

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Untersuchung potenzieller Biomarker in Haut- und  
Nervenbiopsaten von Patienten mit schmerzhaften und  
schmerzlosen Polyneuropathien**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna-Lena Schubert

aus Erlangen

Würzburg, den 15. Dezember 2016

Referentin: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Koreferentin: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2017

Die Promovendin ist Ärztin

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Polyneuropathien (PNP) .....	1
1.1.1. Klinische Manifestation .....	1
1.1.2. Ätiologie .....	1
1.1.2.1. Hereditäre PNP.....	2
1.1.2.2. Erworbene PNP – metabolische und toxische Ursachen.....	2
1.1.2.3. Erworbene PNP – entzündliche Ursachen .....	3
1.1.2.4. Erworbene PNP – paraproteinämische und paraneoplastische Neuropathie...	5
1.1.2.5. Small fiber Neuropathie (SFN) .....	6
1.1.3. Diagnostik der PNP .....	6
1.1.4. Diagnosestellung bei PNP .....	7
1.2. Biomarker .....	8
1.2.1. Definition und Anwendungsgebiete von Biomarkern .....	8
1.2.2. Notwendigkeit von Biomarkern zur PNP-Diagnostik.....	8
1.3. Potenzielle Biomarkerkandidaten in Nerven- und Hautbiopsaten .....	8
1.3.1. Marker für Inflammation .....	8
1.3.1.1. Tachykinin precursor 1 (TAC1) .....	8
1.3.1.2. Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2).....	9
1.3.1.3. Allograft inflammatory factor 1 (AIF1) .....	10
1.3.1.4. Interleukin-6 (IL-6).....	11
1.3.2. Ausgewählte Marker für die Regeneration peripherer Nerven .....	12
1.3.2.1. Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) .....	12
1.3.2.2. Netrin-1 .....	13
1.3.2.3. Uncoordinated5H2 (UNC5H2) und deleted in colorectal cancer (DCC) .....	13
1.3.2.4. Neogenin-1 (NEO1) .....	14
1.3.2.5. Netrin-G1 und Netrin-G2.....	15
1.4. Zielsetzung und Hypothesen der Studie.....	16

1.4.1. Zielsetzung der Studie.....	16
1.4.2. Hypothesen .....	16
<b>2. Patienten, Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1. Patientenkollektiv.....	17
2.2. Gesundes Kontrollkollektiv für Hautstanzbiopsien .....	17
2.3. Klinische Untersuchung .....	17
2.3.1. Anamnese und neurologische Untersuchung.....	17
2.3.2. Laboruntersuchungen aus Blut und Liquor .....	17
2.3.3. Elektroneurographie .....	18
2.3.4. Hautstanzbiopsien bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen.....	18
2.3.5. Biopsie des N. suralis bei Patienten .....	19
2.3.6. Einteilung des Patientenkollektivs in diagnostische Subgruppen .....	19
2.3.7. Standardisierte Untersuchungs-Scores für PNP .....	21
2.3.8. Schmerz- und Depressionsfragebögen .....	21
2.4. Genexpressionsanalyse aus Haut- und Nervenproben .....	22
2.4.1. RNA-Extraktion aus Hautproben.....	22
2.4.2. RNA-Extraktion aus Nervenproben.....	23
2.4.3. Messung der optischen Dichte .....	24
2.4.4. Reverse Transkriptions-PCR bei Nerv- und Hautproben .....	24
2.4.5. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	25
2.4.5.1. Prinzip der qRT-PCR.....	25
2.4.5.2. Praktische Durchführung der qRT-PCR .....	25
2.4.6. Statistische Auswertung .....	28
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1. Patientenkollektiv.....	29
3.1.1. Demographische Daten .....	29
3.1.2. Verteilung der diagnostischen Subgruppen .....	29
3.1.3. Klinische Daten der Patienten .....	31
3.2. Kontrollkollektiv.....	33
3.3. Genexpressionsanalyse in N. suralis-Biopsaten .....	33
3.4. Genexpressionanalyse der proximalen und distalen Hautbiopsate .....	37
3.4.1. Auswertung der $\Delta$ Ct-Werte der proximalen und distalen Hautbiopsate.....	37

3.4.2. Auswertung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der proximalen und distalen Hautbiopsate.....	46
3.4.3. Auswertung der intraindividuellen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Hautbiopsate: Vergleich proximaler und distaler Proben .....	54
3.4.4. Korrelation der Genexpression mit Nervenfaserdichte in den Hautbiopsien .....	58
3.4.5. Korrelation zwischen Patientenalter und Fragebögen mit der Genexpression in den Hautbiopsaten .....	60
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>62</b>
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	62
4.2. Fehlende Unterschiede innerhalb diagnostischer Subgruppen .....	64
4.3. In der Haut ist die Genexpression von Mitgliedern der Netrin-Familie bei PNP-Patienten niedriger als bei gesunden Kontrollpersonen.....	65
4.4. Die Genexpression für Netrin-1 ist in distalen Hautproben bei entzündlichen PNP niedriger als bei nicht-entzündlichen PNP .....	67
4.5. Die Genexpression von NEO1 in distalen Hautproben ist bei schmerzloser PNP und gesunden Kontrollpersonen höher als bei schmerzhafter PNP .....	68
4.6. Die AIF1-Genexpression ist in Hautproben von Patienten höher als bei gesunden Kontrollpersonen.....	68
4.7. Fehlende Unterschiede in der Genexpression von IL-6 .....	70
4.8. Kritikpunkte und Grenzen der vorliegenden Arbeit .....	71
4.9. Ausblick.....	71
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis: .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>83</b>
7.1. Materialien .....	83
7.2. Abkürzungen.....	87

## **1. Einleitung**

### **1.1. Polyneuropathien (PNP)**

Bei Polyneuropathien (PNP) handelt es sich um Erkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS) mit möglicher Beteiligung sensibler, motorischer und/oder autonomer Nervenfasern. Hierbei kann es sowohl zu einer Schädigung des Axons (axonale PNP), als auch der das Axon umgebenden Markscheide (demyelinisierende PNP) bzw. beider Anteile kommen (Heuss et al., 2012). Etwa 2-4% der Bevölkerung leiden an einer PNP; bei über 55jährigen steigt die Prävalenz auf bis zu 8% an (Hoskisson et al., 2004).

#### **1.1.1. Klinische Manifestation**

Klinisch können sich PNP mit motorischen, sensiblen und/oder autonomen Symptomen manifestieren. Typischerweise entwickeln sich die Symptome an den unteren Extremitäten beginnend von distal nach proximal und können symmetrisch oder asymmetrisch verteilt sein. Davon abweichend können PNP aber auch primär proximal beginnen und sich nach distal ausbreiten, wie beispielsweise bei Polyradikuloneuropathien. PNP können auch mit Beteiligung der Rumpf- und Hirnnerven einhergehen, oder sich als Mononeuropathia multiplex mit multifokalem, asymmetrischem Befall verschiedener peripherer Nerven manifestieren.

Zu den motorischen Symptomen gehören Paresen und Muskelatrophien (England et al., 2004). Bei den sensiblen Symptomen können sogenannte Plus- und Minussymptome unterschieden werden. Am häufigsten wird von einem Taubheitsgefühl berichtet, das ein typisches Minussymptom ist. Zu den Plussymptomen zählen beispielsweise neuropathische Schmerzen und Missempfindungen (Burns et al., 2011). Warum PNP bei gleicher Ätiologie mit und ohne Schmerzen oder Missempfindungen einhergehen ist bislang nicht geklärt (Üçeyler et al., 2008). Abhängig von der Ätiologie kann der Verlauf chronisch-progredient, schubförmig-remittierend oder schubförmig-progredient sein (England et al., 2004).

#### **1.1.2. Ätiologie**

Ätiologisch kann zwischen den beiden Kategorien der hereditären und erworbenen PNP unterschieden werden. In beiden Gruppen lassen sich axonale und demyelinisierende PNP unterscheiden.

### **1.1.2.1. Hereditäre PNP**

Bei den hereditären Neuropathien, die nach elektrophysiologischen Kriterien und Vererbungsmuster unterteilt werden können und auch als Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) bezeichnet werden, sind die zugrunde liegenden Mutationen zum Teil bekannt. Hierbei handelt es sich um genetische Alterationen, die zu gestörter Axon- und/oder Myelinmorphologie und -funktion führen (Jerath et al., 2014). Die Anzahl der aufgedeckten Mutationen wächst ständig an. Klinisch können sich hereditäre PNP bereits im Kindesalter manifestieren; nicht selten werden die Patienten jedoch erst im Erwachsenenalter klinisch auffällig. Typische Kennzeichen sind neben sensomotorischen Symptomen die Ausbildung von Hohlfüßen und Krallenzehen als Ausdruck der ausgeprägten Atrophie der kleinen Fußmuskeln (Reilly et al., 2009).

### **1.1.2.2. Erworbene PNP – metabolische und toxische Ursachen**

Unter den erworbenen PNP sind der Diabetes mellitus als metabolische Störung und vermehrter Alkoholkonsum als toxischer Einfluss die in den westlichen Staaten häufigsten Ursachen einer PNP. Die diabetische PNP manifestiert sich typischerweise mit einem distal-symmetrischen Verteilungstyp, der nicht selten mit brennenden Schmerzen einhergeht (Hilz et al., 2000). Eine diabetische Neuropathie kann aber auch jede andere klinische Manifestation zeigen, was die Diagnosestellung oft erschwert. Elektrophysiologisch ist die diabetische PNP eine axonale Neuropathie; es können sich aber auch Zeichen der Entmarkung finden (Valls-Canals et al., 2002). Unter dem Oberbegriff der metabolischen Ursachen werden neben Diabetes mellitus beispielsweise auch Niereninsuffizienz, Hypothyreose oder Lebererkrankungen eingeordnet (Burns et al., 2011, Heuss et al., 2012). Übermäßiger Alkoholkonsum führt klinisch in der Regel zu einem distal symmetrischen Befallsmuster (Koike et al., 2006). In den elektrophysiologischen Messungen zeigt sich eine axonale Schädigung (Chopra et al., 2012). Weitere Beispiele für toxisch-bedingte PNP sind z.B. Chemotherapie-induzierte PNP, sowie PNP nach Einfluss von Schwermetallen (Hoskisson et al., 2004, Burns et al., 2011). Auch Mangelzustände, wie z.B. Vitamin B12 Mangel können eine PNP verursachen; diese ist charakterisiert durch eine Hinterstrangstörung mit Einschränkung von Tiefen- und Oberflächensensibilität sowie dem Auftreten von Ataxien oder Paresen (Hoskisson et al., 2004, Kumar, 2014).

### **1.1.2.3. Erworbene PNP – entzündliche Ursachen**

Die große Gruppe der entzündlichen PNP lässt sich primär in die beiden Untergruppen der Erreger-bedingten PNP und der autoimmun-vermittelten PNP unterteilen. Zu den Erreger-bedingten PNP zählen z.B. PNP bei Neuroborreliose oder bei einer HIV-Infektion (McLeod, 1995, Martyn et al., 1997). Sie können je nach zugrunde liegendem Erreger durch antibiotische oder antivirale Therapie behandelt werden und haben meist eine gute Prognose (de Freitas, 2007).

Unter den entmarkenden immunvermittelten Neuropathien sind z.B. die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP), die akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP; Guillain-Barré-Syndrom, GBS), die multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie (MADSAM), sowie die multifokale motorische Neuropathie (MMN) zu nennen.

Die typischen klinischen Zeichen einer CIDP (Van den Bergh et al., 2010) sind eine symmetrische, überwiegend distale Schwäche mit zusätzlichen sensiblen Störungen, die sich über mindestens zwei Monate entwickeln. Der Verlauf kann chronisch progredient, schubförmig-remittierend oder schubförmig-progredient sein. In der Regel tritt die CIDP idiopathisch auf; Assoziationen mit anderen Grunderkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus oder Lupus erythematodes wurden jedoch beschrieben (Van den Bergh et al., 2010, Eftimov et al., 2013). Zur Behandlung der CIDP werden Immunsuppressiva verwendet; in der akuten Phase werden nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie Steroide oder intravenöse Immunglobuline (IVIg) eingesetzt (Sommer et al., 2012).

Ähnlich der CIDP, aber mit akutem Verlauf präsentiert sich das GBS. Meist wird innerhalb von 2-4 Wochen die Maximalausprägung der Symptome erreicht. Diese hält zwischen zwei Tagen und sechs Monaten an bis es zur variabel andauernden Rückbildungsphase kommt. Neben sensomotorischen Symptomen sind autonome Störungen typisch (van den Berg et al., 2014). Häufig tritt das GBS postinfektiös nach gastrointestinalen oder respiratorischen Infekten auf (z.B. nach Infekten mit *Campylobacter jejuni* oder *Mycoplasma pneumoniae*), sodass hier eine pathogene Wirkung von kreuzreagierenden Antikörpern angenommen wird (Hughes et al., 2005). Der Einsatz von Steroiden zeigt beim GBS typischerweise keinen therapeutischen Effekt. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Stattdessen wird diese akute



PNP mit Plasmapherese oder IVIg behandelt. Beide Verfahren zeigen eine gleichwertige Wirksamkeit (Sommer et al., 2012).

Die MMN tritt in Form von rezidivierenden oder chronisch-progredienten meist asymmetrisch verteilten Paresen der Extremitäten üblicherweise ohne sensible Defizite auf (Van den Bergh et al., 2010). Die Arme sind von den meist distalen Paresen häufiger und stärker betroffen als die Beine. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigt sich typischerweise eine Demyelinisierung bis hin zu Leitungsblöcken der motorischen Nerven (Meuth et al., 2010). Therapie der ersten Wahl ist die Gabe von IVIg. Steroide sind wirkungslos und können die Paresen sogar verschlimmern (van Schaik et al., 2010, Sommer et al., 2012). Die Prognose ist meist günstig, eine langfristige Behandlung mit IVIg ist jedoch in der Regel erforderlich (Whitesell, 2010).

Die klinische Präsentation der MADSAM ist ähnlich derjenigen der MMN. Auch hier treten typischerweise asymmetrische Paresen und Atrophien auf. Es finden sich jedoch in Abgrenzung zur MMN zusätzlich sensible Symptome (Saperstein et al., 1999). Im Gegensatz zur MMN spricht die MADSAM neben IVIg auch auf Steroide an (Sederholm, 2010).

Zu den axonalen autoimmun-vermittelten Neuropathien zählen u.a. die vaskulitische PNP, die progressive idiopathische axonale Neuropathie (PIAN; (Vrancken et al., 2004)) und die chronische idiopathische axonale Polyneuropathie (CIAP; (Vrancken et al., 2004)). Die vaskulitischen PNP werden in PNP bei systemischer Vaskulitis (z.B. bei Polyarteritis nodosa, Wegener Granulomatose oder Churg-Strauss-Syndrom) und in die nicht-systemische Vaskulitis des peripheren Nervensystems (NSVN) unterteilt. Klinisch sind diese axonalen Neuropathien durch eine asymmetrische multifokale Verteilung von Schmerzen, Paresen und Taubheitsgefühlen gekennzeichnet (Collins et al., 2010, Collins, 2012, Gwathmey et al., 2014). Elektrophysiologisch, klinisch und histologisch lassen sich beide Formen nicht voneinander unterscheiden; entscheidend ist der Nachweis bzw. der Ausschluss einer systemischen Beteiligung. Die Therapie sowohl bei PNP bei systemischer Vaskulitis als auch bei NSVN ist die Gabe von Immunsuppressiva wie z.B. initial Steroiden und im Verlauf Cyclophosphamid (Sommer et al., 2012). Der Großteil der Patienten profitiert von dieser Therapie (Whitesell, 2010).

Die PIAN zeichnet sich durch einen akuten bis subakuten Beginn mit über Monate progredienter sensibler oder sensomotorischer Symptomatik aus. Ein asymmetrisches Verteilungsmuster der Symptome ist möglich. Die Patienten sind mäßig bis schwer

betroffen. Eine Ursache ist nicht feststellbar – auch systemische Autoimmunerkrankungen lassen sich nicht nachweisen. Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen findet sich ebenso wie bei der vaskulitischen PNP und bei der CIAP ein axonales Schädigungsmuster. Der Großteil der Patienten spricht gut auf eine Therapie mit Steroiden an. Ebenso ist eine spontane Besserung der Beschwerden möglich (Vrancken et al., 2004).

Die CIAP hat einen langsameren Beginn und schreitet weniger rasch fort als die PIAN; die stärkste Ausprägung der Neuropathie wird erst nach mehr als 24 Monaten erreicht. Typisch ist eine symmetrische Verteilung der überwiegend sensomotorischen Symptome. Schmerzen treten hier seltener auf als bei einer vaskulitischen PNP und bei der PIAN. Eine Steroidtherapie bewirkt typischerweise keine Besserung der Beschwerden (Vrancken et al., 2004).

