zeigte sekundär Antikörper mit Hilfe eines Odyssee Infrarot Bildgebungsystems (Licor) an. Es wurden pro Probe drei Western Blots angefertigt und das arithmetische Mittel der drei GCH1/Erk-2 Verhältnisse herangezogen, um die individuelle Steigerung der GCH1-Proteinmenge nach LPS-Stimulation zu errechnen.

#### 2.4.5 Funktionsanalyse von GCH1

Die Konzentrationen von Biopterin in den Zellysaten, Dialysaten und Vollblutproben wurden anhand der Flüssig-Chromatografie-Methode festgestellt, welche auf einem Tandem-Vierfach-Massenspektrometer (PE Sciex API 4000; Applied Biosystems) mit einer Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt wurde. Diese Methode ist zuvor von Tegeder et al. beschrieben worden [27].

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Daten sind graphisch als Boxplot-Diagramme dargestellt, welche jeweils das 95-prozentige Konfidenzintervall, den Median, das arithmetische Mittel und die individuellen Ergebniswerte der Probanden enthalten.

Für die Datenanalyse wurde das Prinzip der logistischen Regression herangezogen, um Einflusswerte festzustellen, anhand dessen man die Zugehörigkeit eines Probanden zu einer der beiden Versuchsgruppen (schmerzprotektiver versus Wildhaplotyp) feststellen kann. Als mögliche Einflussgrößen wurden die Ergebnisse der sechs Experimente (Schwelle bei stumpfem Druckschmerz, thermischem Schmerz ohne und mit Hyperalgesie, punktuell-mechanischem Schmerz ohne und mit Hyperalgesie und Toleranz bei elektrisch-induziertem Schmerz) herangezogen. Diese wurden z-transformiert und einer binären logistischen Regression mit der Fragestellung nach An- oder Abwesenheit des schmerzprotektiven Haplotyps (im Sinne von „0“ und „1“) zugeführt. Die Variablen wurden hierbei schrittweise (beide Richtungen) in die logistische Regression eingefügt und das Likelihoodverhältnis als statistisches Kriterium herangezogen. Daraufhin wurde mit den Daten ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt und untransformierte Daten zwischen den beiden Genotypen mittels ungepaarten t-Tests verglichen.

Die Änderungen der mRNA- und Proteinexpression, die durch die Forskolin- und LPS-Stimulation bedingt wurden sowie die Änderungen der Biopterinkonzentrationen wurden zwischen den Versuchsgruppen mittels wiederholten ANOVA-Messungen verglichen. Zusätzlich wurden die Träger und Nichtträger des schmerzprotektiven Haplotyps, bei denen die Änderung der Proteinexpression mindestens den dreifachen Wert erreichte mit den Probanden verglichen, bei denen die Veränderungen gering waren und dieser Wert nicht erreicht wurde. Dies geschah mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests.

Die Statistiken wurden mit dem Programm „Systat 12“ (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) durchgeführt und das  $\alpha$ -Level bei 0.05 gesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Schmerzphänotyp

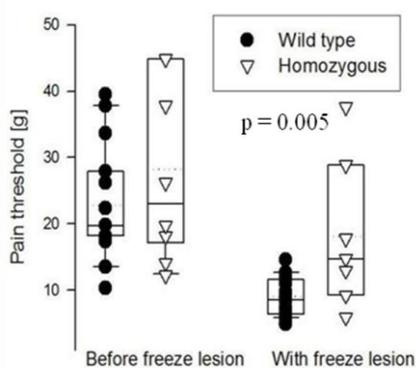
Die Studienpopulation bestand aus elf homozygoten Trägern (davon acht männliche und drei weibliche Subjekte; Alter  $28.1 \pm 2.9$  Jahre) und dreiundzwanzig Nichtträgern des schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyps (davon vierzehn männliche und neun weibliche Subjekte; Alter  $28.6 \pm 5.2$  Jahre). Ausgeschlossen von der Endauswertung wurde jeweils ein Subjekt pro Gruppe. Dies geschah aufgrund von pathologischen Leberfunktionswerten sowie eines positiven Ergebnisses im „Beck Depressions Inventar“ (BDI) [62]. Alle Probanden waren innerhalb des Bereichs von plus oder minus zehn Prozent des idealen Körpergewichts mit einem „Body Mass Index“ von  $22.7 \pm 2.6$ .

#### 3.1.1 Schmerzmodelle mit Sensitisierung

##### 3.1.1.1 Punktuell-mechanischer Druck (von Frey-Haare)

Die relative Steigerung der Schmerzempfindlichkeit respektive das Absinken der Schmerzschwellen nach Hyperalgesieinduktion durch die Kälteläsion konnte gezeigt werden.

**Abbildung 5** Punktuell-mechanischer Druckschmerz (von Frey-Haare) vor und mit Kälteläsion



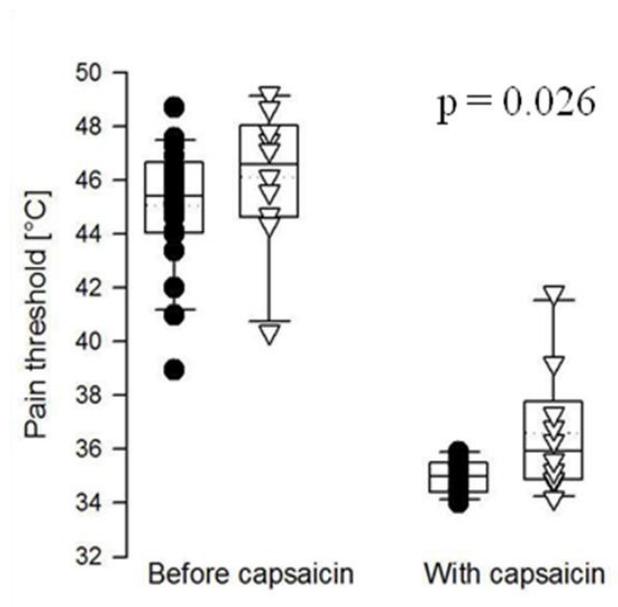
Schwellen für punktuell-mechanischen Druckschmerz, ausgelöst durch abgestufte Stärken von von Frey-Haaren bei homozygoten Trägern und Nichtträgern des *GCH1*-Haplotyps. Es wurden jeweils vor und während hyperalgetischem Zustand des getesteten Hautareals Schmerzschwellen ermittelt. Eine Hyperalgesie wurde mittels Kälteläsion erzeugt. Die Boxen spannen die 25.-75. Perzentile ein, der Median ist als durchgehende horizontale Linie dargestellt, das arithmetische Mittel als gepunktete horizontale Linie und die Whisker grenzen Werte ein, die innerhalb von 150% der 25.-75. Perzentile liegen. Die statistischen Unterschiede sind das Ergebnis von t-Test Gruppenvergleichen.

Nach Induktion der lokalen Entzündung durch die Kälteläsion wurde für Träger des schmerzprotektiven Haplotyps für von Frey-Haar-Reizung eine doppelt so große Schmerzschwelle ermittelt als für Wildtypen ( $18.1 \pm 11.3$  g gegenüber  $9 \pm 2.8$  g, arithmetisches Mittel und Standardabweichung). Nach logistischer Regression der Ja / Nein-Antworten (Ja = Schmerz / Nein = Kein Schmerz), ergaben der Chi-Quadrat-Test mit  $p=0.003$  und der T-Test mit  $p= 0.005$  klare Signifikanzen.

### 3.1.1.2 Thermischer Schmerz

Ohne Anwendung der logistischen Regression und im Zuge multipler Schmerztests mit unkorrigierten Signifikanzniveaus wurden hierbei für den schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyp signifikant höhere Schmerzschwellen festgestellt. Bei den Nichtträgern des *GCH1*-Haplotyps lag die Schmerzschwellentemperatur im arithmetischen Mittel bei  $35.2^{\circ}\text{C}$  mit einer Standardabweichung von  $0.9^{\circ}\text{C}$ . Für Träger zeigte sich im Mittel eine Schmerzschwelle von  $36.6^{\circ}\text{C}$  mit einer Standardabweichung von  $2.4^{\circ}\text{C}$ . Eine t-Test-Anwendung ergab ein Signifikanzniveau von  $p=0.026$ .