#### **1.1.2.4. Erworbene PNP – paraproteinämische und paraneoplastische Neuropathie**

Zusätzlich zu den genannten Beispielen zu entzündlichen Neuropathien können PNP auch im Rahmen von Paraproteinämien auftreten beziehungsweise können mit einem Paraprotein assoziiert sein. Hierbei werden aus klinischen, therapeutischen und prognostischen Gründen insbesondere die IgM-assoziierten PNP von den übrigen IgG- oder IgA-assoziierten PNP unterschieden. Bei der IgG- oder IgA-assoziierten PNP finden sich elektrophysiologisch sowohl axonale, als auch entmarkende Schädigungsmuster. Klinisch und in ihrem therapeutischen Ansprechen ist die demyelinisierende Form häufig nicht von einer CIDP zu unterscheiden. Die IgM-assoziierte Neuropathie weist einen distal-symmetrischen, überwiegend sensiblen Verteilungstyp auf und verläuft meist chronisch. Dieser Phänotyp ist sehr häufig mit Anti-MAG-Antikörpern assoziiert (MAG = Myelin-assoziiertes Glykoprotein) und zeigt elektrophysiologisch ausgeprägte Demyelinisierungszeichen. IgM-assoziierte PNP sprechen in der Regel schlechter auf eine immunsuppressive Therapie mittels Steroiden an als IgG- und IgA-assoziierte Formen (Dyck et al., 1991, Zivkovic et al., 2009, Sommer et al., 2012). Weitere mögliche Ursachen für erworbene PNP sind bösartige Tumore, deren erstes Symptom eine paraneoplastische PNP sein kann. Das kleinzellige Lungenkarzinom sowie Mamma- beziehungsweise Ovarialkarzinome sind die am häufigsten mit einer paraneoplastischen PNP einhergehenden Tumore. Klinisch findet sich meist eine distal-symmetrische, oft schmerzhaft PNP, die in der elektrophysiologischen Untersuchung eine überwiegend axonale Schädigung aufweist. Die PNP bessert sich in der Regel bei Behandlung

des Primärtumors. Zusätzlich kann eine immunmodulatorische Therapie notwendig werden (Koike et al., 2011, Graus et al., 2013).

#### **1.1.2.5. Small fiber Neuropathie (SFN)**

Kommt es im Gegensatz zu den oben beschriebenen PNP, die immer eine Beeinträchtigung der dick-bemerkten Nervenfasern aufweisen, zu einem isolierten Befall der dünn-bemerkten A-delta und der unbemerkten C-Nervenfasern (sog. small fibers) spricht man von einer small fiber Neuropathie (SFN). Diese ist gekennzeichnet durch brennende Schmerzen an den Akren, die mit Par- und Dysästhesien einhergehen können. Neben den erworbenen SFN kommen seltener auch hereditäre Formen vor (Faber et al., 2012). Unter den zahlreichen Ursachen sind auch hier Diabetes mellitus und Alkohol am häufigsten (Gorson et al., 1995, Hoskisson et al., 2004). Die übrigen Differenzialdiagnosen decken sich weitgehend mit denjenigen der erworbenen PNP, sodass die diagnostische Abklärung überwiegend derjenigen bei PNP entspricht (Lacomis, 2002). Die Behandlung der SFN richtet sich nach der Ursache beziehungsweise erfolgt symptomatisch zur Linderung der neuropathischen Schmerzen oder Missempfindungen, falls keine Ursache gefunden werden kann (Hovaguimian et al., 2011).

#### **1.1.3. Diagnostik der PNP**

Zur differenzialdiagnostischen Untersuchung bei PNP ist neben der detaillierten Anamnese, dem klinischen Untersuchungsbefund und der elektrophysiologischen Analyse betroffener und nicht betroffener peripherer Nerven mittels Elektroneurographie sowie von Muskeln mittels Elektromyographie, eine ausführliche Labordiagnostik notwendig. Diese beinhaltet Basisparameter wie das Differentialblutbild mit Entzündungswerten, Elektrolyte, Leber-, Nieren- und Schilddrüsen-, sowie Blutzuckerwerte und muss je nach Verdachtsdiagnose um z.B. B-Vitamine oder Antikörperbestimmungen ergänzt werden (Heuss et al., 2012). Bei Erreger-bedingten entzündlichen Neuropathien können mittels Liquoranalyse die Erreger beziehungsweise Antikörper gegen die Erreger nachgewiesen werden; es findet sich dann meist auch eine Zellzahlerhöhung. Bei autoimmun-vermittelten Neuropathien, die in der Regel auch zu einer Mitbeteiligung der Nervenwurzeln führen, lässt sich in der Liquorpunktion als Hinweis auf eine Schrankenstörung eine Erhöhung des Liquoreiweiß nachweisen (Gold et al., 2005). Bei begründetem Verdacht auf eine hereditäre Neuropathie ist eine genetische Testung notwendig (England et al., 2009b). Falls nach dieser

ausführlichen Diagnostik keine Ursache für die PNP gefunden werden konnte, ist eine Nervenbiopsie indiziert, um insbesondere behandelbare inflammatorische Neuropathien wie eine vaskulitische PNP nachweisen zu können. Hierzu wird in der Regel der rein sensible und chirurgisch gut zugängliche N. suralis ausgewählt (England et al., 2005, England et al., 2009a).

Während sich mit den oben genannten Verfahren die dick-bemerkten Nervenfasern bei PNP gut untersuchen lassen, werden für die Analyse von dünn- und unbemerkten Nervenfasern bei SFN spezielle Untersuchungstechniken benötigt. Eine nicht-invasive Methode zur Beurteilung der Funktion unter anderem der A-delta und C-Fasern ist die quantitative sensorische Testung (QST) (Rolke et al., 2006). Mittels dieser psychophysischen Methode lässt sich beispielsweise das Temperatur- und Schmerzempfinden als Funktion der kleinkalibrigen Nervenfasern bei SFN Patienten untersuchen. Zur morphologischen Untersuchung der A-delta und C-Fasern wurde in den letzten Jahren als minimal-invasive Methode die Hautstanzbiopsie etabliert und in die klinische Routine eingeführt. Mittels immunhistochemischer Verfahren kann die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) ermittelt werden (Lauria et al., 2010), die bei SFN typischerweise reduziert ist. Des Weiteren kann anhand einer Hautbiopsie der subepidermale Nervenplexus und die Innervation von Schweißdrüsen und Hautgefäßen beurteilt werden (Heuss et al., 2012). Die Diagnose einer SFN kann gestellt werden, wenn neben der typischen klinischen Präsentation, angehobene thermische Wahrnehmungsschwellen in der QST-Untersuchung und/oder eine reduzierte IENFD in einer Hautbiopsie aus dem Unterschenkel nachgewiesen werden können (Lacomis, 2002, Devigili et al., 2008).

#### **1.1.4. Diagnosestellung bei PNP**

Trotz der zahlreichen diagnostischen Verfahren und dem Vorliegen diagnostischer Kriterien insbesondere für autoimmun-vermittelte PNP bleiben auch bei Durchführung aller Untersuchungen an neuromuskulären Zentren bis zu einem Drittel der PNP Fälle „unklarer Genese“ (Hughes, 2002, Singer et al., 2012). Die Einführung eines diagnostischen Biomarkers, der bei einfacher Anwendung eine hohe Treffsicherheit beispielsweise für unterschiedliche PNP Subgruppen bietet, wäre für eine frühe Diagnosestellung und Therapieeinleitung insbesondere bei behandelbaren PNP Formen wünschenswert.

## **1.2. Biomarker**

### **1.2.1. Definition und Anwendungsgebiete von Biomarkern**

Ein Biomarker ist eine Kenngröße, die objektiv messbar ist und als Indikator für normale oder pathologische biologische Prozesse sowie für pharmakologisches Ansprechen auf eine therapeutische Intervention dienen kann (Atkinson, 2001, Dancey et al., 2010). Biomarker können diagnostisch und prognostisch, ebenso wie zum Therapie-Monitoring eingesetzt werden (Atkinson, 2001).

### **1.2.2. Notwendigkeit von Biomarkern zur PNP-Diagnostik**

In anderen Bereichen der Medizin ist die laborchemische Erfassung von Biomarkern in der Diagnostik und Therapie bereits etabliert. Als Beispiele sind hier unter anderem der Rheumafaktor in der Diagnostik der rheumatoiden Arthritis oder das prostataspezifische Antigen (PSA) als Diagnose- und Verlaufsp Parameter beim Prostatakarzinom zu nennen (Jain, 2010). Für die Diagnose immunvermittelter PNP wäre ein Biomarker sehr wünschenswert, um die Diagnostik dieser potenziell behandelbare PNP zu verbessern und objektive Verlaufsp Parameter zu haben (Dalakas, 2011, Latov et al., 2011). Mittels der vorhandenen Diagnosekriterien (z.B. (Van den Bergh et al., 2010, van Schaik et al., 2010)) lassen sich zwar die meisten Patienten gut diagnostizieren, in atypischen Fällen kann es aber sein, dass die Diagnose nicht gestellt werden kann, weil einzelne Kriterien nicht erfüllt werden. In den vergangenen Jahren wurden einige Studien auf der Suche nach Biomarkern bei PNP durchgeführt. Insbesondere neuere Microarray-Studien zeigten in N. suralis-Biopsien von Patienten mit vaskulitischer PNP und CIDP veränderte Expressionsprofile für Inflammations- und Remyelinisierungsmarker (Renaud et al., 2005, Kinter et al., 2010, Steck et al., 2011). Unter anderem diese, an kleinen Fallzahlen auffälligen Kandidatengene könnten als Biomarker in der PNP-Diagnostik dienen und wurden neben anderen in vorliegender Arbeit genauer untersucht.

## **1.3. Potenzielle Biomarkerkandidaten in Nerven- und Hautbiopsaten**

### **1.3.1. Marker für Inflammation**

#### **1.3.1.1. Tachykinin precursor 1 (TAC1)**

Bei Tachykininen handelt es sich um eine Familie von amidierten Neuropeptiden, die als exzitatorische Neurotransmitter wirken. Sie werden überwiegend in Neuronen exprimiert

(Severini et al., 2002), sind jedoch z.B. auch in Herz, Milz oder Schilddrüse zu finden (Pinto et al., 2004). Das Gen für Tachykinin precursor 1 (TAC1) kodiert für mehrere evolutionär konservierte Peptide der Tachykininfamilie und wird in eines von vier möglichen Transkripten alternativ gespliced. Unter den unterschiedlichen Splice-Varianten von TAC1 befinden sich unter anderem Substanz P und Neurokinin A; beide sind im PNS und ZNS wesentlich an Entzündungsreaktionen und an der Schmerzweiterleitung beteiligt (Noguchi et al., 1995, Neumann et al., 1996, Shanley et al., 2011). Die intrakutane Injektion von Substanz P, nicht jedoch von Neurokinin A, verursacht Schmerzen an der Injektionsstelle. Neurokinin A potenzierte jedoch den algetischen Effekt von Substanz P: wenn beide Peptide gemeinsam injiziert wurden, kam es zu einem verlängerten Schmerz-assoziierten Verhalten beim Menschen (Pedersen-Bjergaard et al., 1989). In einer Microarray-Studie zeigte sich eine Hochregulation von TAC1-RNA in den N. suralis-Biopsaten von CIDP-Patienten verglichen mit Nervenproben gesunder Probanden. Sechs der acht untersuchten Patienten litten an neuropathischen Schmerzen, weshalb ein möglicher Zusammenhang zwischen der TAC1-RNA-Expression und Schmerz diskutiert wurde (Renaud et al., 2005).

#### **1.3.1.2. Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2)**

Bei der Collapsin mediator protein-Familie handelt es sich um zytosolische Phosphoproteine, die nach Verletzung sowohl in aussprossenden Nervenfasern des PNS als auch des ZNS gebildet werden (Schmidt et al., 2007). Bislang wurde die Rolle dieser Phosphoproteine v.a. im ZNS untersucht. Eines der fünf Mitglieder, Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2), wird während der embryonalen Gehirnentwicklung stark exprimiert, findet sich jedoch auch in anderen Geweben und Zellen, wie z.B. Lungengewebe und Monozyten (Rouzaut et al., 2000, Charrier et al., 2003). CRMP2 beeinflusst zudem die Axonanzahl und -länge, sowie die neuronale Polarität. Die Überexpression von CRMP2 induziert die Axonbildung und kann sogar die Umwandlung eines vorhandenen Dendriten in ein Axon bewirken (Inagaki et al., 2001, Arimura et al., 2004, Morita et al., 2009, Brittain et al., 2011). Als intrazellulärer Botenstoff ist CRMP2 für den Kollaps des neuronalen Wachstumskonus während des axonalen Wegfindungsprozesses verantwortlich (Lee et al., 2002) und wirkt maßgeblich an der Polymerisation der axonalen Mikrotubuli mit (Wilson et al., 2012). Des Weiteren hat CRMP2 einen negativen Effekt auf das neuronale Wachstum indem es sowohl die Anzahl Neurite tragender Zellen als auch die Länge der mittels nerve growth factor (NGF)

induzierten Neurite reduziert (Quach et al., 2004). In einer Studie von Brittain et al. konnte erstmals im Ratten- und Mausmodell gezeigt werden, dass der Komplex aus CRMP2 und einem präsynaptischen spannungsabhängigen Kalziumkanal (CAV2.2) eine Entzündungsreaktion bewirkt und neuropathische Schmerzen verursacht (Brittain et al., 2011). CRMP2 könnte daher ein potentieller Marker für entzündliche PNP sein und möglicherweise von pathophysiologischer Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen.

### **1.3.1.3. Allograft inflammatory factor 1 (AIF1)**

Allograft inflammatory factor 1 (AIF1) ist ein Kalzium-bindendes Protein, das durch Interferon- $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) induziert wird und die Immunantwort während der Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen moduliert (Utans et al., 1995, Zhao et al., 2013). AIF1 wird im menschlichen Gehirn insbesondere nach Hirninfarkten sowie Verletzungen von Mikrogliazellen und auch von Gliomen exprimiert. Im Rattenmodell der Autoimmunenzephalomyelitis und Uveitis fand sich ebenfalls eine gesteigerte AIF1 Expression, was darauf hindeutet, dass AIF1 möglicherweise bei Entzündungsprozessen hochreguliert wird (Beschorner et al., 2000, Deininger et al., 2000, Postler et al., 2000, Renaud et al., 2005). Im Rattenmodell der experimentellen Autoimmunneuritis ließ sich eine vermehrte AIF1-Expression im peripheren Nerven und im Serum nachweisen (Pashenkov et al., 2000). Im gleichen Modell konnte auch in der Mikroglia des Rückenmark-Parenchyms eine Aktivierung beobachtet werden. Einer der ersten Marker, der im Verlauf dieses Prozesses vermehrt von Mikrogliazellen exprimiert wird, ist AIF1 (Beiter et al., 2005). AIF1 wird von Makrophagen sezerniert und scheint ähnliche Effekte zu haben wie pro-inflammatorische Zytokine (Pashenkov et al., 2000). In glatten Gefäßmuskelzellen kommt AIF1 normalerweise nicht vor. Nach Verletzungen oder unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine wird AIF1 auch dort gebildet (Tian et al., 2007). Mittels Microarray-Analysen und Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass AIF1 in N. suralis-Biopsaten von Patienten mit CIDP und vaskulitischer PNP im Vergleich zu Nerven gesunder Personen vermehrt exprimiert wird. Bei CIDP und vaskulitischer PNP fand sich eine höhere Anzahl an AIF1-exprimierenden Zellen verglichen mit gesunden Nerven. Insbesondere glatte Gefäßmuskelzellen bei vaskulitischer PNP exprimierten vermehrt AIF1 (Renaud et al., 2005, Broglio et al., 2008). Lee et al. untersuchten mittels Microarray-Analysen und quantitativer

Real-Time-PCR (qRT-PCR) die Genexpression von AIF1 in Hautbiopsien vom Unterarm bei Patienten mit CIDP, Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1 (CMT1), sowie diabetischer Neuropathie und verglichen diese mit Hautbiopsaten von gesunden Personen. Bei einem Großteil der CIDP-Patienten war AIF1 verglichen mit gesunden Probanden in seiner RNA-Expression erhöht (Lee et al., 2010).

#### **1.3.1.4. Interleukin-6 (IL-6)**

Interleukin-6 (IL-6) ist ein überwiegend pro-inflammatorisches Zytokin, das v.a. von T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen freigesetzt wird. In seiner entzündungsfördernden Funktion induzierte es unter anderem die Akute-Phase-Reaktion in der Leber und ist als Pyrogen für die Entwicklung von Fieber mitverantwortlich (Nijsten et al., 1987). Zusätzlich besitzt IL-6 eine entgegengesetzte Wirkung als sogenanntes Myokin: IL-6 wird neben weiteren anti-inflammatorischen Zytokinen bei Muskelarbeit freigesetzt. Zu einer entzündungshemmenden Wirkung kommt es durch Signalwege, die sich von den klassischen pro-inflammatorischen Kaskaden in Immunzellen unterscheiden (Brandt et al., 2010). Damit ist IL-6 ein bifunktionales Zytokin, das überwiegend entzündungsfördernd, aber auch entzündungshemmend wirkt.

Mehrere tierexperimentelle Studien geben Hinweise darauf, dass IL-6 während und nach der Schädigung peripherer Nerven in pro-inflammatorische und regenerative Prozesse involviert ist (Bastien et al., 2014). Cafferty et al. konnten beispielsweise in murinen Spinalganglienzellkulturen zeigen, dass IL-6 das axonale Wachstum steigert (Cafferty et al., 2004). Weitere Studien im Rattenmodell gaben Hinweise darauf, dass IL-6 nach der Verletzung peripherer Nerven pro-inflammatorische Signalwege in Schwann-Zellen induziert, die für die Regeneration peripherer Nerven von Bedeutung sind (Lee et al., 2009a, Lee et al., 2009b). Auch in zahlreichen humanen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten IL-6-Expression und PNP hergestellt werden (Skundric et al., 2003). Beispielsweise fanden Maimone et al. erhöhte IL-6-Spiegel in Liquor und Serum von Patienten mit GBS und CIDP (Maimone et al., 1993). Weitere Studien stellen zudem einen Zusammenhang zwischen der IL-6-Produktion und neuropathischem Schmerz her (De Jongh et al., 2003). Dominguez et al. wiesen beispielsweise nach Ligation von Spinalnerven in Ratten einen deutlichen mRNA-Anstieg von IL-6 in den Spinalganglien und im dorsalen Rückenmark nach. Zudem zeigten sie IL-6 abhängige Signalwege in spinalen Mikrogliazellen auf, die zu neuropathischem Schmerz



führen (Dominguez et al., 2008). Weiterhin kommt es in schmerzhaften PNP verglichen mit schmerzlosen Erkrankungsformen zu einem Anstieg der IL-6-Expression in Nervenbiopsaten und auch in Hautproben von an PNP erkrankten Patienten verglichen zu gesunden Kontrollpersonen (Üçeyler et al., 2015b). Auch in den betroffenen Hautarealen von SFN-Patienten fand sich eine höhere IL-6-RNA-Expression als in nicht betroffenen Arealen und in Hautproben gesunder Personen (Üçeyler et al., 2010). Möglicherweise liegt in einer erhöhten IL-6-Genexpression auch eine Erklärung für die Schmerzhaftigkeit der SFN. Somit gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass IL-6 unter anderem durch seine vorwiegend entzündungsfördernde Wirkung an der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt ist (Austin et al., 2010).

### **1.3.2. Ausgewählte Marker für die Regeneration peripherer Nerven**

#### **1.3.2.1. Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)**

Die Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) ist ein Enzym des endoplasmatischen Retikulums, das die Biosynthese von einfach ungesättigten Fettsäuren, v.a. der Ölsäure, katalysiert. Die Ölsäure ist eine der Hauptfettsäuren im Myelin des PNS (Garbay et al., 1998). SCD hat zwei humane Isoformen, SCD-1 und SCD-5 (Paton et al., 2009), die bei Vorkommen in verschiedenen Geweben die gleiche Funktion haben (Liu et al., 2011). SCD-1 ist ubiquitär, während SCD-5 v.a. auf Gehirn und Pankreas beschränkt ist. Ratten weisen ebenfalls zwei, Mäuse vier SCD-Isoformen (SCD1-4) auf, wobei die Aminosäuresequenz jeweils zu einem Großteil mit den humanen Formen übereinstimmt (Paton et al., 2009, Wu et al., 2013). Breuer et al. zeigten bei Ratten mittels *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie eine erhöhte SCD-1-Proteinexpression nach Axotomie von Motoneuronen im PNS, nicht jedoch im ZNS. Dies kann auf eine Funktion von SCD-1 in Regenerationsprozessen peripherer Nerven hinweisen. Neben der Produktion von Zellmembranbausteinen scheint auch die Beteiligung von Ölsäure in Signaltransduktionswegen, die am Wachstum peripherer Nerven beteiligt sind, von Bedeutung zu sein (Breuer et al., 2004). Renaud et al. zeigten, dass SCD in N. suralis-Biopsaten von CIDP-Patienten verglichen mit Biopsaten von Patienten mit vaskulitischer PNP und verglichen mit normalen Nerven vermehrt exprimiert wird (Renaud et al., 2005). Auch Steck et al. fanden mittels Microarray-Analyse eine erhöhte Expression von SCD-RNA in Nervenbiopsaten von Patienten mit CIDP verglichen mit gesunden Nerven (Steck et al.,

2011). Hieraus wurde abgeleitet, dass SCD möglicherweise eine Rolle bei Remyelinisierungsprozessen spielen könnte.

#### **1.3.2.2. Netrin-1**

Netrin-1 ist Teil der Netrin-Familie, die aus konservierten Proteinen besteht, die große strukturelle Ähnlichkeit mit den Lamininen der Basalmembran besitzen (Yurchenco et al., 2004). Bei Netrin-1 handelt es sich um eines von drei sezernierten Netrinen, das überwiegend im Nervensystem von Säugetieren exprimiert wird (Baker et al., 2006). Im adulten PNS wird Netrin-1 hauptsächlich von Schwann-Zellen gebildet. Madison et al. zeigten in Rattenexperimenten, dass es nach der Durchtrennung eines Nerven zu einem Anstieg der Netrin-1 Gen- und Proteinexpression in Schwann-Zellen kommt (Madison et al., 2000). Netrin-1 dient als bifunktionaler Modulator des Axonwachstums. Ob es eine wachstumshemmende oder -fördernde Wirkung auf das Axon hat, ist abhängig von der Zusammensetzung seiner Rezeptoren auf der Oberfläche des axonalen Wachstumskonus (Huber et al., 2003, Round et al., 2007).

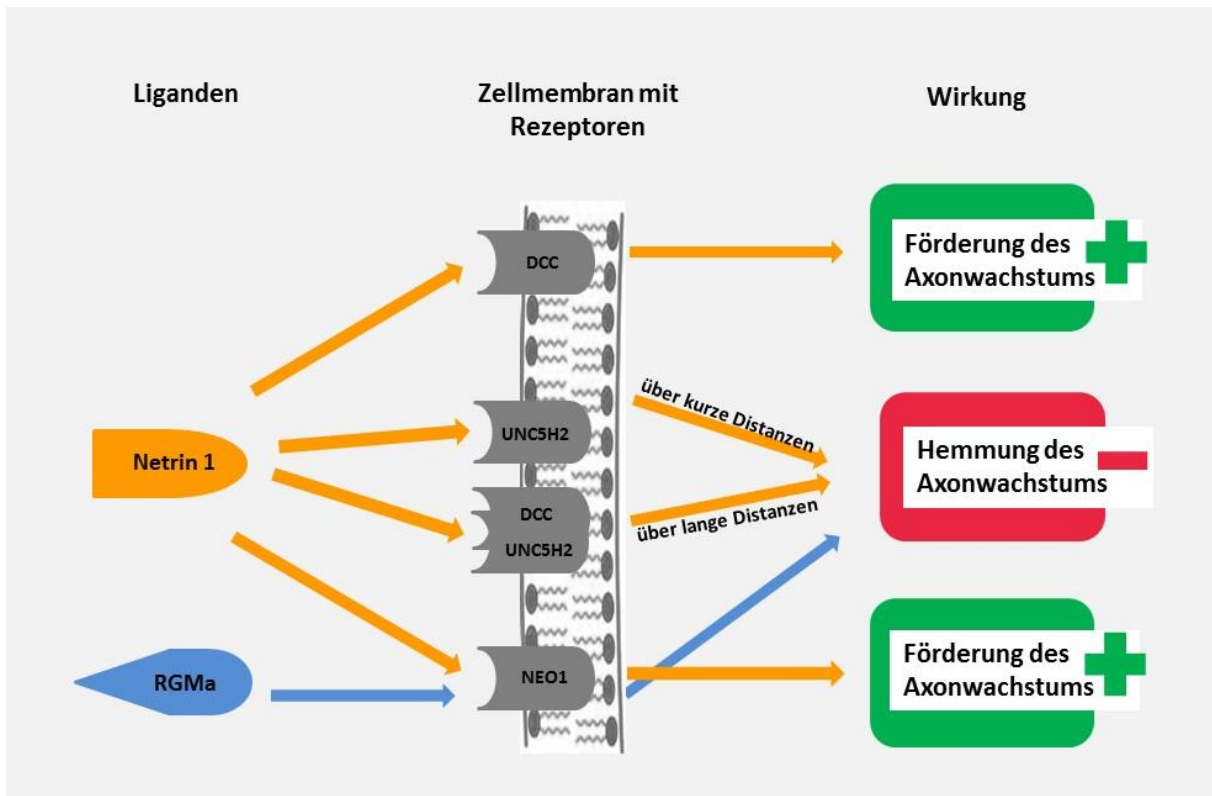
#### **1.3.2.3. Uncoordinated5H2 (UNC5H2) und deleted in colorectal cancer (DCC)**

Die bifunktionale Wirkung von Netrin-1 auf das Axonwachstum erfolgt überwiegend über zwei Rezeptorgruppen: die uncoordinated5 (Unc5)-Rezeptor Familie, von der beim Menschen bislang vier Vertreter (UNC5H1-4) identifiziert werden konnten (Leonardo et al., 1997, Cirulli et al., 2007) und die deleted in colorectal cancer (DCC)-Rezeptor Familie, die in Vertebraten aus den beiden Rezeptoren DCC und Neogenin-1 (NEO1) besteht. Bei UNC5H2 handelt es sich um ein Transmembranprotein. Die extrazelluläre Domäne besteht unter anderem aus zwei Immunglobulin-Einheiten, die für die Netrin-Bindung nötig sind (Geisbrecht et al., 2003). Bindet Netrin-1 an UNC5H2, führt dies zu einer Hemmung des Axonwachstums über kurze Distanzen (Ackerman et al., 1997, Cirulli et al., 2007). DCC ist ebenfalls ein Transmembranprotein und Teil der Immunoglobulin-Superfamilie. Es ist für die wachstumsfördernde Wirkung von Netrin-1 verantwortlich (Keino-Masu et al., 1996). Erstmals zeigten Hong et al., dass für eine das Axonwachstum hemmende Wirkung über lange Distanzen die gleichzeitige Expression von DCC und UNC5H2 notwendig ist (Hong et al., 1999). Das Netrin-1-DCC-UNC5H2-System hat v.a. eine indirekte Wirkung auf die regenerierenden Axone, indem es zu einer Aktivierung von Schwann-Zellen führt. Anhand eines Rattenmodells konnte gezeigt werden, dass nach einer peripheren Nervenschädigung

die Gen- und Proteinexpression in Schwann-Zellen für DCC erhöht und für UNC5H2 erniedrigt ist (Webber et al., 2011). Zudem lösen DCC und UNC5H2 in der Abwesenheit ihres Liganden Netrin-1 *in vitro* Apoptose aus, da beide Rezeptoren als Caspase-3-Substrate fungieren. Ihre Spaltung mittels Caspase-3 induziert den Zelltod (Mehlen et al., 1998).

#### **1.3.2.4. Neogenin-1 (NEO1)**

Analog zu DCC ist Neogenin-1 (NEO1) ein multifunktionaler Rezeptor und Teil der Immunoglobulin-Superfamilie. Beide Rezeptoren haben etwa 50% ihrer Aminosäuresequenz gemeinsam und weisen die gleiche Sekundärstruktur auf (Vielmetter et al., 1994, Wilson et al., 2007). Auch scheint NEO1 ähnlich wie DCC als ein das Axonwachstum fördernder Rezeptor für Netrin-1 zu fungieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass NEO1 im Zusammenspiel mit dem sogenannten repulsive guidance molecule (RGMa) auch einen wachstumshemmenden Effekt auf das Axon ausübt. Bei RGMa handelt es sich um einen alternativen Liganden, der kein Mitglied der Netrin-Familie ist (Wilson et al., 2006) und spezifisch an eine Domäne von NEO1, nicht jedoch an DCC, bindet (Rajagopalan et al., 2004). Die RGMs sind mit der Plasmamembran mittels Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verbunden, können jedoch in ihre extrazellulären Domänen gespalten werden um lösliche Isoformen zu produzieren. Die Abwesenheit von RGMa induziert darüber hinaus den Zelltod im Bereich des Neuralrohrs mittels Caspase-3-Aktivierung. Wohingegen vorhandenes RGMa die Caspase-3 inhibiert und somit den Zelltod verhindert (Koeberle et al., 2010). Es ist unklar, ob Netrin-1 und RGMa gleichzeitig an NEO1 binden können, oder ob die Liganden-Bindung sich gegenseitig ausschließt (Cole et al., 2007). Abb. 1 zeigt eine Übersicht der o.g. Ligand-Rezeptor-Interaktionen.



**Abb. 1:** Das Axonwachstum hemmende und fördernde Ligand-Rezeptor-Komplexe der Netrin-Familie  
 Abkürzungen: DCC = deleted in colorectal cancer, NEO1 = Neogenin-1, RGMa = repulsive guidance molecule, UNC5H2= Uncoordinated5H2; gelbe Pfeile markieren alle Signalwege, bei denen Netrin-1 als Ligand fungiert. Blaue Pfeile kennzeichnen den Signalweg mit RGMa als Ligand. Rot: Hemmung des Axonwachstums, Grün: Förderung des Axonwachstums.

### 1.3.2.5. Netrin-G1 und Netrin-G2

Bei Netrin-G1 und -G2 handelt es sich um Membranproteine mit einem GPI-Anker, die ebenfalls Teil der Netrin-Superfamilie sind. Netrin-G1 und -G2 sind enger miteinander verwandt als mit klassischen Netrinen und haben u.a. deshalb eine andere Funktion als diese. Sie konnten bislang nur in Vertebraten nachgewiesen werden und finden sich dort überwiegend im ZNS (Nakashiba et al., 2000, Nakashiba et al., 2002, Niimi et al., 2007). Netrin-G1 und Netrin-G2 regulieren die synaptischen Interaktionen zwischen Neuronen durch die Bindung an transmembrane Netrin-G-Liganden (NGL1 und NGL2) (Lin et al., 2003) und regulieren so das Wachstum von Axonen und Dendriten. Nakashiba et al. zeigten, dass dies sowohl in ihrer löslichen, als auch in membrangebundener Form möglich ist (Nakashiba et al., 2002). Über die Wirkung von Netrin-G1 und -G2 insbesondere im PNS ist bislang nur sehr wenig bekannt. Berg et al. zeigten mittels Rattenmodell, dass der Netrin-G-Ligand NGL-2 wahrscheinlich durch Beeinflussung der Synapse des regenerierenden Motoneurons in die motoneuronale Antwort nach Axotomie involviert ist (Berg et al., 2010).

## **1.4. Zielsetzung und Hypothesen der Studie**

### **1.4.1. Zielsetzung der Studie**

Ziel der Arbeit war die Detektion potenzieller Biomarker in Haut- und Nervenbiopsaten von Patienten mit schmerzhaften und schmerzlosen PNP, insbesondere zur Unterscheidung verschiedener ätiologischer Subgruppen.

### **1.4.2. Hypothesen**

- Die Genexpression ausgewählter Kandidatengene in Hautproben und N. suralis-Biopsaten von Patienten mit inflammatorischen und schmerzhaften PNP ist im Vergleich zu nicht-inflammatorischen und schmerzlosen PNP und im Vergleich zu Hautproben von gesunden Probanden erhöht.
- Unterschiedliche diagnostische PNP-Subgruppen zeigen voneinander unterscheidbare Expressionsprofile für Marker der Regeneration peripherer Nerven.