**Abbildung 6** Thermische Schmerzschwelle vor und während topischer Anwendung von Capsaicincreme



Schwellen für thermischen Schmerz, ausgelöst durch eine 3x3 cm breite Thermode bei homozygoten Trägern und Nichtträgern des *GCH1*-Genotyps. Es wurden jeweils vor und während hyperalgetischem Zustand des getesteten Hautareals Schmerzschwellen ermittelt. Eine Hyperalgesie wurde mittels topischer Anwendung von Capsaicincreme erzeugt. Die Boxen spannen die 25.-75. Perzentile ein, der Median ist als durchgehende horizontale Linie dargestellt, das arithmetische Mittel als gepunktete

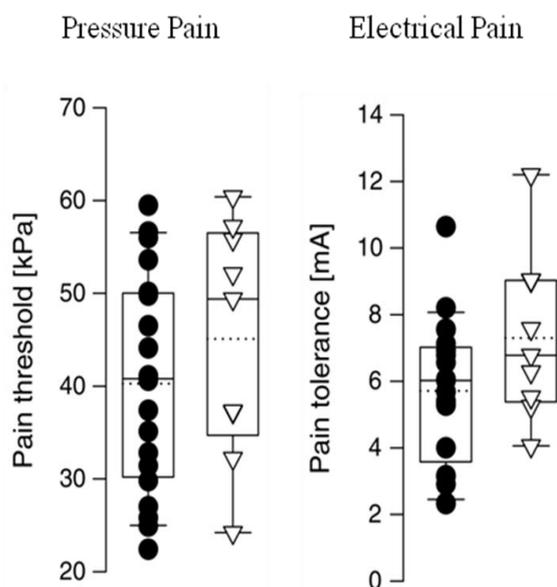
horizontale Linie und die Whisker grenzen Werte ein, die innerhalb von 150% der 25.-75. Perzentile liegen. Die statistischen Unterschiede sind das Ergebnis von t-Test Gruppenvergleichen.

### 3.1.2 Schmerzmodelle ohne Sensitisierung

Für die Schmerzmodelle mit von Frey-Haar-Reizung und Hitzeschmerz vor der jeweiligen Induktion einer Hyperalgesie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Haplotypgruppen gefunden werden. Gleiches gilt für die unsensitisierten Modelle mit elektrischem und stumpfem Druckschmerz. Durch logistische Regression konnten die Ergebnisse nicht eindeutig zu einer der beiden Gruppen zugeordnet werden.

**Abbildung 7 Schmerzmodelle ohne Hyperalgesie**

Schwellen für stumpfen Druckschmerz und Toleranzniveaus für elektrisch-induzierten Schmerz bei homozygoten Trägern und Nichtträgern des *GCH1*-Genotyps. Die Druckschmerzschwellen wurden

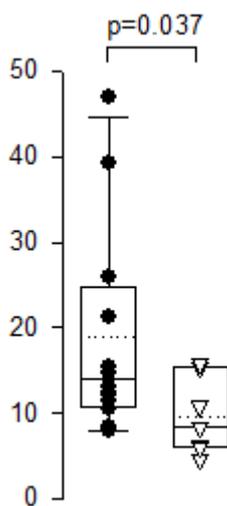


mit einem Druckalgotometer auf dem Mittelglied des rechten Mittelfingers ermittelt. 5 Hertz-frequenzierte elektrische Reize wurden am Endglied des rechten Mittelfingers ausgelöst, um die elektrische Schmerztoleranz zu ermitteln. Die Boxen spannen die 25.-75. Perzentile ein, der Median ist als durchgehende horizontale Linie dargestellt, das arithmetische Mittel als gepunktete horizontale Linie und die Whisker grenzen Werte ein, die innerhalb von 150% der 25.-75. Perzentile liegen. Die statistischen Unterschiede sind das Ergebnis von t-Test Gruppenvergleichen.

## 3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

### 3.2.1 Expression der GCH1 auf RNA-Ebene

Die Leukozyten der Träger des *GCH1*-Haplotyps hatten höhere Basiswerte der *GCH1*-mRNA-Expression als die weißen Blutzellen der Nichtträger, allerdings konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden ( $p=0.059$ ). Nach 24-stündiger LPS-Stimulation konnten gleiche *GCH1*-mRNA-Mengen in den Leukozyten von Trägern und Nichtträgern gemessen werden. Durch den Umstand der höheren Basiswerte bei Leukozyten der *GCH1*-Haplotyp-Träger konnte eine statistische Signifikanz für die stimulationsbedingte Steigerung der *GCH1*-mRNA-Produktion erreicht werden. So steigerte sich die *GCH1*-mRNA-Produktion nach LPS-Stimulierung in Leukozyten von Nichtträgern 18-fach im Vergleich zu einer 10-fachen Steigerung in den weißen Blutzellen der Träger ( $p=0.037$ ).



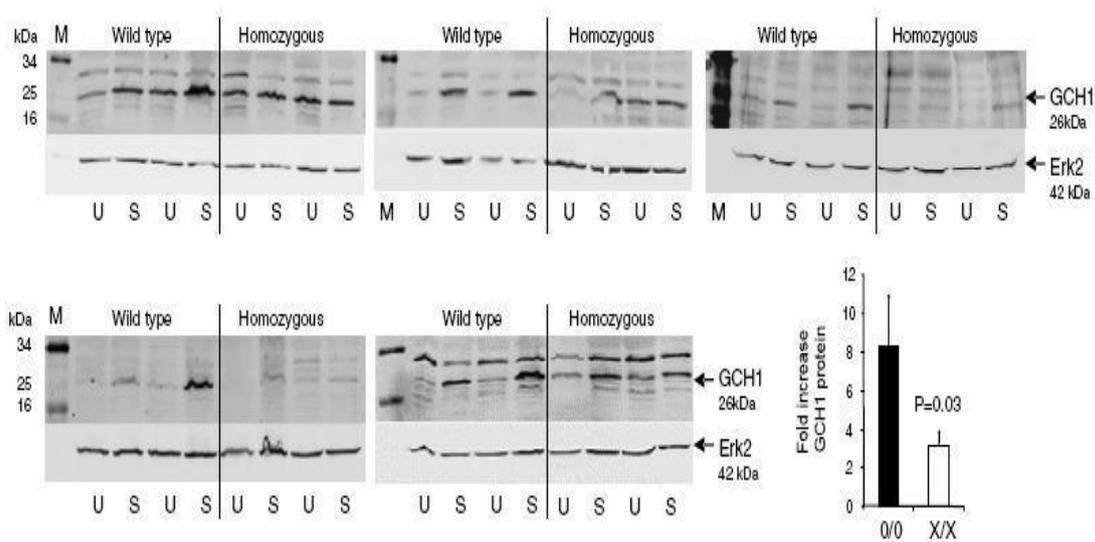
**Abbildung 8** *GCH1*-RNA-Expression

Relative Steigerung der mRNA-Konzentrationen der *GCH1* im Vergleich zu den Basiswerten in primären, blutständigen Leukozyten nach 24-stündiger Provokation mit 10 $\mu$ g/ml LPS, respektive Vehikel. Die Boxen spannen die 25.-75. Perzentile ein, der Median ist als durchgehende horizontale Linie dargestellt, das arithmetische Mittel als gepunktete horizontale Linie und die Whisker grenzen Werte ein, die innerhalb von 150% der 25.-75. Perzentile liegen. Die statistischen Unterschiede sind das Ergebnis von t-Test Gruppenvergleichen.

### 3.2.2 Expression von GCH1 auf Proteinebene

Die *GCH1*-Proteinexpression in unstimulierten Leukozyten zeigte keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Haplotypgruppen. Bei Trägern des *GCH1*-Haplotyps konnte sich in den Leukozyten nach Stimulierung mit LPS eine dreifache und bei Nichtträgern eine achtfache Steigerung der *GCH1*-Proteinexpression messen lassen.

Mittels t-Test wurde ein p-Wert von 0.03 berechnet. In 12 der Proben von 13 Wildtypen zeigte sich eine Steigerung von der Ausgangskonzentration auf den mindestens dreifachen Wert. Bei Trägern des *GCH1*-Haplotyps galt dieses Kriterium lediglich für drei von 12 Proben. Die Signifikanz hierfür wurde mit dem Chi-Quadrat-Test auf weniger als 0.001 berechnet.



**Abbildung 9 GCH1-Protein-Expression mit und ohne LPS-Stimulation**

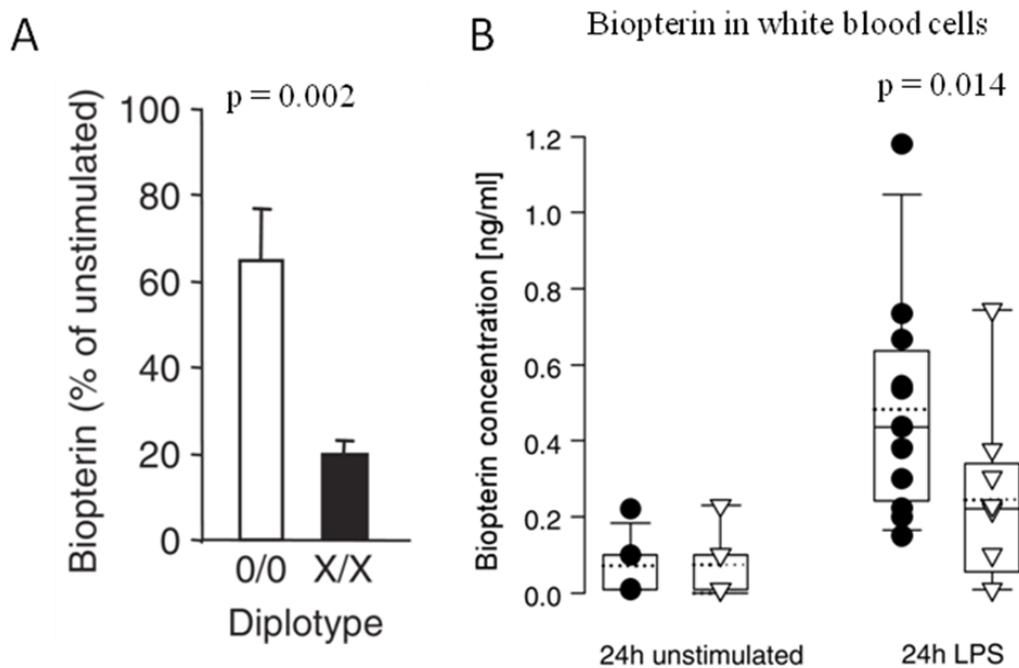
GCH1-Proteinexpression in weißen Blutzellen von homozygoten Trägern und Nichtträgern des *GCH1*-Haplotyps. Die Leukozyten wurden für 24 Stunden mit 10 µg/ml LPS (S) respektive ohne LPS (U) inkubiert. Für die Quantifizierung des relativen Anstiegs des GCH1-Proteins nach LPS-Provokation wurden drei Blots für jede Probe angelegt und das mittlere GCH1/Erk-2-Verhältnis herangezogen, um die relative Steigerung für den jeweiligen Probanden im Vergleich zu seinen Ursprungswerten zu berechnen. Erk-2 wurde als Ladungskontrolle benutzt. 0/0 Wildtypen X/X homozygote Träger des schmerzprotektiven Haplotyps. Die Balken zeigen die mittlere Steigerung der GCH1-Proteinexpression plus die Standardfehler der gemittelten Werte.

### 3.2.3 Funktion der GCH1 (Konzentration von Biopterin)

In den Vollblutproben konnten geringfügig höhere Ausgangskonzentrationen im Blut der Träger im Vergleich zu dem der Nichtträger des *GCH1*-Haplotyps beobachtet werden. 24 Stunden nach Forskolinzugabe wurde eine 60-prozentige Steigerung der BH2-Werte bei Nichtträgern und eine 20-prozentige Steigerung bei Trägern gemessen.

Bei der Messung der BH2-Konzentrationen in Leukozyten nach 24-stündiger Inkubation mit LPS konnte eine 6.5-fache Synthese Steigerung bei Nichtträgern und eine dreifache Steigerung bei Proben von Trägern des *GCH1*-Haplotyps nachgewiesen werden ( $p=0.014$ ).

**Abbildung 10** Relative Biopterinkonzentrationsänderungen im Vergleich homozygoter Träger und Nichtträger des *GCH1*-Haplotyps unter Forskolin- respektive LPS-Stimulation



**(A)** Nach 24-stündiger Forskolinstimulierung zeigt sich ein signifikanter Unterschied der relativen Konzentrationsunterschiede in Bezug auf die unstimulierten Ausgangswerte zwischen homozygoten Trägern (**X/X**) und Nichtträgern (**0/0**) des *GCH1*-Haplotyps ( $p<0.002$ ). Die Balken zeigen die mittlere Steigerung der *GCH1*-Proteinexpression plus die Standardfehler der gemittelten Werte.

**(B)** Biopterinkonzentrationen in primären, blutständigen Leukozyten, mit und ohne LPS-Stimulation nach 24 Stunden. Die Boxen spannen die 25.-75. Perzentile ein, der Median ist als durchgehende horizontale Linie dargestellt, das arithmetische Mittel als gepunktete horizontale Linie und die Whisker grenzen Werte ein, die innerhalb von 150% der 25.-75. Perzentile liegen. Die statistischen Unterschiede sind das Ergebnis von t-Test Gruppenvergleichen.

### 3.2.4 Expression der *Sepiapterinreduktase* und der *Quinoid-Dihydropteridinreduktase* auf RNA-Ebene

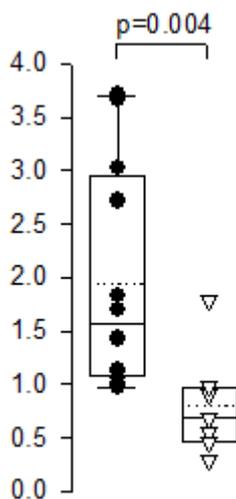
Die mRNA-Level der *Sepiapterinreduktase* (SR), welche der GCH1 bei der BH4-Synthese nachgeschaltet ist, zeigten keine Unterschiede zwischen Trägern und Nichtträgern des *GCH1*-Haplotyps.

LPS hat bei keinem der beiden Genotypen zu einer Steigerung der SR-mRNA geführt. Simultan wurden auch die mRNA-Werte des BH4-Wiederaufbereitungsenzym, der *Quinoid-Dihydropteridinreduktase* (QDPR) weder durch Genotyp noch LPS-Stimulation beeinflusst.

### 3.2.5 Expression der induzierbaren *NO-Synthase* (*iNOS*) auf RNA-Ebene

Von den BH4-abhängigen Enzymen wurde die Expression der *iNOS*-mRNA untersucht, da Leukozyten die *iNOS* nach LPS-Stimulation hochregulieren [63]. Bei den Leukozyten der *GCH1*-Haplotypträger wurde keine *iNOS*-Hochregulierung gemessen, während bei Leukozyten der Nichtträger ein moderater Anstieg auf die zwei- bis dreifache Basiskonzentration beobachtet wurde. Dieser Unterschied ist mit  $p=0.03$  statistisch signifikant.

Bei drei randomisiert ausgewählten Testproben von Leukozyten beider Haplotypgruppen war die NO-Konzentration jeweils unter der Nachweisgrenze.



**Abbildung 11** *iNOS*-Expression mit und ohne LPS-Stimulation

Relative Steigerung der *iNOS*-Expression der im Vergleich zu den Basiswerten in primären, blutständigen Leukozyten nach 24-stündiger Provokation mit 10 $\mu$ g/ml LPS, respektive Vehikel. Die Boxen spannen die 25.-75. Perzentile ein, der Median ist als durchgehende horizontale Linie dargestellt, das arithmetische Mittel als gepunktete horizontale Linie und die Whisker grenzen Werte ein, die innerhalb von 150% der 25.-75. Perzentile liegen. Die statistischen Unterschiede sind das Ergebnis von t-Test Gruppenvergleichen.