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1. Patientenkollektiv**

Für unsere prospektive Studie wurden von 2010 bis 2012 insgesamt 97 Patienten mit PNP unterschiedlicher Genese rekrutiert. Alle Patienten befanden sich zur diagnostischen Abklärung bei „PNP unklarer Genese“ stationär oder ambulant in der Neurologischen Universitätsklinik in Würzburg. Voraussetzungen für die Studienaufnahme waren: Volljährigkeit sowie die Erkrankung an einer schmerzlosen oder schmerzhaften PNP. Ausschlusskriterien waren eine aktuell durchgeführte chemotherapeutische oder immunsuppressive Therapie, sowie akute Infekte (klinisch und/oder laborchemisch). Alle Studienteilnehmer wurden sowohl schriftlich als auch mündlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

### **2.2. Gesundes Kontrollkollektiv für Hautstanzbiopsien**

Es konnten 23 gesunde Kontrollpersonen für die Studie gewonnen werden. Bei den freiwilligen Kontrollpersonen handelte es sich um Verwandte, Freunde, sowie Patienten der benachbarten Universitätsaugenklinik ohne neurologische Erkrankung. Einschlusskriterien waren: Volljährigkeit, kein Hinweis auf eine PNP (keine akuten oder chronischen Schmerzen, kein Hinweis auf Diabetes mellitus, normale elektrophysiologische Messung des N. suralis). Die Ausschlusskriterien lauteten: PNP, neurologische Erkrankungen, Diabetes mellitus, Malignome und immunsuppressive bzw. chemotherapeutische Behandlungen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Personen, die Kontraindikationen gegen eine Hautstanzbiopsie wie Wundheilungsstörungen oder lokale Entzündungen an den betroffenen Hautstellen hatten.

### **2.3. Klinische Untersuchung**

#### **2.3.1. Anamnese und neurologische Untersuchung**

Im Rahmen der Routinediagnostik wurde bei jedem Studienteilnehmer neben einer ausführlichen Anamnese, insbesondere bezüglich ihrer Schmerzen, auch ein vollständiger neurologischer Untersuchungsbefund erhoben.

#### **2.3.2. Laboruntersuchungen aus Blut und Liquor**

Zur ätiologischen Einordnung der PNP wurden bei jedem Patienten folgende Laborwerte bestimmt: kleines Blutbild, Differentialblutbild, C-reaktives Protein (CRP), Blutkörperchengeschwindigkeit, Leber-, Nieren- und Schilddrüsenfunktionsparameter

sowie Serumelektrolyte. Des Weiteren erfolgte die Durchführung eines Blutzuckertagesprofils sowie die Bestimmung des HbA1C (falls kein Diabetes mellitus bekannt war und der HbA1C bei  $\leq 7\%$  lag: zusätzliche Durchführung eines oralen Glucosetoleranztests [OGTT]). Zudem wurden bei entsprechenden Hinweisen auf einen möglichen Mangel Vitamin B12 (bei niedrig normalem Spiegel zusätzlich Methylmalonylsäure), Vitamin B6 und Folsäure bestimmt - bei Hinweisen oder Verdacht auf eine autoimmune Erkrankung ergänzend Rheumafaktor, Antinukleäre Antikörper (ANA) und Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper (ANCA). Die Liquoranalyse umfasste neben der Bestimmung von Zellzahl und Liquoreiweiß auch eine Immunfixation mit isoelektrischer Fokussierung auf oligoklonale Banden.

### **2.3.3. Elektroneurographie**

Um das Ausmaß und die Art der Beteiligung dick-bemerkter Nervenfasern beurteilen zu können, wurde jeder Patient entsprechend seiner Symptome und der individuellen Beteiligung der Extremitätenmuskeln mittels standardisierter elektrophysiologischer Messungen eines sensiblen Nerven (z.B. N. suralis) und mindestens dreier motorischer Nerven (z.B. N. tibialis, N. peroneus, N. medianus, N. ulnaris) untersucht. Entsprechend der Labor-internen Normwerte gilt für motorische Nerven eine CMAP Amplitude (compound muscle action potential, Muskelssummenaktionspotential) von  $\geq 10$  mV (Ausnahme N. peroneus  $\geq 5$  mV) als normal. Für den sensiblen N. suralis gilt eine SNAP Amplitude (sensory nerve action potential, sensibles Nervenaktionspotential) von  $\geq 10$   $\mu$ V (bei Alter  $\geq 65$  Jahre: 5  $\mu$ V) als normal. Der Normwert für die Nervenleitgeschwindigkeit liegt für alle Nerven bei  $\geq 40$  m/s.

### **2.3.4. Hautstanzbiopsien bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen**

Um die Probenentnahme zu standardisieren wurde am linken Unterschenkel etwa 10 cm oberhalb des Außenknöchels, sowie an der linken Oberschenkelaußenseite etwa 20 cm unterhalb der Spina iliaca anterior superior biopsiert. Die Biopsie erfolgte nach einem standardisierten Protokoll unter sterilen Bedingungen und unter Lokalanästhesie mittels einer Hautstanze (Biopsy Punch 5 mm, FA Stiefel, Deutschland) (Sommer et al., 2007). Nach Sprühdesinfektion der betreffenden Hautstellen erfolgte die lokale subkutane Anästhesie mittels Scandicain 1%. Anschließend wurde jeweils eine ca. 3 mm tiefe Biopsie entnommen. Die Biopsiestelle wurde mit sterilen Pflasterstreifen (Leukostrip, Smith & Nephew, Medical

Limited, England) und Hautpflastern (Leukomed, FA BNS medical GmbH, Hamburg, Deutschland) versorgt. Die Biopsate wurden in der Mitte geteilt: die Hauthälfte für die Genexpressionsanalyse wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert; die zweite Hälfte für die immunhistochemische Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD) wurde für 30 min in 4% PFA gegeben. Anschließend erfolgte die dreimalige Waschung mit 0,1M Phosphatpuffer und Lagerung in 10% Saccharose bei 4°C.

### **2.3.5. Biopsie des N. suralis bei Patienten**

Die diagnostische Biopsie des N. suralis erfolgte bei allen Patienten in Lokalanästhesie an der Standardstelle in Höhe des Malleolus lateralis und wurde an der Neurochirurgischen Universitätsklinik Würzburg nach einem etablierten Verfahren durchgeführt (Üçeyler et al., 2015a). Während des Eingriffs erfolgte – falls noch nicht geschehen – auch die Entnahme einer distalen Hautprobe aus der Inzisionsstelle. Die Hälfte der entnommenen Haut- bzw. Nervenproben wurde zur Genexpressionsanalyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Der Rest der N. suralis Biopsates wurde für die histologische Routinediagnostik aufgearbeitet.

### **2.3.6. Einteilung des Patientenkollektivs in diagnostische Subgruppen**

Insgesamt wurden anhand der klinischen Präsentation, der laborchemischen und elektrophysiologischen Kriterien, der histologischen Befunde der N. suralis-Biopsate und des Ansprechens auf eine immunmodulierende Therapie zehn diagnostische Subgruppen festgelegt. Im Folgenden sind die Subgruppen gemeinsam mit den angewendeten Diagnosekriterien aufgeführt:

- CIAP: Patienten mit sensomotorischen Symptomen und einem langsamen Krankheitsbeginn sowie -progress, die in den elektrophysiologischen Messungen ein axonales Schädigungsmuster aufwiesen, welches sich auch in der histologischen Untersuchung – ohne zusätzlichen Nachweis von Entzündungszeichen – fand, wurden dieser Subgruppe zugeteilt. Zudem fanden sich bei diesen Patienten ein normwertiges Liquoreiweiß und eine reduzierte IENFD. Mittels Steroidtherapie war keine Besserung der Symptomatik zu erzielen (Vrancken et al., 2004).



- Die Diagnose der CIDP wurde anhand der INCAT-Kriterien gestellt. Diese beinhalten neben klinischen auch elektrophysiologische und histologische Kriterien (Hughes et al., 2001, Sander et al., 2003).
  - CIDP : CIDP, die die INCAT-Kriterien erfüllten.
  - Klinische CIDP: Hierunter wurden Patienten mit den typischen Symptomen einer CIDP, entsprechenden Laborergebnissen sowie elektrophysiologischen und histologischen Zeichen einer demyelinisierenden PNP, die die INCAT-Kriterien jedoch nicht erfüllen, zusammengefasst.
  - Sensible CIDP: Diese Patienten wiesen für mindestens zwei Monate rein sensible Symptome auf. Des Weiteren fanden sich in der neurophysiologischen Untersuchung Zeichen der Demyelinisierung. Auch in der Nervenbiopsie zeigten sich demyelinisierende sowie entzündliche Veränderungen. Darüber hinaus waren das Liquoreiweiß erhöht und die IENFD in der distalen Hautbiopsie war normal bis leicht reduziert (Färbung mittels pan-axonal marker protein gene product 9.5 = PGP9.5). Es lag ein positives Ansprechen auf eine Steroid-Therapie vor (Üçeyler et al., 2015b).
- Eine diabetische PNP wurde bei Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 sowie bei typischen klinischen, laborchemischen und einem typischerweise axonalem Schädigungsmuster in den elektrophysiologischen Messungen diagnostiziert.
- Die Diagnose einer hereditären Neuropathie wurde bei einer positiven genetischen Testung beziehungsweise bei passender klinischer Präsentation und entsprechenden elektrophysiologischen Ergebnissen sowie einer auffälligen Familienanamnese gestellt (Tazir et al., 2014).
- Paraproteinämische Neuropathien: Hierunter wurden alle PNP mit einem IgM-Paraprotein mit oder ohne anti-MAG-Antikörper zusammengefasst (Hadden et al., 2010).
- PIAN: Hierunter wurden Patienten mit akutem bzw. subakutem Krankheitsbeginn und langsamem Fortschreiten der sensomotorischen Symptome sowie einem axonalen Schädigungsmuster in den neurophysiologischen Untersuchungen zusammengefasst. Histologisch fanden sich neben der axonalen Schädigung außerdem Entzündungszeichen. Das Liquoreiweiß war erhöht und die distale IENFD reduziert bzw. es waren keine intraepidermalen Nervenfasern mehr nachweisbar.

Unter Steroidtherapie kam es zu einer Besserung der Symptomatik (Vrancken et al., 2004).

- Die Diagnose einer SFN wurde gemäß der veröffentlichten Diagnosekriterien gestellt (Lacomis, 2002, Devigili et al., 2008).
- Alle weiteren Diagnosen, die lediglich ein einziges Mal vorhanden waren, wurden unter ‚Sonstige‘ zusammengefasst.
- Alle Patienten, die keiner dieser diagnostischen Subgruppen zugeordnet werden konnte, wurden als Patienten mit PNP ‚unklarer Genese‘ klassifiziert.

### **2.3.7. Standardisierte Untersuchungs-Scores für PNP**

Bei allen Patienten wurden zwei standardisierte PNP Scores erhoben:

Der Overall Disability Sum Score (ODSS) (Merkies et al., 2002) und der modifizierte Toronto Clinical Neuropathy Score (mTCNS) (Bril et al., 2009). Der ODSS erfasst die Ausprägung der motorischen Beteiligung bei PNP an Armen und Beinen. Dem Patienten werden Fragen zur Fein- und Grobmotorik der oberen Extremitäten gestellt. Zudem wird nach dem Gangbild, dem Einsatz von Gehilfen, sowie der Bewegungsfähigkeit der Beine bei Bettlägerigkeit beziehungsweise nach Rollstuhlpflicht gefragt. Der Score ist vor allem geeignet um den Verlauf von Beeinträchtigung und Behinderung bei immunologisch vermittelten PNP zu erfassen (Merkies et al., 2002). Es können 0 bis 12 Punkte erreicht werden. Niedrige Punktwerte bedeuten eine geringe, hohe Punktwerte eine starke motorische Beteiligung.

Der mTCNS fragt verschiedene PNP-Symptome ab und inwiefern diese mit dem Wohlbefinden beziehungsweise den Alltagsaktivitäten des Patienten interferieren. Darüber hinaus erfolgt eine Untersuchung der Sensibilität an den unteren Extremitäten. Der Score eignet sich insbesondere zur Quantifizierung von leichten bis mittelgradigen, insbesondere distal symmetrischen PNP. Es können 0 bis 33 Punkte erreicht werden. Niedrige Punktwerte bedeuten eine geringe, hohe Punktwerte eine stark ausgeprägte Symptomatik.

### **2.3.8. Schmerz- und Depressionsfragebögen**

Jeder Patient wurde mittels standardisierter Schmerz- und Depressionsfragebögen untersucht. Dabei wurden folgende Fragebögen verwendet: die deutsche Version des Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) (Bouhassira et al., 2004, Sommer et al., 2011), die Graded Chronic Pain Scale (GCPS) (Von Korff et al., 1992) und die Allgemeine Depressionsskala (ADS) (Hautzinger, 1993). Der NPSI dient der Beurteilung verschiedener

Dimensionen neuropathischer Schmerzen. Es wird nach brennendem Schmerz, Druckschmerz, Schmerzattacken, Schmerzauslösern, sowie Gefühlsstörungen (Parästhesien und Dysästhesien) gefragt. Der erfragte Zeitraum beträgt die letzten 24 Stunden. Diese Kategorien werden abhängig von der Intensität auf einer numerischen Ratingskala (NRS) von 0 bis 10 zugeordnet, wobei 0 Schmerz- bzw. Symptombefreiheit und 10 dem stärksten vorstellbarem Schmerz bzw. Symptom entspricht. Zusätzlich beinhaltet der NPSI zwei Fragen nach dem zeitlichen Verlauf der neuropathischen Schmerzen sowie ein Körperschemabild zur Markierung der Schmerzlokalisierung. Insgesamt können maximal 100 Punkte erreicht werden, wobei ein niedriger Wert wenig Schmerz, ein hoher Wert starke Schmerzen bedeutet (Bouhassira et al., 2004, Sommer et al., 2011).

Der GCPS erfragt in seiner Originalversion neben der aktuellen Schmerzstärke auch die schmerzbedingten Alltagseinschränkungen in den vergangenen sechs Monaten mittels einer NRS (Intensität von 0 bis 10) (Von Korff et al., 1992). Der Zeitraum wurde für die vorliegende Arbeit insofern modifiziert, als dass nicht nach den vergangenen sechs Monaten, sondern nach den letzten vier Wochen gefragt wurde, da sich die Patienten häufig nicht an das vergangene halbe Jahr erinnern konnten. Zudem wurde die Frage nach dem maximalen Schmerz innerhalb der letzten vier Wochen zur Unterteilung der Patienten in schmerzhaft und schmerzlose PNP verwendet. Eine PNP wurde bei  $NRS \geq 3$  als schmerzhaft gewertet.

Da bei Patienten mit Schmerzen häufig auch depressive Symptome vorliegen, wurde jedem Patienten die ADS ausgehändigt. Hierbei wird nach der Anzahl der Tage mit negativen Gedankenmustern, körperlichen Beschwerden und Kernsymptomen einer Depression in der vergangenen Woche (vergangene sieben Tage) gefragt. Ein Punktwert  $>16$  wird als Indikator für eine signifikant depressive Stimmungslage gewertet (Hautzinger, 1993).

## **2.4. Genexpressionsanalyse aus Haut- und Nervenproben**

### **2.4.1. RNA-Extraktion aus Hautproben**

Zunächst wurde jede Probe in einem 2 ml Cap auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde jeweils 1 ml Trizol® (FA Invitrogen, Carlsbad, USA) zugeführt und es erfolgte die Homogenisierung jeder Probe für mindestens 1 min mittels eines Micra-Homogenisator (ART Prozess und Labortechnik, Deutschland). Bis zu diesem Zeitpunkt standen alle Proben auf Eis. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 sec gevortext (Vortexer GLW L46) und anschließend für 3 min bei 25°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine 15minütige

Zentrifugation bei 12.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 4°C (Zentrifuge 5417, FA Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Es zeigte sich eine Dreischichtung: der klare Überstand wurde ohne proteinhaltige Interphase vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Cap überführt. Zu jeder Probe wurden dann 500 µl Isopropanol gegeben, gevortext und 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min (12.000 rpm und 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, ohne dass sich das Pellet vom Capboden löste. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol aufgelöst, gevortext und nochmals für 5 min zentrifugiert (7.500 rpm und 4°C). Der Überstand wurde erneut dekantiert und das die RNA enthaltende Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bis kein Ethanol mehr vorhanden war. Das Pellet wurde schließlich in 33 µl DEPC-Wasser gelöst, gevortext und bei -20°C über Nacht gelagert.

#### **2.4.2. RNA-Extraktion aus Nervenproben**

Zu Beginn wurde das Gewebe in 2 ml Caps auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 600 µl Trizol® zugegeben und für mindestens 30 sec mittels eines Micra-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor 300 µl Chloroform zu jeder Probe gegeben und gevortext wurde. Dann erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C, nach der sich eine deutliche Dreischichtung bildete. Die klare obere Phase wurde, ohne die proteinhaltige Interphase mitzunehmen, in ein neues 1,5 ml Cap überführt. Es wurden jeweils 1,1 µl Glykogen (FA Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), sowie 600 µl Isopropanol zugegeben, gevortext und die Proben über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst eine 15minütige Zentrifugation der Proben (13.000 rpm und 4°C). Der Überstand wurde dann, ohne dass Pellet zu verlieren, dekantiert. Mittels 1 ml 75% Ethanol wurde das Pellet gelöst. Dann wurden die Proben gevortext und für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut dekantiert. Die anschließende Trocknung des Pellets erfolgte mit geöffnetem Deckel bei 42°C für 15 min auf dem Heizblock (FA Liebisch, Bielefeld, Deutschland). Zuletzt wurden jeder Probe 33 µl DEPC-Wasser zugeführt und alles bei 55°C für 10 min auf dem Thermoschüttler (TS 100 Thermoshaker, Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland) inkubiert und über Nacht bei -20°C gelagert.