## 4 Diskussion

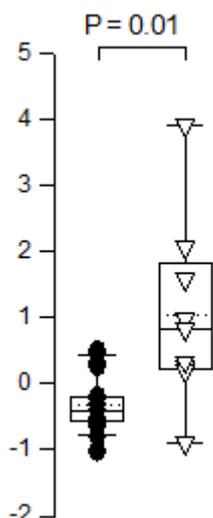
Die Ergebnisse dieser doppelblind konzipierten, experimentellen Schmerzstudie liefern eine weitere Bestätigung für die zuvor beobachtete reduzierte Schmerzempfindlichkeit bei Trägern des sogenannten schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyps [27]. Dies wurde hiermit in einer prospektiven Studie untersucht, für die homozygote Träger und Nichtträger des *GCH1*-Genotyps rekrutiert worden sind. Aufgrund der Ergebnisse kann man von der Annahme ausgehen, dass die *GCH1*-Haplotyp-abhängige Schmerzempfindlichkeitsreduktion vorwiegend für solche Schmerzmodelle gilt, die mit einer primären Hyperalgesie einhergehen. Eben diese Modelle, konkret die Capsaicin- und die Kälteläsion-induzierte Sensibilisierung zeigten die deutlichsten Differenzen zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

Betrachtet man die geringeren Auswirkungen des schmerzprotektiven Haplotyps auf Experimente unter nichtsensibilisierten Bedingungen im Gegensatz zu Experimenten, die eine vorangegangene *GCH1*-Induktion beinhalten, so kann man schlussfolgern, dass akuter Nozizeptorschmerz wesentlich weniger durch den *GCH1*-Polymorphismus beeinflusst wird als Schmerzen unter simuliert, chronisch-entzündlichen Bedingungen. Bei den Basiswerten der *GCH1*-mRNA- und *GCH1*-Proteinkonzentration, sowie der Basisfunktion der *GCH1* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Trägern und Nichtträgern des schmerzprotektiven Haplotyps. Diese Beobachtungen passen zu dem Umstand, dass im Nagetiermodell eine Reduktion von neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen durch eine Inhibition der *GCH1* und die daraus folgende Reduzierung der BH4-Synthese erreicht werden konnte, der akute Schmerz aber unverändert blieb [27].

Die hiesigen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Studie von Tegeder et al. [27], wenn man die experimentelle Messung des stumpfen Druckschmerzes bei Probanden betrachtet. In der Kohorte gesunder Probanden dieser Studie wurde für stumpfen Druckschmerz eine signifikant reduzierte Schmerzempfindlichkeit der Träger des *GCH1*-Haplotyps im Vergleich zu den Nichtträgern festgestellt. Jedoch kann sich dieser Unterschied auch durch die unterschiedlichen Rekrutierungsmethoden und durch die Stichprobengröße erklären lassen.

In der angesprochenen Studie wurden die Probanden zufällig ausgesucht und anschließend genotypisiert, was bei einer Allelfrequenz des *GCH1*-Haplotyps von ungefähr 15% in einer großen Diskrepanz der Gruppenstärke resultiert. Dem hingegen war das Ziel dieser Arbeit, ähnlich große Gruppen von Merkmalsträgern und Kontrollsubjekten zu rekrutieren. Die weit größere Zahl der getesteten Probanden in der Arbeit von Tegeder et al. hat mitunter die Wahrscheinlichkeit vergrößert, kleine Unterschiede der beiden Verteilungen aufzudecken.

Darüber hinaus wurden im Gegensatz zur jetzigen Studie die Druckschmerzschwellen von mehreren anatomisch unabhängigen Teststellen gemittelt. Dieses Vorgehen hatte möglicherweise das Signalrauschverhältnis dahingehend erhöht, dass eine Feststellung von statistisch signifikanten Ergebnissen besser möglich war. Passend zur jetzigen Arbeit wurden aber auch in der Vorstudie keine Haplotyp-abhängigen Unterschiede für akuten thermischen und ischämischen Schmerz entdeckt. So muss man annehmen, dass ein möglicher Effekt des schmerzprotektiven Haplotyps auf akuten Schmerz, wenn vorhanden, nur äußerst gering und zudem schwer mess- oder reproduzierbar ist. Im rein explorativen Rahmen wurden die z-transformierten Ergebnisse der einzelnen Schmerztests für jedes Subjekt zu einem gemittelten Z-Punktwert zusammengefasst. Hierbei zeigte sich im t-Test eine signifikante Unterscheidbarkeit zwischen Trägern und Nichtträgern des *GCH1*-Haplotyps.



**Abbildung 12** Zusammengesetzter Z-Punktwert aller Schmerzexperimente

Um die Ergebnisse aus verschiedenen Schmerztests zu vergleichen, wurden die Schwellenwerte in Z-Punktwerte transformiert und so ein zusammengesetzter Wert für die statistische Analyse generiert. Die Boxen repräsentieren den Quartilsabstand, die Whisker das 95-prozentige Konfidenzintervall, die durchgezogene und gepunktete Linie zeigen den Median und das arithmetische Mittel und die Punkte und Dreiecke zeigen die individuellen Ergebniswerte. Hierbei repräsentieren die Punkte die Träger und die Dreiecke die Nichtträger des schmerzprotektiven *GCH1*-Genotyps.  $P < 0.05$ .

Über die Ergebnisse bei den Schmerzexperimenten hinaus wurde die Funktion des Genotyps im biochemischen Bereich bestätigt. Nach Sensibilisierung fand sich eine bedeutend reduzierte Hochregulierung von GCH1- und BH4-Synthese bei Trägern des schmerzprotektiven Haplotyps im Vergleich zu Wildtypen. Der schmerzprotektive Haplotyp steht folglich in Verbindung mit einer deutlich herabgesetzten Induzierbarkeit der GCH1-Expression und GCH1-Funktion, was durch die Beobachtung der verminderten poststimulatorischen Hochregulierung der *GCH1*-mRNA, der GCH1-Proteinmenge und BH4-Produktion der Träger im Vergleich zu Nichtträgern gezeigt werden konnte. Durch die Verwendung von LPS als alternatives stimulatorisches Reagenz konnten die zuvor mit Forskolin gewonnenen Beobachtungen [27] reproduziert werden. Die Resultate legen nahe, dass eine erhöhte BH4-Konzentration dazu beiträgt oder direkt dazu führt, dass es im Anschluss an eine lokale, hautständige Entzündung zu einer Bahnung der Hypersensibilität kommt. Außerdem führt diese Entzündung in einem kleineren Ausmaß zur Sensibilisierung der TRPV1-Kanäle auf Capsaicin in den Nozizeptoren. Im Vergleich zu bekannten Analgetikawirkungen, die sowohl akuten Schmerz als auch Schmerzen unter Hyperalgesiebedingungen deutlich reduzieren [46, 47], sind die Effekte des *GCH1*-Haplotyps als gering einzustufen. So ist der Einfluss des *GCH1*-Gens nur als einer von diversen Faktoren anzusehen, die das Schmerzgeschehen beeinflussen. Um festzustellen, ob die gemessenen Schmerzeffekte nicht anderen bekannten schmerzmodulierenden genetischen Varianten [64-66] zugeschrieben werden könnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf exploratorischer Ebene eine Zuordnung der Schmerzbewertungen zu dem *COMT-472G>A* Polymorphismus und dem *OPRM1-118A>G* Polymorphismus vorgenommen. Diese genetischen Polymorphismen wurden in der untersuchten Kohorte in gleichen Proportionen in beiden Haplotypgruppen gefunden (Der Chi-Quadrat-Test der Häufigkeiten ergab  $p>0.45$ ). Die 18 heterozygoten und 7 homozygoten Träger der Variante des *COMT-472A*-Allels zeigten hierbei keine signifikanten Unterschiede in der Schmerzeinstufung im Vergleich zu den 8 Nichtträgern. Auch fanden sich keine Korrelationen zwischen den Schmerzempfindlichkeiten der 8 heterozygoten Träger der Variante des *OPRM1-118G* Allels zu den 25 Nichtträgern.

Ein möglicher, nicht gemessener Effekt der *OPRM1-118G*-Variante mag zwar durch den mangelnden Kontrast der Abwesenheit von homozygoten Allelträgern eine zusätzliche Schmälerung erfahren haben. Dennoch hebt diese Studie die Bedeutung des schmerzprotektiven Haplotyps im Hinblick auf Schmerzen im Vergleich zu anderen bekannten Polymorphismen hervor.

Auch wenn der zuvor beschriebene schmerzprotektive Effekt des *GCH1*-Haplotyps [27] in dieser Arbeit wiederholt werden konnte, ist der molekulare Wirkmechanismus für die reduzierte Hochregulierung von *GCH1* noch nicht geklärt. Betrachtet man die vergleichsweise kleinen Unterschiede bei den *GCH1*-mRNA-Werten im Gegensatz zu den größeren Unterschieden der gemessenen *GCH1*-Proteinmenge, so könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein, dass die untersuchten *GCH1*-Polymorphismen überwiegend auf Translationsebene oder über die Proteinstabilität Einfluss nehmen. Der Vergleich der Effekte von Forskolin und LPS legt nahe, dass die relevanten Polymorphismen des schmerzprotektiven Haplotyps, welche die Transkription beeinflussen, eher unter Einbeziehung von Proteinkinase-A-abhängigen Transkriptionsfaktorandockstellen arbeiten als unter Einbeziehung der Andockstellen anderer Zytokine. Dennoch muss das molekulargenetische Funktionsprinzip des *GCH1*-Haplotyps letztlich noch erforscht werden.

Ob sich die Auswirkungen des schmerzprotektiven Haplotyps durch alle 15 Polymorphismen des *GCH1*-Haplotyps ergeben oder es sich beim Verursacher des gemessenen Effektes nur um einen einzelnen, mehrere oder keinen der untersuchten Polymorphismen handelt, lässt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Im letzteren Fall stünde der schmerzprotektive Haplotyp jedoch im Kopplungsungleichgewicht mit einem bis heute nicht identifizierten Polymorphismus. Durch funktionelle Analyse des *C+243C>T* Polymorphismus in der 3'-untranslatierten Region des *GCH1*-Gens ist bekannt, dass dieser für eine verminderte Stickoxidexkretion, eine leicht erhöhte Herzfrequenz und einen moderat erhöhten Blutdruck verantwortlich ist [67]. Eben dieser Polymorphismus steht im Kopplungsungleichgewicht mit den Polymorphismen, die für den schmerzprotektiven Haplotyp charakteristisch sind [68]. Dies könnte demnach ein erster Ansatz für die Identifizierung des molekulargenetischen Funktionsprinzips des schmerzprotektiven Haplotyps oder zumindest von einem Teil dessen sein.

Der Umstand der fehlenden Funktionsanalyse jedoch hat wenig Einfluss auf die klinischen Schlussfolgerungen, die sich aus den Ergebnissen ergeben. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass die funktionell bedeutsamen und für die Ergebnisse dieser Studie verantwortlichen Varianten miteinander in einem Kopplungsungleichgewicht stehen. Daher ist es für diagnostische Zwecke, die den schmerzprotektiven Haplotyp betreffen ausreichend, die drei Polymorphismen zu genotypisieren, welche diesen sicher identifizieren können.

Kim und Dionne untersuchten ein Probandenkollektiv auf Zusammenhänge von Ergebnissen thermischer Schmerzexperimente sowie postoperativer Zahnschmerzen und genetischen Variationen des *GCH1*-Gens und konnten keine signifikanten schmerzprotektiven Effekte nachweisen [69]. Es wurde jedoch versäumt, zu zeigen, dass für die untersuchte Kohorte überhaupt ein Effekt im Datensatz gefunden wurde. Für das, in dieser Arbeit beschriebene Probandenkollektiv konnte im Gegensatz dazu ein Effekt auf molekularbiologischer und schmerzphänotypischer Seite klar nachgewiesen werden.

Holliday et al. untersuchten die Auswirkung des *GCH1*-Haplotyps auf chronischen Ganzkörperschmerz und erhielten keine Signifikanzen in Bezug auf eine Schmerzprotektion [70]. Auch Lazarev et al. konnten bei einer Datenerhebung zur Assoziation des schmerzprotektiven Haplotyps mit viszeralen Schmerzen bei chronischer Pankreatitis keine Schmerzreduktion beim *GCH1*-Kollektiv feststellen [71]. Beide Studien konnten die Prävalenz des schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyps bestätigen. Es stellt sich die Frage, ob die Heterogenität der Schmerzen bei chronischer Pankreatitis einen möglichen *GCH1*-Effekt überdeckt hat oder *GCH1*-Polymorphismen in diesem Schmerzgeschehen eine vernachlässigbar kleine bis keine Rolle spielen.

Dem hingegen konnte bei einer Untersuchung zur Schmerzinduktion mittels Applikation von zehnprozentiger Capsaicincreme bei gesunden Probanden eine signifikante Reduktion der Schmerzangaben festgestellt werden [72]. Hierbei waren die Daten signifikant für drei (*rs4411417*; *rs3783641*; *rs752688*) von fünf untersuchten Polymorphismen des *GCH1*-Haplotyps.

Eine Querschnittsuntersuchung an Patienten in Schmerzambulanzen von drei verschiedenen Universitätskliniken konnte signifikante Effekte des *GCH1*-Haplotyps in Bezug auf die Dauer der speziellen Schmerzbehandlung zeigen [73].

In einer Untersuchung von Patienten mit fortgeschrittenem Karzinom konnte bei Trägern des *GCH1*-Haplotyps im Vergleich zu Nichtträgern eine signifikante Erhöhung der Zeitspanne zwischen Karzinomdiagnose und Beginn einer Opiattherapie festgestellt werden [74].

Die heterogenen Ergebnisse hinsichtlich des Schmerzphänotypen deuten darauf hin, dass die verschiedenen Modalitäten der Schmerzstimuli bei Menschen eine unterschiedliche Reproduzierbarkeit aufweisen. Am Tiermodell wurde eine Schmerzprotektion zuvor klar nachgewiesen [27]. Am stärksten zeigt sich der Effekt bei Schmerzmodellen mit Sensibilisierung, beispielsweise durch Capsaicin. Ein möglicher Mechanismus könnte die reduzierte Hochregulierung der NO-Synthase bei Trägern des *GCH1*-Haplotyps sein.

Die menschliche Haut besitzt die umfassenden Grundlagen für eine de-novo-Herstellung sowie einer Wiederaufbereitung von BH4 [22, 75]. Außerdem wird GCH1 in Entzündungsherden gemeinsam mit der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) hochreguliert [28]. Bei Trägern des *GCH1*-Haplotyps wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die iNOS nach LPS-Stimulation nicht hochreguliert wurde. Im Gegensatz dazu konnte man bei Nichtträgern eine zweifache Steigerung beobachten. Diese Befunde deuten darauf hin, dass BH4 nicht nur die Aktivität der iNOS, sondern auch die iNOS-Expression beeinflusst. Die nicht stattgefundenen zusätzliche iNOS-Induktion bei Trägern des schmerzprotektiven Haplotyps könnte eine NO-vermittelte Freisetzung von Mediatoren wie Prostaglandinen und Zytokinen, welche freie Nervenendigungen auf Schmerzreize hin sensibilisieren, vermindern. Es ist bekannt, dass Stickoxid aktivierend auf TRPV1-Kanäle wirkt und somit deren Capsaicin-bedingte Sensibilisierung fördern könnte [76]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen Stickoxid als einen möglichen Auslösefaktor für die genetisch verursachten Expressionsveränderungen von GCH1 nahe. Auch könnte BH4 eine direkte Aktivierung der TRPV1-Kanäle zur Folge haben [77, 78], da dieser Ionenkanal eine Sensibilität für Redoxmoleküle wie BH4 zeigt [79].

Redoxmoleküle modulieren zudem spannungsabhängige Kalziumkanäle vom T-Typ in Nozizeptoren und Stickoxid erhöht die Aktivität von präsynaptischen spannungsabhängigen Kalziumkanälen vom N-Typ [80]. T-Typ- und N-Typ-Kalziumkanäle spielen beide eine bedeutende Rolle bei der Sensibilisierung von Nozizeptoren [81-83].

Die Überlegung, dass BH4 und Stickoxid über die Aktivierung von Kalziumkanälen Schmerz fördernd wirken könnten, deckt sich mit den Ergebnissen von Tegeder et al., welche im Anschluss an eine Umspülung von Hinterhornganglienneuronen mit BH4-Lösung einen vermehrten Kalziumstrom feststellen konnten [27].

Es handelt sich bei dieser Studie nicht um eine genetische Assoziationsstudie eines Kandidatengens, sondern vielmehr um eine bestätigende Analyse einer zuvor mit Schmerz in Zusammenhang gebrachten genetischen Variante. Dennoch stimmen der Studienaufbau und die Durchführung weitestgehend mit den von Vitali und Randolph [84] vorgeschlagenen zehn Punkten zur Durchführung von genetischen Assoziationsstudien für Sepsisstudien überein. Es wurden jedoch einige Modifikationen für die Durchführung dieser Schmerzstudie vorgenommen:

Zu Punkt 1 [84]: Die biologische Rechtfertigung wird durch den Umstand erreicht, dass in einigen Nagetiermodellen betreffend neuropathischer und entzündlicher Schmerzen gezeigt werden konnte, dass im Anschluss an einer peripheren Nervenläsion GCH1 hochreguliert wird, GCH1-Inhibition die nozizeptiven Schmerzantworten reduziert und durch die Injektion von BH4 Schmerz ausgelöst werden kann [27].

Zu Punkt 2 [84]: Ein Beweis für die biologische Funktionalität des Polymorphismus wurde zuvor [27] und nun zusätzlich durch die ex-vivo Messungen der GCH1-Expression und BH4-Synthese dieser Studie gebracht.