### 2.4.3. Messung der optischen Dichte

Die Messung der optischen Dichte erfolgte mittels eines Spectrophotometers (NanoDrop 1000 FA Thermo Scientific, Wilmington, USA) und zugehöriger PC-Software (NanoDrop 1000 V3.8.1 Windows 7 0 FA Peqlab, Erlangen, Deutschland). Neben RNA-Gehalt in ng/µl wurden auch die 260/280- und 260/230-Ratio bestimmt, die ein Maß für den Reinheitsgrad der RNA-Probe sind.

### 2.4.4. Reverse Transkriptions-PCR bei Nerv- und Hautproben

Die reverse Transkriptions-PCR dient der Umschreibung von extrahierter messenger-RNA (mRNA) in copy-DNA (cDNA). Für die reverse Transkription der Haut- und Nervenproben waren 500 ng RNA nötig. Diese wurden in einem Volumen von 34,75 µl je Probe in 200 µl Caps eingesetzt. Die Volumendifferenz wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Im Anschluss daran wurde der Premix pipettiert. Je Reaktionsansatz kamen folgende Reagenzien (Taq Man Reverse Reagents, FA Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in den in untenstehender Tabelle angegebenen Konzentrationen in ein neues 2 ml Cap:

Reagenz	Volumen je Probe
10xRT Buffer	10 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	22 µl
deoxyNTPs Mixture	20 µl
Random Hexamers	5 µl
RNase Inhibitor	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	6,25 µl

**Tabelle 1: Premix-Pipettierschema für reverse Transkriptions-PCR**

Pro Probe wurden 65,25 µl des Premix zum RNA-Ansatz pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab. Anschließend wurden die Proben gevortext und in den Thermocycler (Advanced Primus 96, FA Peqlab, Erlangen, Deutschland) gegeben. Die Cyclo-Einstellungen sind in untenstehender Tabelle aufgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Primer-Bindung (Annealing)	25°C	10 min
Reverse Transkription	37°C	60 min
Enzyminaktivierung	95°C	5 min

**Tabelle 2: Cyclo-Einstellungen für reverse Transkriptions-PCR**

Die cDNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

## **2.4.5. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)**

### **2.4.5.1. Prinzip der qRT-PCR**

Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR nach der sogenannten TaqMan-Methode. Sie ermöglicht eine Echtzeit-Fluoreszenzmessung, sowie Quantifizierung der amplifizierten Genfragmente. Der sogenannte Ct-Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen, um ein detektierbares überschwelliges Fluoreszenzsignal zu erhalten. Er verhält sich umgekehrt proportional zur Expression des Zielgens (Bustin, 2000, Holzapfel, 2007). Für Hautproben wurde auf jeder PCR-Platte zudem eine Kalibratorprobe gemessen. Dieser fungierte als interne Kontrolle zur Vergleichbarkeit der PCR-Läufe. Hierfür wurde die Genexpression aller Kontrollpersonen für jedes Zielgen gemessen. Die Probe, die dem Mittelwert aller Messungen für ein Zielgen am nächsten kam, wurde zum Kalibrator bestimmt. Da für die Nervenproben kein Kontrollmaterial zur Verfügung stand, wurde hier eine Probe aus in unserem Labor routinemäßig isolierten peripheren Blutmonozyten eines Probanden verwendet. Diese Probe wurde zur Vergleichbarkeit der einzelnen Läufe mit dem Primer Tumor Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) auf jede Platte pipettiert. Nur PCR-Läufe, deren arithmetisch gemittelter Ct-Wert innerhalb der Läufe um weniger als einen Ct-Wert schwankte, wurden für die endgültige Auswertung verwendet. Um Rückschlüsse auf das gesamte individuelle Expressionsniveau der Proben zu erlangen und um eine interne Normalisierung vornehmen zu können, wurde 18sRNA als endogene Kontrolle verwendet.

### **2.4.5.2. Praktische Durchführung der qRT-PCR**

Zunächst wurden die Reaktionsansätze für die Zielgene und die 18sRNA hergestellt und anschließend in 96-Well-Platten (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 mL, FA Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt eine definierte Menge an destilliertem und sterilem Wasser, Master- Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, FA Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), sowie den jeweiligen Primer. In den untenstehenden Tabellen sind die Pipettierschemata zur Herstellung der Reaktionsansätze, sowie die verwendeten Primer (Taq Man, Gene expression assay, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) aufgeführt:

Reagenz	Volumen für Zielgen
Destilliertes Wasser	1,75 µl
Master-Mix	2 µl
Primer	0,25 µl

**Tabelle 3: Reaktionsansatz pro Well für Zielgen**

Reagenz	Volumen für 18s
Destilliertes Wasser	4,25 µl
Master-Mix	2 µl
Primer	0,25 µl

**Tabelle 4: Reaktionsansatz pro Well für 18sRNA**

Zunächst wurde in jedes Well der 96 Well-Platte der Reaktionsansatz gegeben. In die für die Messung des Zielgens in den Proben bzw. dem Kalibrator bestimmten Wells wurden jeweils 4 µl pipettiert. In die Wells, die für die 18s-Bestimmung vorgesehen waren, wurden 6,5 µl Reaktionsansatz gefüllt. Die Proben und der Kalibrator wurden als Triplettes, die 18s-Proben als Doublettes pipettiert, da letztere sehr stabile Ct-Werte ergeben. Um sicherzugehen, dass keine Kontamination vorliegt, wurde zusätzlich eine Leerprobe ohne cDNA auf der gleichen Platte gemessen. In die Wells, die für die Bestimmung des Zielgens gedacht waren, wurden jeweils 5 µl cDNA-Probe geben. Die Leerprobe wurde mit 5 µl destilliertem und sterilem Wasser aufgefüllt. In die Vertiefungen, die für die 18s-Messung bestimmt waren, wurden jeweils 2,5 µl cDNA-Probe gegeben. Jedes Well der Platte enthielt somit ein Gesamtvolumen von 9 µl. Anschließend wurde die Platte mittels einer speziellen Folie (Optical Adhesive Covers, FA Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) versiegelt und in den PCR-Cycler (StepOnePlus TM, FA Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) eingebracht. Folgende Cycler-Einstellungen wurden vorgenommen: Es wurden 40 Zyklen und 9 µl Ansatz pro Vertiefung auf der 96 Well-Platte eingestellt.

Prozess	Temperatur	Dauer
Annealing	50°C	2 min
Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Extension	60°C	1 min

**Tabelle 5: Cylcereinstellungen**

Die relative mRNA-Expression des Zielgens in den Patientenproben wurde mittels der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bestimmt (Livak et al., 2001). Sowohl der Ct-Wert der Probe, als auch des Kalibrators wurde zunächst in Bezug zum Haushaltsgen gesetzt und anschließend voneinander subtrahiert.

Daher gilt für alle Proben:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct-Wert (Zielgen der Probe)} - \text{Ct-Wert (Haushaltsgen; 18s)}$$

Niedrigere  $\Delta\text{Ct}$ -Werte (d.h. eine Probendetektion bei frühen PCR-Zyklen) bedeuten eine höhere Genexpression. Um dies besser veranschaulichen zu können, entschieden wir uns die Ergebnisse der  $\Delta\text{Ct}$ -Messungen reziprok darzustellen ( $1/\Delta\text{Ct}$ ). Somit zeigen höhere Werte eine höhere Genexpression an.

Für die Auswertung der Hautproben wurden weitere Berechnungen vorgenommen, da hier sowohl proximale, als auch distale Biopsate, sowie Proben gesunder Kontrollpersonen vorlagen.

- 1) Für den inter-individuellen Vergleich wurden die individuell auf 18sRNA normalisierten Werte ( $\Delta\text{Ct}$ ) sowohl für die proximalen als auch die distalen Hautproben ermittelt. Diese Werte wurden mit Kontrollen verglichen und als  $\Delta\Delta\text{Ct}$  bezeichnet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Patient)} - \Delta\text{Ct (Kalibrator)}$$

Hier bedeuten hohe  $\Delta\Delta\text{Ct}$  eine hohe Genexpression.



- 2) Um einen intra-individuellen Vergleich herstellen zu können, wurde die Genexpression der distalen Hautprobe mit der proximalen Probe für jedes Zielgen verglichen. Der Wert der proximalen Probe wurde auf den Wert 1 normalisiert und als interner Kalibrator für jeden einzelnen Patienten gebraucht. Der auf diese Weise ermittelte Wert wird als intraindividuelles  $\Delta\Delta C_t$  bezeichnet. Auch hier entsprechen hohe Werte einer hohen Genexpression.

#### **2.4.6. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Statistical Package for Social Science (SPSS-Version 21, IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Da die Daten im Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigten, wurden sowohl der nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test, als auch der nicht-parametrische (ANOVA) Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Um eine mögliche Korrelation zwischen zwei Variablen zu beschreiben, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Hierbei können Werte zwischen -1 und 1 angenommen werden, je nachdem wie stark oder schwach die Variablen miteinander korrelieren. Für alle Tests lag das Signifikanzniveau bei  $p < 0,05$ .

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Patientenkollektiv**

##### **3.1.1. Demographische Daten**

Es wurden 97 Patienten (75 Männer, 22 Frauen) rekrutiert. Das mediane Alter betrug 62 Jahre (Range 23-84 Jahre). Der Altersmedian der Männer betrug ebenso wie im Gesamtkollektiv 62 Jahre (Range 23-84 Jahre). Der Altersmedian der Frauen betrug 66 Jahre (Range 31-81 Jahre). 63 Patienten (64,9%) litten an einer schmerzhaften PNP, 34 Patienten (35,1%) an einer schmerzlosen PNP. Die Einteilung in schmerzhafte und schmerzlose Erkrankungsformen erfolgte anhand der Frage des GCPS-Fragebogens nach dem maximalen Schmerz innerhalb der letzten vier Wochen. Eine PNP wurde als schmerzhaft gewertet, wenn hier ein Wert von mindestens drei Punkten auf der NRS erreicht wurde.

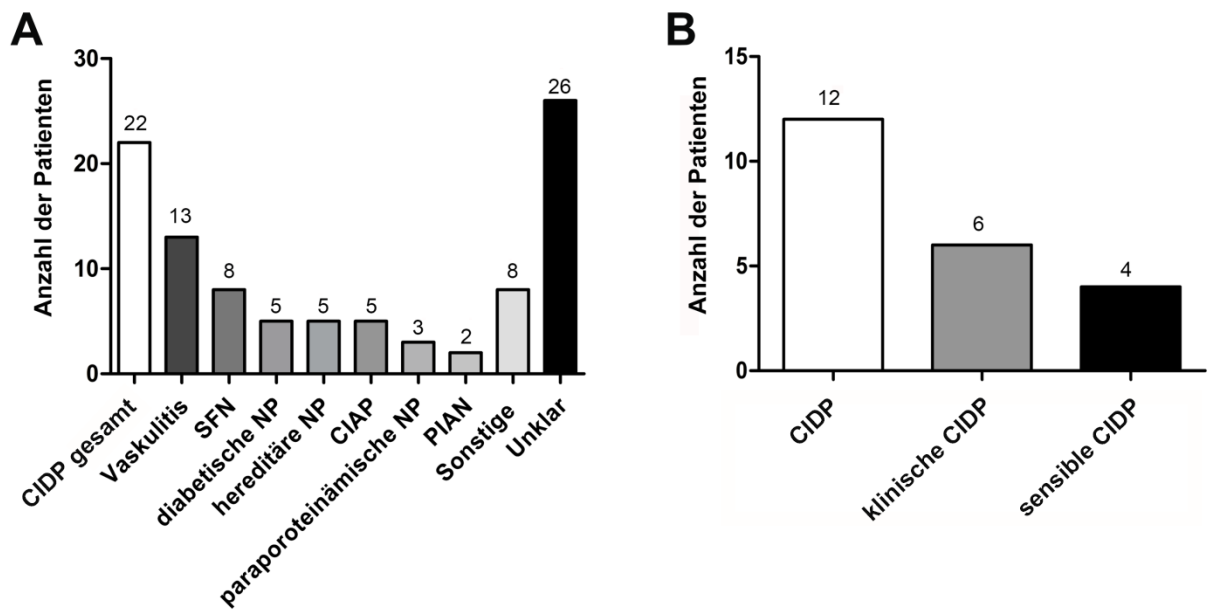
##### **3.1.2. Verteilung der diagnostischen Subgruppen**

Bei 71/97 Patienten (73,2%) konnte die PNP Ursache geklärt werden; in 26/97 Fällen (26,8%) blieb auch nach Durchführung einer Nervenbiopsie die zugrunde liegende Ätiologie unklar. Folgende acht diagnostische Subgruppen wurden anhand von Diagnosekriterien (siehe 2.3.6.) festgelegt: CIAP, CIDP, diabetische Neuropathie, Paraproteinämische Neuropathie, PIAN, SFN, vaskulitische PNP. In der Subgruppe „Sonstige“ wurden alle Diagnosen zusammengefasst, die lediglich ein einziges Mal innerhalb der Studienpopulation auftraten:

- Neuropathie aufgrund von Niereninsuffizienz
- Adrenomyeloneuropathie
- PNP bei Syndrom mit Nachweis einer heterozygoter Mutation im OPA1-Gen
- Toxische Neuropathie aufgrund von Sulfasalazin-Exposition
- MADSAM
- Sensible PNP bei Ganglionitis
- Amyloidneuropathie bei B-Zell-Lymphom
- Familiäre Amyloidneuropathie

Alle Patienten, bei denen keine endgültige Zuordnung zu einer der oben genannten diagnostischen Subgruppen möglich war, wurden als ‚unklare Diagnose‘ charakterisiert.

Abb. 2 zeigt die verschiedenen PNP Untergruppen und die Anzahl der jeweiligen Patienten.



**Abbildung 2:** A: Diagnostische Subgruppen mit jeweiliger Patientenanzahl; Abkürzungen: CIAP = chronische idiopathische axonale Neuropathie, CIDP gesamt = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie, NP = Neuropathie, PIAN = progressive idiopathische axonale Neuropathie, SFN = small fiber Neuropathie, Vaskulitis = vaskulitische Neuropathie [systemische Vaskulitis und nicht-systemische Vaskulitis des peripheren Nervensystems (NSVN)]; B: Unterteilung der CIDP-Patienten in Subgruppen; Abkürzungen: CIDP = CIDP, die INCAT-Kriterien erfüllen, klinische CIDP= CIDP, die INCAT-Kriterien nicht erfüllen.

In vorliegender Arbeit stellte die CIDP mit insgesamt 22 Patienten die größte ätiologische Subgruppe dar. Dahinter folgte mit 13 Patienten die Gruppe der Vaskulitiden. Hier litten 7/13 Patienten (53,8%) an einer NSVN und 6/13 (46,2%) an einer systemischen Form.

Die größte Subgruppe stellte mit 26 Patienten, die Gruppe der sogenannten „unklaren“ PNP dar. Hier konnte zum Untersuchungszeitpunkt keine Erkrankungsursache festgestellt werden. Diese Gruppe konnte jedoch anhand der elektrophysiologischen Messergebnisse in axonale, demyelinisierende und gemischte Neuropathien unterteilt werden (siehe Tabelle 6).

unklar	Patientenanzahl
axonal	13
demyelinisierend	5
gemischt	8
<b>Gesamt</b>	<b>26</b>

**Tabelle 6: Verteilung der Patienten mit PNP unklarer Genese anhand des elektrophysiologisch ermittelten Schädigungsmusters**

Anhand der diagnostischen Subgruppen erfolgte zudem eine Unterteilung zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen Neuropathien. Zu den entzündlichen Formen zählten:

- CIDP
- Vaskulitis
- MADSAM
- PIAN
- Anti-MAG-PNP
- Paraproteinämische PNP
- Sensible PNP bei Ganglionitis

Alle anderen Ätiologien wurden den nicht-entzündlichen Formen zugerechnet. Bei den unklaren Diagnosen erfolgte die Einteilung bezüglich entzündlich und nicht-entzündlich anhand von histologischen Kriterien sowie dem Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie. Insgesamt konnten so 56/97 (57,7%) Fälle entzündlichen und 41/97 (42,3%) Fälle nicht-entzündlichen PNP zugeordnet werden.

### **3.1.3. Klinische Daten der Patienten**

Der Großteil der Patienten litt sowohl unter sensiblen als auch motorischen Symptomen (73/97, 75,3%), die in der Mehrzahl der Fälle vor allem distal (92/97, 94,8%) auftreten. Mehr als die Hälfte der PNP-Patienten wies zudem eine schmerzhafteste PNP auf (63/97, 64,9%) und erhielt vor Einschluss in die Studie eine rein symptomatische analgetische Therapie (56/97, 57,7%). Tabelle 7 zeigt die klinischen Charakteristika und ihre Verteilung.