Zu Punkt 3 und 4 [84]: Qualitätskontrolle und Verblindung in Hinblick auf die genetische Analyse wurden gewährleistet. Darüber hinaus wurde für einen Großteil der Studienteilnehmer der *GCH1*-Haplotyp an einem unabhängigen Institut festgestellt.

Zu Punkt 5 bis 9 [84]: Die Definition des pathophysiologischen Zustands und die Einordnung der Probanden nach Alter, Geschlecht und ethnischer Zugehörigkeit wurde vorgenommen.

Da diese Studie anders als genetische Assoziationsstudien für ein distinktes Markergen darauf abzielte, einen zuvor demonstrierten biologischen Effekt eines bestimmten Haplotyps zu reproduzieren und zu zeigen, dass dieser Haplotyp einen klaren Einfluss auf Schmerzen unter Hyperalgesiebedingungen hat, reichte im Vergleich zu groß angelegten Kandidatengestudien eine kleine Studienpopulation aus.

Findet man, wie in dieser Arbeit, einen signifikanten Unterschied im Vergleich der beiden Studiengruppen, so zeigt dies mit ausreichender statistischer Signifikanz den Einfluss einer verminderten GCH1-Nettofunktion in einer Situation, in der es physiologischerweise hochreguliert werden sollte. Ein negatives Ergebnis muss man ob der kleinen Stichprobe mit Vorbehalt bewerten, da es falsch-negativ sein könnte. Der Umstand der relativ kleinen Stichprobe könnte dazu beigetragen haben, dass man in einigen Schmerzexperimenten ohne zugehöriges Hyperalgesiemodell keine signifikanten haplotypabhängigen Effekte beobachten konnte. Dies stand im Gegensatz zu der Studie von Tegeder et al. [27], bei der zuvor ein signifikanter Unterschied der beiden Haplotyps in Bezug auf den nicht-hyperalgesiebezogenen stumpfen Druckschmerz gezeigt wurde. Hier lag ein deutlich größeres Kollektiv vor.

Die heterogene Studienlage hinsichtlich des Schmerzphänotyps

#### 4.1 Ausblick

Aufgrund der zum Großteil fehlenden Funktionsanalyse von *GCH1*-Polymorphismen ist es wichtig, durch weitere Forschung relevante *GCH1*-Varianten zu identifizieren und deren molekularbiologische Funktion zu beschreiben. Zudem sollten die biochemischen Auswirkungen des schmerzprotektiven Haplotyps auf *GCH1*-Expression, Aktivität und Funktion durch weitere Studien bestätigt werden und durch genauere Funktionsanalyse Effekte auf weitere Organsysteme erkannt werden.

Auf lange Sicht könnte es möglich sein, die Verarbeitung und Entstehung, chronisch-entzündlicher sowie neuropathischer Schmerzen gezielt, medikamentös zu unterbinden. So könnten partielle *GCH1*-Antagonisten oder *GCH1*-Modulatoren in den Tetrahydrobiopterinstoffwechsel eingreifen und eine Chronifizierung und Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses bei Risikopatienten im Vorhinein verhindern. Eine Studie am Tiermodell zeigt, dass eine Modulation der *GCH1*-Menge mittels modifizierter *AAV* („adeno associated virus“) -RNA möglich ist und zudem in einer Schmerzreduktion von experimentell simuliertem neuropathischem Schmerz resultiert [85].

Auf lange Sicht könnte sich unter anderem der *GCH1*-Genotyp für die individuelle Erstellung von Risikoprofilen für die Entwicklung von chronischen Schmerzen eignen.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Träger eines bestimmten Haplotyps des Gens der GTP Cyclohydrolase (*GCH1*) gaben im Anschluss an eine Diskektomie nach chronischer lumbaler Radikulopathie weniger Schmerzen an und hatten in experimentellen Schmerzmessungen höhere Schmerzschwellen. Die ex-vivo *GCH1*-Hochregulierung und BH4-Produktion nach Forskolinstimulierung war reduziert, während die Grundwerte der BH4-Konzentration nicht verändert waren. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Haplotyp hauptsächlich Veränderungen zeigt, wenn das *GCH1*-System provoziert wird. Diese Studie zielt darauf ab, (1) diese Hypothese zu testen und (2) die schmerzprotektiven Eigenschaften, die diesem Haplotyp zuvor zugeschrieben wurden in unabhängigen Rahmen zu reproduzieren.

**Methodik:** Hierzu wurden experimentelle Schmerzmodelle mit Sensitisierung (lokale Hautentzündung, topische Capsaicinapplikation) und ohne Sensitisierung (punktuell-mechanischer Druck, stumpfer Druck, thermischer und elektrischer Schmerz) an 10 homozygoten Trägern und 22 homozygoten Nichtträgern des angeblich schmerzprotektiven *GCH1*-Haplotyps durchgeführt. *GCH1*-, iNOS-Hochregulierung und BH4-Produktion wurden ex-vivo in Leukozyten nach LPS-Stimulation für 24 Stunden ermittelt.

**Ergebnisse:** Träger dieses *GCH1*-Haplotyps hatten höhere Schmerzschwellen für punktuell-mechanischen Druck (von Frey Haare) im Anschluss an eine lokale Hautentzündung ( $18.1 \pm 11.3$  vs.  $9 \pm 2.8$  g;  $p = 0.005$ ) und im kleineren Rahmen für thermischen Schmerz nach Hyperalgesieinduktion durch Capsaicincreme ( $35.2 \pm 0.9$  vs.  $36.6 \pm 2.4$  °C;  $p = 0.026$ ). Dem hingegen konnten bei den Schmerzmodellen ohne Sensitisierung keine genotypabhängigen Effekte beobachtet werden. *GCH1*-, BH4 und iNOS-Hochregulierung in Leukozyten nach 24-stündiger LPS-Stimulation waren vermindert bei Trägern des *GCH1*-Haplotyps, woraus sich schließen lässt, dass sich die Genotypgruppen im Hinblick auf die Regulationsvorgänge im Biopterinstoffwechsel unterscheiden.

**Schlussfolgerung:** Diese Studie bestätigt die vorherigen Befunde, dass eine verminderte *GCH1*-Funktion oder *GCH1*-Induzierbarkeit als Folge von genetischen Polymorphismen einen schmerzprotektiven Effekt mit sich bringt.

Als Erweiterung der Vorresultate zeigt diese Arbeit, dass sich der schmerzprotektive Effekt vorzugsweise in Schmerzmodellen mit Sensitisation ausprägt. Dies legt eine besondere Rolle von BH4 bei spezifischen Schmerzprozessen nahe.

## 6 Abstract

**Background:** Carriers of a particular haplotype in the GTP cyclohydrolase gene (*GCH1*) had less pain after surgery for chronic lumbar radiculopathy and a decreased sensitivity to some experimental mechanical pain stimuli. Ex-vivo, *GCH1* upregulation and BH4 production after forskolin stimulation were reduced, while baseline BH4 concentrations were not affected. This suggested that the haplotype may mainly exert its modulating function when the *GCH1* system is provoked. The present study aimed at (1) testing this hypothesis and (2) independently reproducing the pain-decreasing effects of a particular *GCH1* haplotype having been previously associated with pain protection.

**Methods:** Experimental pain models with sensitization (local skin inflammation, dermal capsaicin application) and without sensitization (punctate pressure, blunt pressure, thermal and electrical pain) were assessed in 10 homozygous and non-carriers of the particular *GCH1* haplotype reportedly associated with pain protection. *GCH1*, iNOS upregulation and BH4 production were assessed ex-vivo in white blood cells after lipopolysaccharide stimulation for 24 h.

**Results:** Carriers of the particular *GCH1* haplotype addressed in this study had higher thresholds to punctate mechanical pain (von Frey hairs) following local skin inflammation ( $18.1 \pm 11.3$  vs.  $9 \pm 2.8$  g;  $p = 0.005$ ) and, to a lesser degree, to heat pain following capsaicin sensitization ( $35.2 \pm 0.9$  vs.  $36.6 \pm 2.4$  °C;  $p = 0.026$ ). In contrast, heat and pressure thresholds and tolerance to electrical stimulation in pain models without sensitization did not differ among the genotypes. *GCH1*, BH4 and iNOS upregulation in white blood cells after lipopolysaccharide stimulation were decreased in carriers of the *GCH1* haplotype, which verified that the genotype groups differed with respect to regulation of the biopterin pathway.