Klinische Charakteristika	Anzahl
<b>Symptome</b>	
- Rein motorisch	- 2/97 (2,1%)
- Rein sensibel	- 22/97 (22,7%)
- Sensomotorisch	- 73/97 (75,3%)
- Zusätzliche autonome Beteiligung	- 1/97 (1,0%)
<b>Verteilung der Symptome</b>	
- Symmetrisch	- 54/97 (55,7%)
- Asymmetrisch	- 43/97 (44,3%)
- Überwiegend distal	- 92/97 (94,8%)
- Überwiegend proximal	- 5/97 (5,1%)
<b>Schmerz</b>	
- Schmerzhaft	- 63/97 (64,9%)
- Schmerzlos	- 34/97 (35,1%)
<b>ODSS-Score</b>	
- Funktionsbeeinträchtigung der Arme (Score $\geq 1$ )	- 40/97 (41,2%)
- Funktionsbeeinträchtigung der Beine (Score $\geq 1$ )	- 81/97 (83,5%)
<b>mTCNS-Score</b>	
<u>vorhanden Symptome (Score <math>\geq 1</math>)</u>	
- Fußschmerzen	- 56/97 (57,7%)
- Taubheitsgefühl	- 83/97 (85,6%)
- Kribbelparästhesien	- 62/97 (63,9%)
- Muskelschwäche	- 53/97 (54,6%)
- Ataxie	- 78/97 (80,4%)
- Symptome an den Armen	- 54/97 (55,7%)
<u>Pathologischer Untersuchungsbefund (Score <math>\geq 1</math>)</u>	
- Eingeschränkte Spitz/Stumpf-Detektion	- 82/97 (84,5%)
- Eingeschränktes Temperaturempfinden	- 63/97 (64,9%)
- Reduzierte Oberflächensensibilität	- 84/97 (86,6%)
- Reduziertes Vibrationsempfinden	- 92/97 (94,8%)
- Reduzierter Lagesinn	- 49/97 (50,5%)
<b>Elektrophysiologisches Schädigungsmuster des Nerven</b>	
- Axonal	- 43/97 (44,3%)
- Demyelinisierend	- 37/97 (38,1%)
- Gemischt (axonal und demyelinisierend)	- 9/97 (9,3%)
- SFN	- 8/97 (8,2%)
<b>Therapie vor Studieneinschluss</b>	
- Rein symptomatisch	- 56/97 (57,7%)
- Rein immunmodulatorisch	- 1/97 (1,0%)
- Sowohl symptomatisch als auch immunmodulatorisch	- 5/97 (5,2%)
- Keine Therapie	- 35/97 (36,1%)

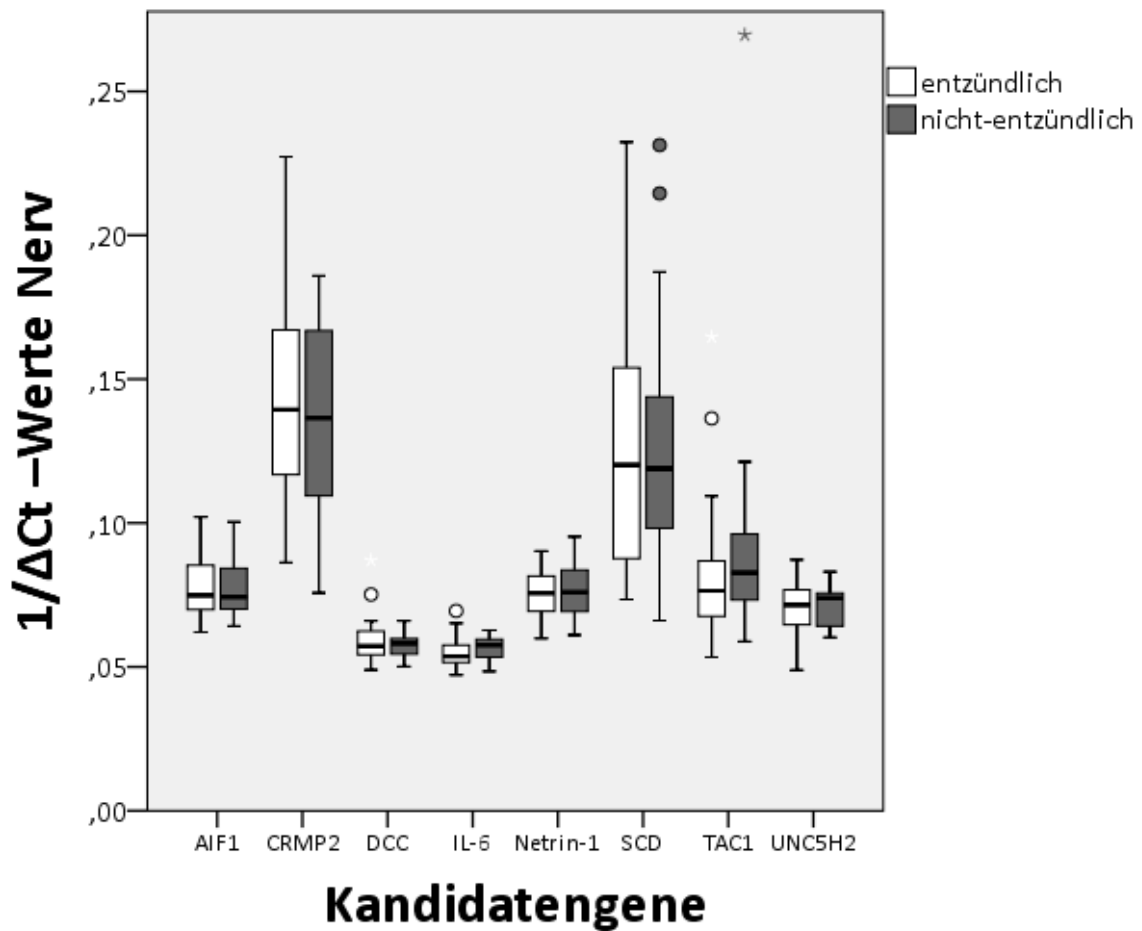
**Tabelle 7: Klinische und diagnostische Charakteristika des Patientenkollektivs sowie Therapie vor Studieneinschluss**

### **3.2. Kontrollkollektiv**

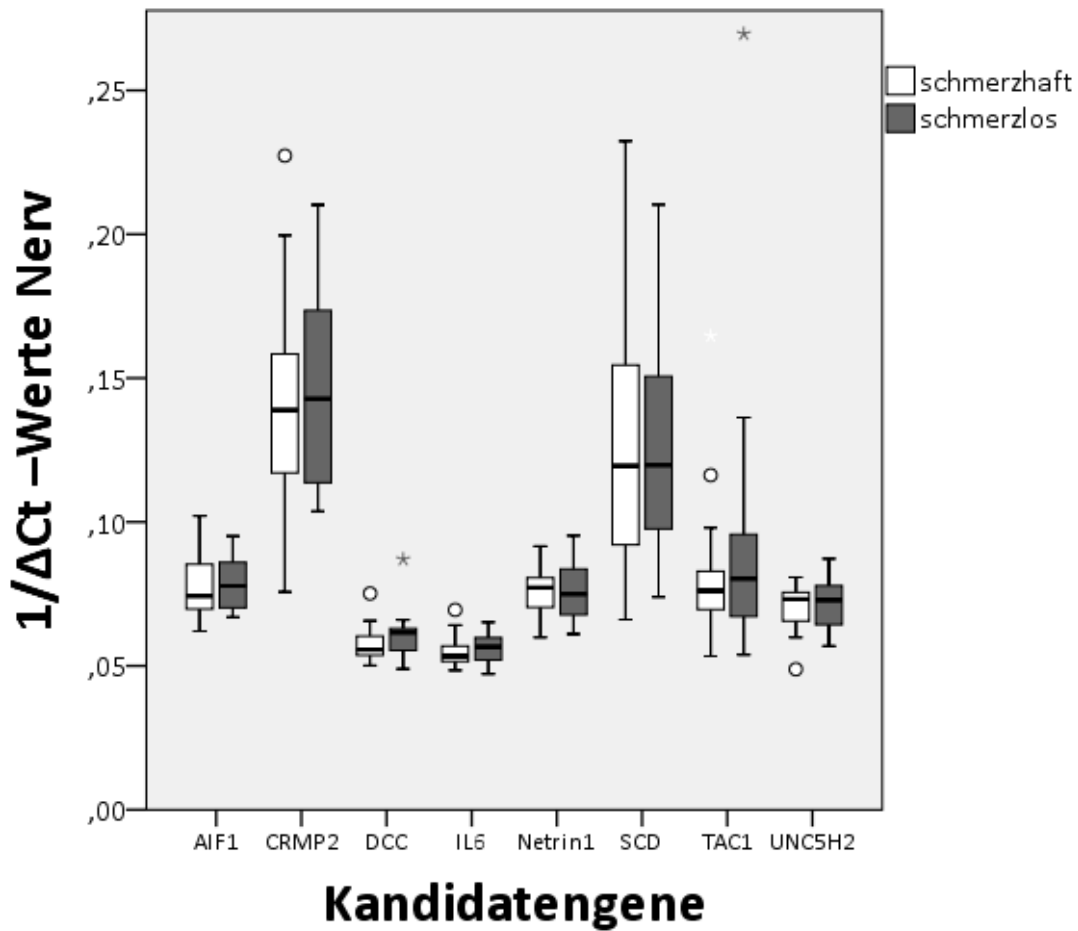
Von den ursprünglich rekrutierten 23 gesunden Personen konnten 17 in die Studie aufgenommen werden (11 Frauen, 6 Männer). Sechs Männer mussten ausgeschlossen werden, da die IENFD in ihrer Hautbiopsie unter den laborinternen Normwerten (Unterschenkel: Range 3-17 Fasern/mm; Oberschenkel: Range 7-22 Fasern/mm) für gesunde Personen lag. Der Altersmedian der Kontrollgruppe betrug 54 Jahre (Range 24-74 Jahre).

### **3.3. Genexpressionsanalyse in N. suralis-Biopsaten**

Es wurden 69/97 (71,1%) der Patienten zu diagnostischen Zwecken am N. suralis biopsiert. Wir untersuchten die Genexpression von TAC1, CRMP2, AIF1, IL-6, SCD, Netrin-1, sowie die Expression der zugehörigen Rezeptoren UNC5H2 und DCC. Weder zwischen den diagnostischen Subgruppen, noch zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP-Formen sowie zwischen schmerzhaften und nicht schmerzhaften PNP konnten Unterschiede der Genexpression dieser Marker im N. suralis Biopsat gefunden werden (siehe Abb. 3 und 4). Auch zwischen den verschiedenen Schädigungsmustern der Nerven (axonal, demyelinisierend, gemischtes axonales und demyelinisierendes Schädigungsmuster) fanden sich für die angegebenen Marker keine Unterschiede.



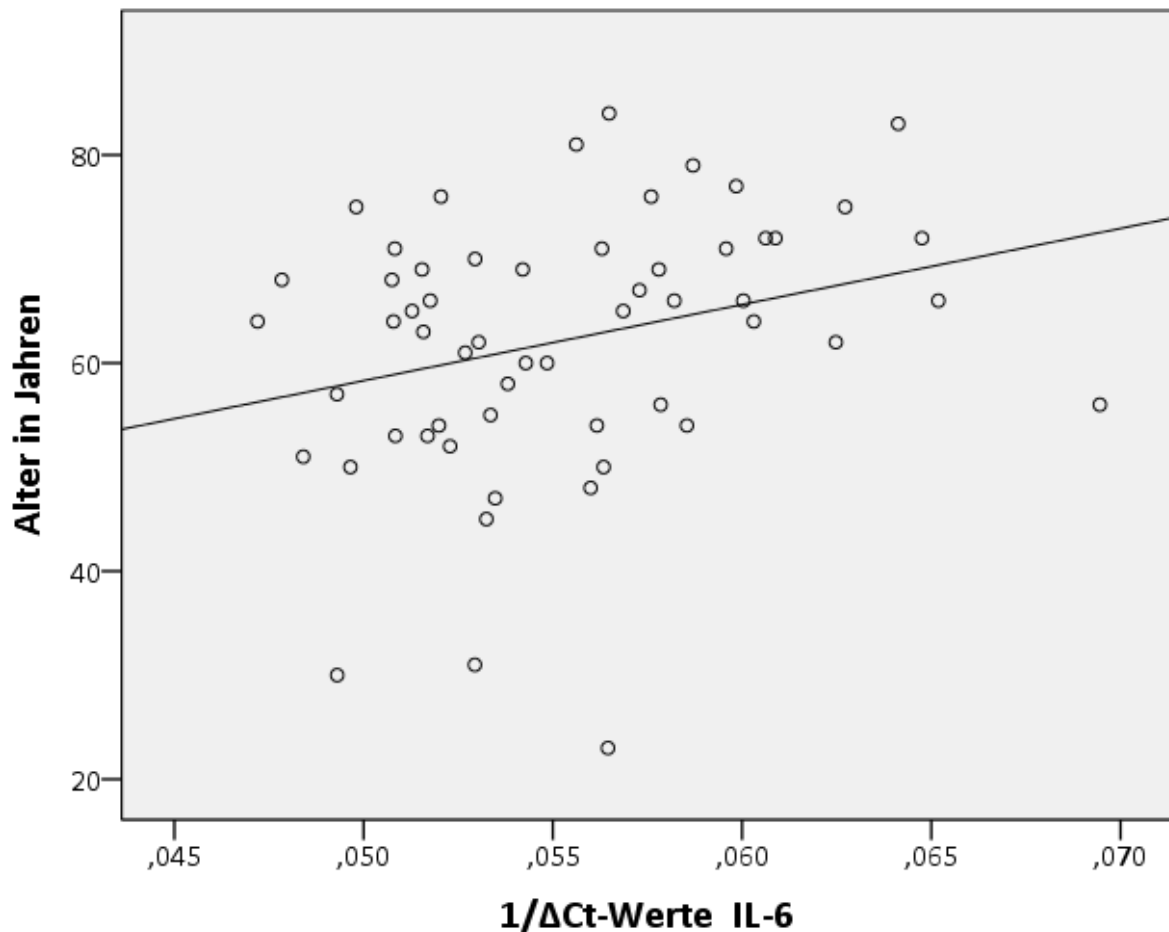
**Abbildung 3:** Vergleich der Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in *N. suralis* Biopsaten von Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher Polyneuropathie (PNP). Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Werte aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18sRNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1), Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2), Tachykinin precursor 1 (TAC1) und Interleukin-6 (IL-6) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-1, deleted in colorectal cancer (DCC), Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) und Uncoordinated5H2 (UNC5H2). Es fanden sich keine Unterschiede zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP. ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer.



**Abbildung 4:** Vergleich der Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarker in *N. suralis* Biopsaten von Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser Polyneuropathie (PNP); Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte (i.e. die reziproken Werte aus dem Verhältnisses des  $\Delta\text{Ct}$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18sRNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1), Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2), Tachykinin precursor 1 (TAC1) und Interleukin-6 (IL-6) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-1, deleted in colorectal cancer (DCC), Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) und Uncoordinated5H2 (UNC5H2). Es fanden sich keine Unterschiede zwischen schmerzlosen und schmerzhaften PNP, ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer.



Das Patientenalter korrelierte positiv mit der Genexpression von IL-6 ausgedrückt als  $1/\Delta Ct$  (Korrelationskoeffizient: + 0,327,  $p < 0,05$ ). Ein höheres Lebensalter ging mit einer vermehrten IL-6 Expression einher. Abb. 5 stellt die positive Korrelation zwischen Alter und  $1/\Delta Ct$ -Wert für IL-6 graphisch dar. Für keines der anderen Kandidatengene konnte eine Korrelation mit dem Lebensalter nachgewiesen werden.



**Abbildung 5:** Positive Korrelation zwischen dem Patientenalter in Jahren und dem  $1/\Delta Ct$ -Wert (i.e. die reziproken Werte aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18sRNA) für Interleukin-6 (IL-6) in N. suralis Biopsaten (lineare Anpassungslinie; Spearman Korrelationskoeffizient +0,327,  $p < 0,05$ ).

Es fanden sich keine Korrelationen zwischen den Genexpressionsdaten aus den Nervenproben der Patienten und den Fragebogendaten. Dabei wurden für ADS, GCPS und NPSI jeweils der Gesamtsummenwert und für den NPSI zusätzlich die Items „Brennen“, „Druck“ und „Dysästhesie“ mit den Genexpressionsprofilen des jeweiligen Patienten korreliert.

### **3.4. Genexpressionanalyse der proximalen und distalen Hautbiopsate**

Insgesamt konnten 69/97 (71,1%) proximale und 80/97 (82,5%) distale Hautbiopsate untersucht werden. In 58/97 Fällen (59,8%) lagen beide Hautproben eines Patienten vor. Bei allen 17 Kontrollpersonen waren sowohl proximale als auch distale Biopsate vorhanden. In den Hautproben wurde die Genexpression von AIF1, IL-6, Netrin-1, UNC5H2, DCC, NEO1, sowie Netrin-G1 und -G2 untersucht. Weder in der  $1/\Delta\text{Ct}$ -Auswertung noch in der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Auswertung oder der intraindividuellen  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Auswertung konnten für einen der untersuchten Gene Unterschiede zwischen den einzelnen diagnostischen Subgruppen gefunden werden.

#### **3.4.1. Auswertung der $\Delta\text{Ct}$ -Werte der proximalen und distalen Hautbiopsate**

Die reziproken Werte aus dem Verhältnis des  $\Delta\text{Ct}$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA werden als  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte bezeichnet. Hohe  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression. Beim Vergleich der proximalen Hautproben aller Patienten mit denen der Kontrollgruppe zeigten sich sowohl für DCC ( $p < 0,05$ ) als auch für Netrin-G1 ( $p < 0,05$ ) und -G2 ( $p < 0,001$ ) erniedrigte  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und somit eine erniedrigte Genexpression in der Patientengruppe (siehe Abb. 6). In distalen Hautproben wies AIF1 bei Patienten eine höhere Genexpression auf als bei gesunden Kontrollpersonen ( $p < 0,01$ ). Die Kandidatengene Netrin-1 ( $p < 0,05$ ), DCC ( $p < 0,001$ ), NEO1 ( $p < 0,05$ ) sowie Netrin-G1 ( $p < 0,01$ ) und -G2 ( $p < 0,001$ ) zeigten in distalen Hautbiopsaten von Patienten hingegen erniedrigte  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte verglichen mit der Kontrollgruppe (siehe Abb. 7).

In proximalen Hautbiopsien konnten keine Unterschiede zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP gefunden werden. Jedoch zeigte sich für Netrin-G2 bei Patienten mit entzündlichen ( $p < 0,001$ ) und nicht-entzündlichen PNP ( $p < 0,001$ ) eine niedrigere Genexpression als bei gesunden Kontrollpersonen. Für DCC fand sich nur bei Patienten mit nicht-entzündlichen PNP eine niedrigere Genexpression als bei gesunden Kontrollpersonen ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 8).

In distalen Hautproben zeigte sich für Netrin-G1 und -G2 sowie für DCC und NEO1 bei entzündlichen PNP eine niedrigere Genexpression als bei gesunden Kontrollpersonen (Netrin-G1:  $p < 0,05$ ; Netrin-G2:  $p < 0,001$ ; DCC:  $p < 0,001$ , NEO1:  $p < 0,05$ ). Für Netrin-G2 und DCC fanden sich in den distalen Hautproben zudem niedrigere Werte für Patienten mit nicht-entzündlicher PNP verglichen mit gesunden Kontrollpersonen (Netrin-G2:  $p < 0,001$ ; DCC:  $p < 0,01$ ). Die Genexpression von AIF1 war bei Patienten mit entzündlichen PNP ( $p <$

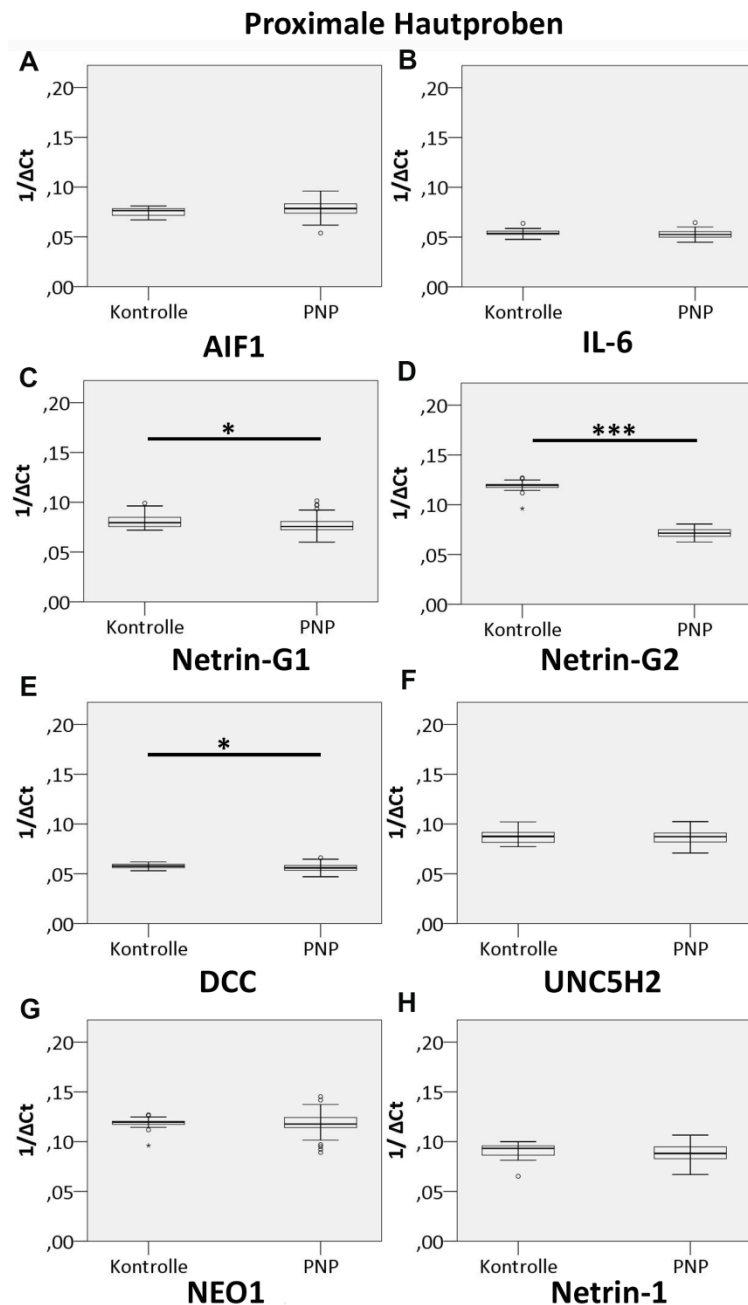
0,01) und nicht-entzündlichen PNP ( $p < 0,01$ ) höher als bei gesunden Kontrollpersonen. Für Netrin-1 fand sich für Patienten mit entzündlicher PNP eine niedrigere Genexpression als für gesunde Kontrollpersonen ( $p < 0,05$ ). Darüber hinaus hatten Patienten mit einer nicht-entzündlichen PNP eine höhere Genexpression als Patienten mit einer entzündlichen Erkrankungsform ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 9).

In den proximalen Hautproben fand sich für Netrin-G2 und DCC bei Patienten mit schmerzhafter PNP eine niedrigere Genexpression als bei gesunden Kontrollpersonen (Netrin-G2:  $p < 0,001$ ; DCC:  $p < 0,05$ ). Zudem war die Netrin-G2-Genexpression in proximalen Hautproben für Patienten mit schmerzloser PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen ( $p < 0,001$ ) (siehe Abb. 10).

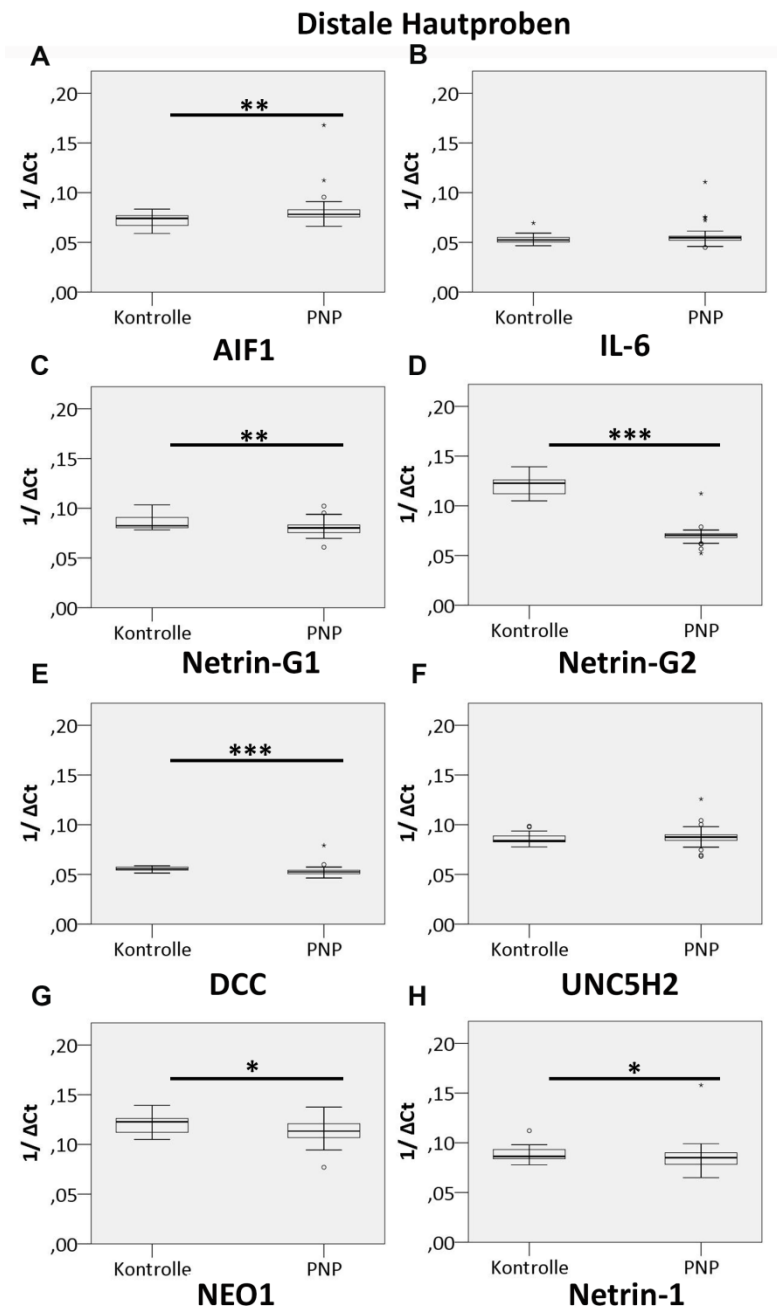
In den distalen Hautproben fanden sich sowohl für Netrin-G1 und -G2 als auch für DCC und NEO1 für Patienten mit schmerzhafter PNP niedrigere Werte als für gesunde Kontrollpersonen (Netrin-G1:  $p < 0,05$ ; Netrin-G2:  $p < 0,001$ ; DCC:  $p < 0,01$ ; NEO1:  $p < 0,01$ ). Außerdem war in den distalen Hautproben die Genexpression für Netrin-G2 und DCC für Patienten mit schmerzlosen PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (Netrin-G2:  $p < 0,001$ ; DCC:  $p < 0,01$ ). Die AIF1-Genexpression war in distalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter ( $p < 0,05$ ) und schmerzloser PNP ( $p < 0,01$ ) höher als für gesunde Kontrollpersonen (siehe Abb. 11).

Zusammenfassend fanden sich vor allem Auffälligkeiten für Mitglieder der Netrin-Familie, welche in das Wachstum von Axonen und Dendriten involviert sind. Vor allem die beiden das Axonwachstum fördernden Mitglieder Netrin-G1 und -G2, zeigten sowohl in proximalen als auch in distalen Hautproben niedrigere  $1/\Delta Ct$ -Werte im Gesamtkollektiv aller PNP-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollpersonen. Ebenso war auch DCC, ein weiteres bifunktionales Mitglied der Netrin-Familie, in den Hautproben der Patienten deutlich geringer exprimiert als bei Gesunden. Die Genexpression des Inflammationsmarkers AIF1 war in proximalen Hautproben für Patienten höher als für gesunde Kontrollpersonen. Netrin-1, ein bifunktionaler Modulator des Axonwachstums, zeigte in distalen Hautproben als einziger untersuchter Marker höhere  $1/\Delta Ct$ -Werte für nicht-entzündliche PNP verglichen mit entzündlichen Erkrankungsformen. Zwischen schmerzhaften und schmerzlosen Erkrankungsformen konnte kein Unterschied ermittelt werden.