**Conclusions:** This study verifies previous results that decreased *GCH1* function or inducibility as a result of genetic polymorphisms protects against pain. This study extends previous results by showing that this pain protection is mainly conferred under conditions of hyperalgesia resulting from sensitization, supporting specific functions of BH4 in relation to particular aspects of pain.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Merskey, H., *Re: Comments on DSM III: a new nomenclature for classifying patients with chronic pain*. Pain, 1984. **18**(1): p. 103-5.
2. Siddall, P.J. and M.J. Cousins, *Persistent pain as a disease entity: implications for clinical management*. Anesth Analg, 2004. **99**(2): p. 510-20, table of contents.
3. Verhaak, P.F., et al., *Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature*. Pain, 1998. **77**(3): p. 231-9.
4. Elliott, A.M., et al., *The epidemiology of chronic pain in the community*. Lancet, 1999. **354**(9186): p. 1248-52.
5. Zimmermann, M., *[Chronic pain. Epidemiology and management in Germany]*. Orthopade, 2004. **33**(5): p. 508-14.
6. Woolf, C.J. and M.W. Salter, *Neuronal plasticity: increasing the gain in pain*. Science, 2000. **288**(5472): p. 1765-9.
7. Yaksh, T.L., et al., *The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7680-6.
- 8.Coderre, T.J., et al., *Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence*. Pain, 1993. **52**(3): p. 259-85.
9. Willis, W.D., *Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **933**: p. 142-56.
10. Scholz, J., et al., *Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury*. J Neurosci, 2005. **25**(32): p. 7317-23.
11. Woolf, C.J., *Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity*. Nature, 1983. **306**(5944): p. 686-8.
12. Porreca, F., M.H. Ossipov, and G.F. Gebhart, *Chronic pain and medullary descending facilitation*. Trends Neurosci, 2002. **25**(6): p. 319-25.
13. Woolf, C.J. and M. Costigan, *Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7723-30.
14. Marchand, F., M. Perretti, and S.B. McMahon, *Role of the immune system in chronic pain*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(7): p. 521-32.
15. Yu, X.M. and M.W. Salter, *Src, a molecular switch governing gain control of synaptic transmission mediated by N-methyl-D-aspartate receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7697-704.
16. Wood, J.N., et al., *Voltage-gated sodium channels and pain pathways*. J Neurobiol, 2004. **61**(1): p. 55-71.
17. Diatchenko, L., et al., *Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(1): p. 135-43.
18. MacGregor, A.J., et al., *Structural, psychological, and genetic influences on low back and neck pain: a study of adult female twins*. Arthritis Rheum, 2004. **51**(2): p. 160-7.

19. Mogil, J.S., et al., *Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception*. Pain, 1999. **80**(1-2): p. 67-82.
20. Costigan, M., et al., *Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury*. BMC Neurosci, 2002. **3**: p. 16.
21. Thony, B., G. Auerbach, and N. Blau, *Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions*. Biochem J, 2000. **347 Pt 1**: p. 1-16.
22. Schallreuter, K.U., et al., *Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin*. Science, 1994. **263**(5152): p. 1444-6.
23. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5193-7.
24. Kwon, N.S., C.F. Nathan, and D.J. Stuehr, *Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages*. J Biol Chem, 1989. **264**(34): p. 20496-501.
25. Meller, S.T. and G.F. Gebhart, *Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord*. Pain, 1993. **52**(2): p. 127-36.
26. Tanaka, K., S. Kaufman, and S. Milstien, *Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5864-7.
27. Tegeder, I., et al., *GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1269-77.
28. Frank, S., et al., *Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(6): p. 1058-64.
29. Bauer, M., et al., *Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones*. J Neurochem, 2002. **82**(5): p. 1300-10.
30. Hesslinger, C., et al., *Phosphorylation of GTP cyclohydrolase I and modulation of its activity in rodent mast cells. GTP cyclohydrolase I hyperphosphorylation is coupled to high affinity IgE receptor signaling and involves protein kinase C*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21616-22.
31. Maita, N., et al., *Crystal structure of the stimulatory complex of GTP cyclohydrolase I and its feedback regulatory protein GFRP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1212-7.
32. Ichinose, H., et al., *Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene*. Nat Genet, 1994. **8**(3): p. 236-42.
33. Matsubara, Y., J.A. Heininger, and Y.Y. Lin, *Improved diagnosis of classical vs atypical phenylketonuria by liquid chromatography*. Clin Chem, 1984. **30**(2): p. 278-80.
34. Niederwieser, A., et al., *GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine, and serotonin deficiencies and muscular hypotonia*. Eur J Pediatr, 1984. **141**(4): p. 208-14.

35. Segawa, M., Y. Nomura, and N. Nishiyama, *Autosomal dominant guanosine triphosphate cyclohydrolase I deficiency (Segawa disease)*. *Ann Neurol*, 2003. **54 Suppl 6**: p. S32-45.
36. Nardocci, N., et al., *Neonatal dopa-responsive extrapyramidal syndrome in twins with recessive GTPCH deficiency*. *Neurology*, 2003. **60**(2): p. 335-7.
37. Klein, C., et al., *Exon deletions in the GCHI gene in two of four Turkish families with dopa-responsive dystonia*. *Neurology*, 2002. **59**(11): p. 1783-6.
38. Hahn, H., et al., *Neurologic and psychiatric manifestations in a family with a mutation in exon 2 of the guanosine triphosphate-cyclohydrolase gene*. *Arch Neurol*, 2001. **58**(5): p. 749-55.
39. Atlas, S.J., et al., *Long-term outcomes of surgical and nonsurgical management of sciatica secondary to a lumbar disc herniation: 10 year results from the maine lumbar spine study*. *Spine*, 2005. **30**(8): p. 927-35.
40. Atlas, S.J., et al., *The Maine Lumbar Spine Study, Part II. 1-year outcomes of surgical and nonsurgical management of sciatica*. *Spine*, 1996. **21**(15): p. 1777-86.
41. Zaykin, D.V., et al., *Testing association of statistically inferred haplotypes with discrete and continuous traits in samples of unrelated individuals*. *Hum Hered*, 2002. **53**(2): p. 79-91.
42. Leuzzi, V., et al., *Autosomal dominant GTP-CH deficiency presenting as a dopa-responsive myoclonus-dystonia syndrome*. *Neurology*, 2002. **59**(8): p. 1241-3.
43. Lötsch, J., et al., *Screening for three or fewer DNA positions reliably diagnoses a pain protective haplotype comprised of 15 DNA positions in the GTP cyclohydrolase 1 gene (GCHI)* *Clin Chem*, 2007. **(in press)**.
44. Hardy, G.H., *Mendelian Proportions in a Mixed Population*. *Science*, 1908. **28**(706): p. 49-50.
45. Lewis, T. and W.S. Love, *Vascular reactions of the skin to injury. Part III. - Some effects of freezing, of cooling and of warming*. *Heart*, 1926. **13**: p. 27-60.
46. Kilo, S., et al., *Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammation in human skin*. *Brain*, 1994. **117 ( Pt 2)**: p. 385-96.
47. Lotsch, J. and M.S. Angst, *The mu-opioid agonist remifentanyl attenuates hyperalgesia evoked by blunt and punctuated stimuli with different potency: a pharmacological evaluation of the freeze lesion in humans*. *Pain*, 2003. **102**(1-2): p. 151-61.
48. Tegeder, I., et al., *Reduced inflammatory hyperalgesia with preservation of acute thermal nociception in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 3253-7.
49. North Coast Medical Inc. Morgan Hill, U. <http://www.ncmedical.com/>.
50. Petersen, K.L. and M.C. Rowbotham, *A new human experimental pain model: the heat/capsaicin sensitization model*. *Neuroreport*, 1999. **10**(7): p. 1511-6.
51. Davis, J.B., et al., *Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia*. *Nature*, 2000. **405**(6783): p. 183-7.

52. LaMotte, R.H., et al., *Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms*. J Neurophysiol, 1991. **66**(1): p. 190-211.
53. Andersen, O.K., et al., *The effect of Ketamine on stimulation of primary and secondary hyperalgesic areas induced by capsaicin--a double-blind, placebo-controlled, human experimental study*. Pain, 1996. **66**(1): p. 51-62.
54. Andersen, O.K., R.H. Gracely, and L. Arendt-Nielsen, *Facilitation of the human nociceptive reflex by stimulation of A beta-fibres in a secondary hyperalgesic area sustained by nociceptive input from the primary hyperalgesic area*. Acta Physiol Scand, 1995. **155**(1): p. 87-97.
55. Koltzenburg, M., H.E. Torebjork, and L.K. Wahren, *Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain*. Brain, 1994. **117** ( Pt 3): p. 579-91.
56. [http://www.medoc-web.com/medoc\\_en\\_tsaII\\_analyzer.aspx](http://www.medoc-web.com/medoc_en_tsaII_analyzer.aspx).
57. Masson, E.A., et al., *Current perception thresholds: a new, quick, and reproducible method for the assessment of peripheral neuropathy in diabetes mellitus*. Diabetologia, 1989. **32**(10): p. 724-8.
58. Pitei, D.L., et al., *The value of the Neurometer in assessing diabetic neuropathy by measurement of the current perception threshold*. Diabet Med, 1994. **11**(9): p. 872-6.
59. Wallace, M.S., et al., *Computer-controlled lidocaine infusion for the evaluation of neuropathic pain after peripheral nerve injury*. Pain, 1996. **66**(1): p. 69-77.
60. Angst, M.S., et al., *Pharmacodynamics of orally administered sustained-release hydromorphone in humans*. Anesthesiology, 2001. **94**(1): p. 63-73.
61. Skarke, C., et al., *Analgesic effects of morphine and morphine-6-glucuronide in a transcutaneous electrical pain model in healthy volunteers*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(1): p. 107-21.
62. Beck, A.T., et al., *An inventory for measuring depression*. Arch Gen Psychiatry, 1961. **4**: p. 561-71.
63. Weinberg, J.B., et al., *Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages*. Blood, 1995. **86**(3): p. 1184-95.
64. Fillingim, R.B., et al., *The A118G single nucleotide polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with pressure pain sensitivity in humans*. J Pain, 2005. **6**(3): p. 159-67.
65. Lotsch, J. and G. Geisslinger, *Relevance of frequent mu-opioid receptor polymorphisms for opioid activity in healthy volunteers*. Pharmacogenomics J, 2006. **6**(3): p. 200-10.
66. Zubieta, J.K., et al., *COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor*. Science, 2003. **299**(5610): p. 1240-3.
67. Zhang, L., et al., *Discovery of common human genetic variants of GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) governing nitric oxide, autonomic activity, and cardiovascular risk*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2658-71.

68. Doehring, A., et al., *Clinical genetics of functionally mild non-coding GTP cyclohydrolase 1 (GCH1) polymorphisms modulating pain and cardiovascular risk*. *Mutat Res*, 2008.
69. Kim, H. and R.A. Dionne, *Lack of influence of GTP cyclohydrolase gene (GCH1) variations on pain sensitivity in humans*. *Mol Pain*, 2007. **3**: p. 6.
70. Holliday, K.L., et al., *Do genetic predictors of pain sensitivity associate with persistent widespread pain?* *Mol Pain*, 2009. **5**: p. 56.
71. Lazarev, M., et al., *Does the pain-protective GTP cyclohydrolase haplotype significantly alter the pattern or severity of pain in humans with chronic pancreatitis?* *Mol Pain*, 2008. **4**: p. 58.
72. Campbell, C.M., et al., *Polymorphisms in the GTP cyclohydrolase gene (GCH1) are associated with ratings of capsaicin pain*. *Pain*, 2009. **141**(1-2): p. 114-8.
73. Doehring, A., et al., *Cross-sectional assessment of the consequences of a GTP cyclohydrolase 1 haplotype for specialized tertiary outpatient pain care*. *Clin J Pain*, 2009. **25**(9): p. 781-5.
74. Lotsch, J., et al., *A GTP cyclohydrolase 1 genetic variant delays cancer pain*. *Pain*, 2010. **148**(1): p. 103-6.
75. Chavan, B., et al., *GTP cyclohydrolase feedback regulatory protein controls cofactor 6-tetrahydrobiopterin synthesis in the cytosol and in the nucleus of epidermal keratinocytes and melanocytes*. *J Invest Dermatol*, 2006. **126**(11): p. 2481-9.
76. Yoshida, T., et al., *Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation*. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(11): p. 596-607.
77. Berka, V., et al., *Redox function of tetrahydrobiopterin and effect of L-arginine on oxygen binding in endothelial nitric oxide synthase*. *Biochemistry*, 2004. **43**(41): p. 13137-48.
78. Vasquez-Vivar, J., et al., *The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study*. *Biochem J*, 2002. **362**(Pt 3): p. 733-9.
79. Susankova, K., et al., *Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(1): p. 383-94.
80. Huang, C.C., S.H. Chan, and K.S. Hsu, *cGMP/protein kinase G-dependent potentiation of glutamatergic transmission induced by nitric oxide in immature rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro*. *Mol Pharmacol*, 2003. **64**(2): p. 521-32.
81. Altier, C. and G.W. Zamponi, *Targeting Ca<sup>2+</sup> channels to treat pain: T-type versus N-type*. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. **25**(9): p. 465-70.
82. Todorovic, S.M., et al., *Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors*. *Neuron*, 2001. **31**(1): p. 75-85.
83. Saegusa, H., et al., *Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca<sup>2+</sup> channel*. *Embo J*, 2001. **20**(10): p. 2349-56.
84. Vitali, S.H. and A.G. Randolph, *Assessing the quality of case-control association studies on the genetic basis of sepsis*. *Pediatr Crit Care Med*, 2005. **6**(3 Suppl): p. S74-7.

85. Kim, S.J., et al., *Effective relief of neuropathic pain by adeno-associated virus-mediated expression of a small hairpin RNA against GTP cyclohydrolase 1*. *Mol Pain*, 2009. **5**: p. 67.

## 8 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Jörn Lötsch danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während der experimentellen Phase und der Verfassung des Textes.

Frau Professor Dr. med. Irmgard Tegeder danke ich für die freundliche Hilfestellung und Geduld während der experimentellen Phase.

Dank gilt auch meinen Eltern, die mir mit Ihrer Unterstützung das Studium ermöglicht haben, meinem Vater im Speziellen für die Mühe bei der Rechtschreib- und Formkorrektur.

Nicht zuletzt danke ich Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger für die Ermöglichung der Studie und meiner Dissertation am Institut für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

## 9 Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name: Jan Adolph  
Geburtsdaten: 03.09.1980 in Bielefeld  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

2000 Abitur an der Martin-Niemöller-Gesamtschule Schildesche

### **Universitätsausbildung**

2001 - 2008 Studiums der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

2007-2008

#### Praktisches Jahr:

- Anästhesie und Notfallmedizin an den Städtischen Kliniken Frankfurt Höchst
- Allgemeine Innere Medizin und Hämatologie an Lehrkrankenhäusern der Memorial University of New Foundland in St.John's, Kanada
- Kardiologie /internistische Notaufnahme an den Städtischen Kliniken Frankfurt Höchst
- Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie am St.John's Medical College in Bangalore, Indien

2008

Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit dem Staatsexamen

### **Famulaturen:**

Innere Medizin, Anästhesie, Notfall- und Intensivmedizin, Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Allgemeinmedizin

### **Medizinische Tätigkeiten:**

Seit 2009

Assistenzarzt der Anästhesie am Vivantes Humboldt Klinikum Berlin

## 10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Bedeutung von genetisch-bedingter GCH1-Minderfunktion auf Schmerzen unter sensitisierten und nicht-sensitisierten Bedingungen“**

im Zentrum der Pharmakologie, Institut für Klinische Pharmakologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Professor Dr. med. Jörn Lötsch mit Unterstützung durch Frau Professor Dr. med. Irmgard Tegeder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

- 1 Tegeder I, Adolph J, Schmidt H, Woolf CJ, Geisslinger G, Lötsch J.  
**“Reduced hyperalgesia in homozygous carriers of a GTP cyclohydrolase 1 haplotype.”**  
Eur J Pain. 2008 Nov;12(8):1069-77.
- 2 Tegeder I, Costigan M, Griffin RS, Abele A, Belfer I, Schmidt H, Ehnert C, Nejim J, Marian C, Scholz J, Wu T, Allchorne A, Diatchenko L, Binshtok AM, Goldman D, Adolph J, Sama S, Atlas SJ, Carlezon WA, Parsegian A, Lötsch J, Fillingim RB, Maixner W, Geisslinger G, Max MB, Woolf CJ.  
**“GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence.”**  
Nat Med. 2006 Nov;12(11):1269-77.

---

(Ort, Datum)

(Unterschrift)