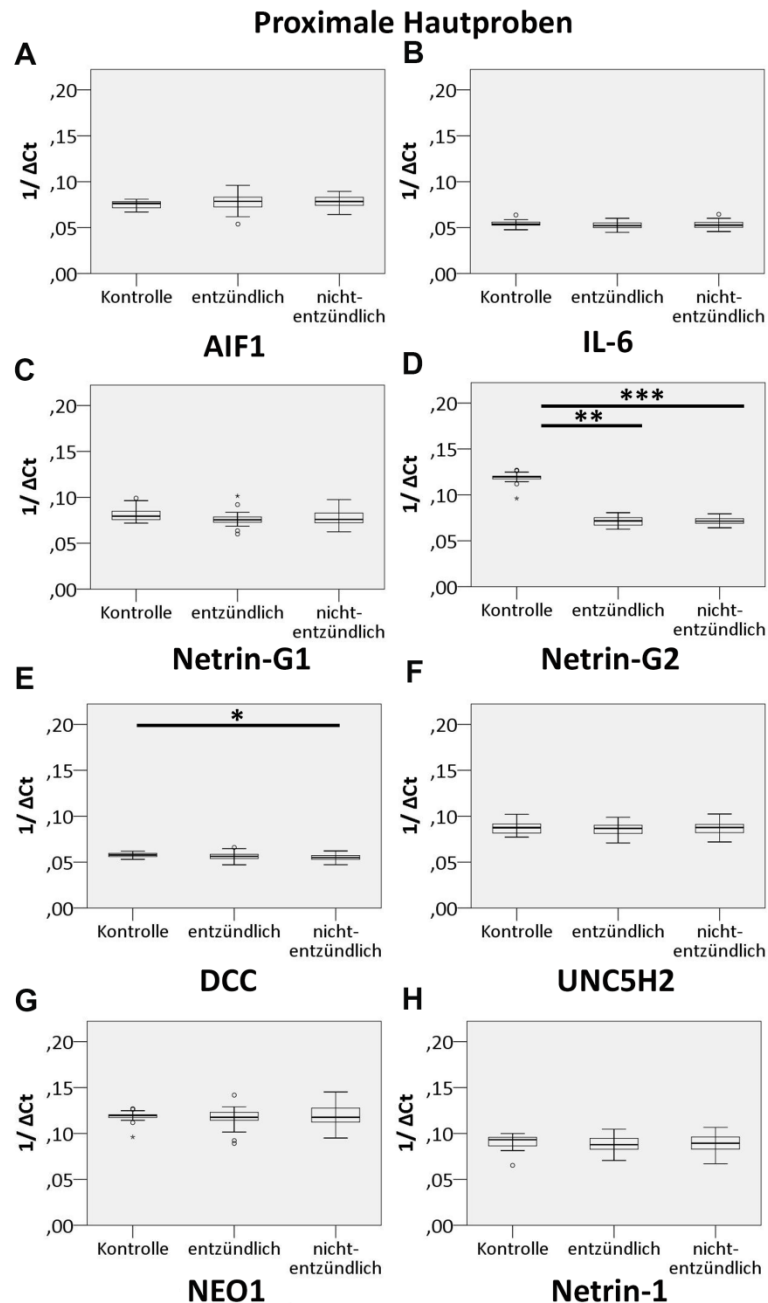




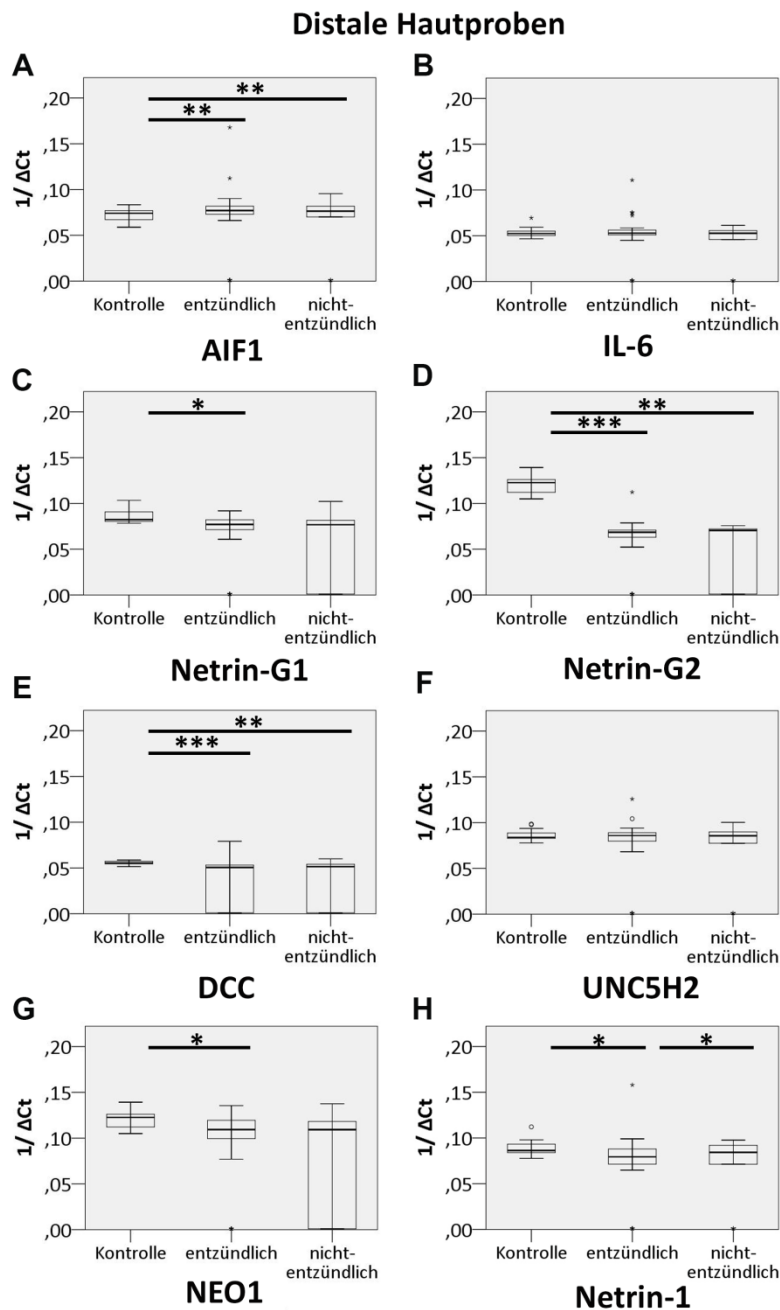
**Abbildung 6:** Vergleich der Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in proximalen Hautproben von PNP-Patienten und gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Werte aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Der reziproke Wert erlaubt die Darstellung niedriger  $\Delta Ct$  – Werte (i.e. höhere Genexpression) als höhere Boxplots. Die Genexpression von Netrin-G1, Netrin-G2 und DCC war in proximalen Hautproben für Patienten mit PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c ,d, e). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer , \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Abbildung 7:** Vergleich der Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in distalen Hautproben von PNP-Patienten und gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Werte aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Der reziproke Wert erlaubt die Darstellung niedriger  $\Delta Ct$  – Werte (i.e. höhere Genexpression) als höhere Boxplots. Die Genexpression von Netrin-G1, Netrin-G2, DCC, NEO1 sowie Netrin-1 war in distalen Hautproben für Patienten mit PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c, d, e, g, h). Die Genexpression von AIF1 war in distaler Haut für Patienten mit PNP höher als für gesunde Kontrollpersonen (a). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



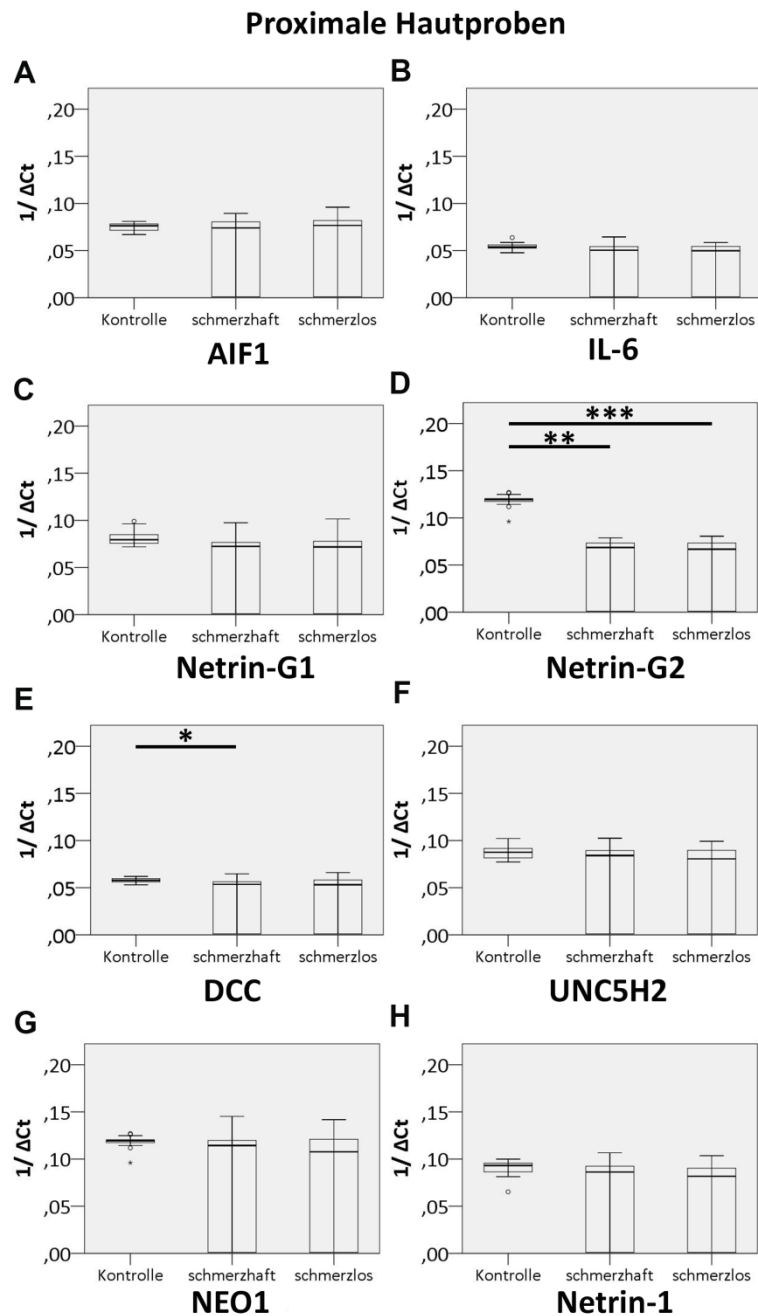
**Abbildung 8:** Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in proximalen Hautproben entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP sowie gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Wert aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Der reziproke Wert erlaubt die Darstellung niedriger  $\Delta Ct$ -Werte (i.e. höhere Genexpression) als höhere Boxplots. Die Genexpression von Netrin-G2 sowie von DCC war für Patienten mit nicht-entzündlichen PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d, e). Zudem war die Genexpression von Netrin-G2 für Patienten mit entzündlicher PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



**Abbildung 9:** Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in distalen Hautproben entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP sowie gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Wert aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Der reziproke Wert erlaubt die Darstellung niedriger  $\Delta Ct$ -Werte (i.e. höhere Genexpression) als höhere Boxplots.

Die Genexpression von Netrin-G1 und G2, DCC, NEO1 Und Netrin-1 war für Patienten mit entzündlicher PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c, d, e, g, h). Zudem war die Genexpression von Netrin-G2 und DCC für Patienten mit nicht-entzündlicher PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d, e). Die Genexpression von Netrin-1 war für entzündliche Erkrankungsformen niedriger als für nicht-entzündliche PNP (h). Die Genexpression von AIF1 war für Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP höher als für gesunde Kontrollpersonen (a). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

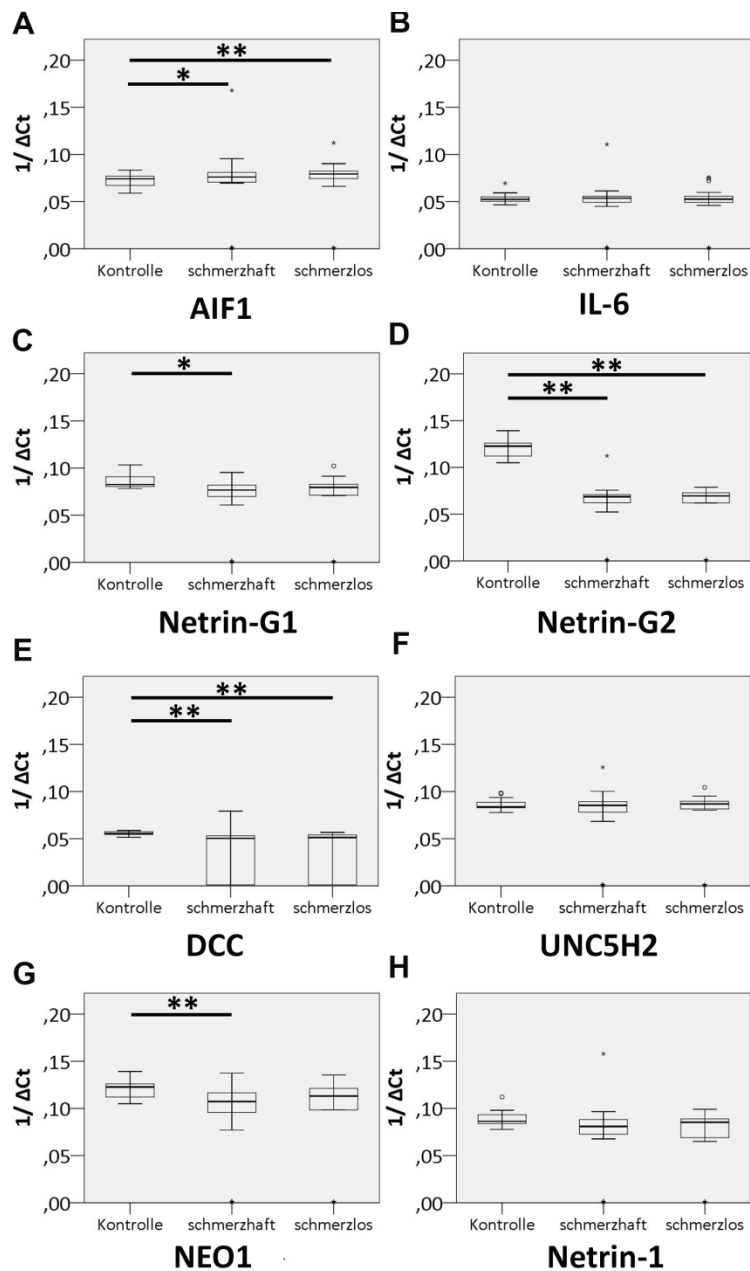




**Abbildung 10:** Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in proximalen Hautproben schmerzhafter und schmerzloser PNP sowie gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Wert aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Der reziproke Wert erlaubt die Darstellung niedriger  $\Delta Ct$  – Werte (i.e. höhere Genexpression) als höhere Boxplots.

Die Genexpression von Netrin-G2 und DCC ist in proximalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d, e). Zudem ist die Genexpression von Netrin-G2 für Patienten mit schmerzloser PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## Distale Hautproben



**Abbildung 11:** Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in distalen Hautproben schmerzhafter und schmerzloser PNP sowie gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $1/\Delta Ct$ -Werte (i.e. die reziproken Wert aus dem Verhältnis des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Der reziproke Wert erlaubt die Darstellung niedriger  $\Delta Ct$  – Werte (i.e. höhere Genexpression) als höhere Boxplots.

Die Genexpression von Netrin-G1 und –G2 sowie von DCC und NEO1 war in distalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c, d, e, g). Zudem war die Genexpression von Netrin-G2 und DCC für Patienten mit schmerzloser PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d, e). Die AIF1-Genexpression war in distalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP höher als für gesunde Kontrollpersonen (i). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3.4.2. Auswertung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der proximalen und distalen Hautbiopsate

Der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta\text{Ct}$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen wird als  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert bezeichnet. Diese zusätzliche Auswertungsoption ermöglicht die Darstellung der anhand der gesunden Kontrollgruppe normierten Genexpression in Patientenproben. Hohe  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression. In proximalen Hautproben fielen in der Patientengruppe für AIF1 erhöhte ( $p < 0,001$ ) und für Netrin-G1 erniedrigte ( $p < 0,05$ )  $\Delta\Delta\text{Ct}$  -Werte verglichen mit der Kontrollgruppe auf (siehe Abb. 12). Bei den distalen Hautproben fielen Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv für Mitglieder der Netrin-Familie auf: sowohl für DCC ( $p < 0,001$ ) und NEO1 ( $p < 0,05$ ), als auch für Netrin-G1 ( $p < 0,01$ ) und -G2 ( $p < 0,001$ ) ließen sich niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in der Patientengruppe ermitteln (siehe Abb. 13).

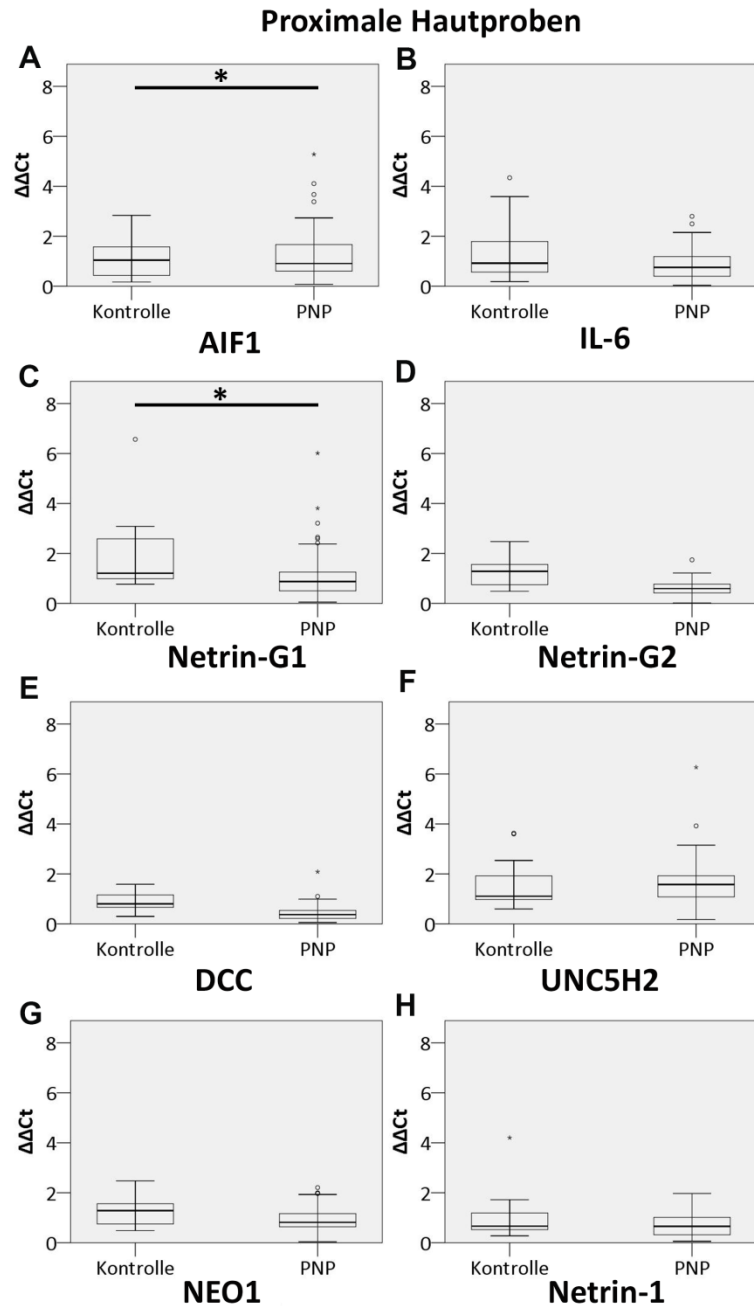
In proximalen Hautbiopsien zeigten sich für AIF1 erhöhte  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für entzündliche ( $p < 0,001$ ) und nicht-entzündliche PNP ( $p < 0,01$ ) verglichen mit gesunden Kontrollpersonen. Für Netrin-G1 ergaben sich erniedrigte Werte für entzündliche PNP verglichen mit der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen ( $p < 0,05$ ). Zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP ließen sich in den proximalen Hautproben jedoch für keines der untersuchten Zielgene Unterschiede nachweisen (siehe Abb. 14).

Vergleich man die distalen Hautproben der Patienten mit denen der gesunden Kontrollpersonen, so zeigten sich für Netrin-G1 und -G2 sowie für DCC niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in der Gruppe der entzündlichen (Netrin-G1:  $p < 0,01$ ; Netrin-G2:  $p < 0,001$ ; DCC:  $p < 0,001$ ) und nicht-entzündlichen PNP (Netrin-G1:  $p < 0,05$ ; Netrin-G2:  $p < 0,01$ ; DCC:  $p < 0,01$ ) verglichen mit dem gesunden Kontrollkollektiv. Für Netrin-1 fanden sich in den distalen Hautproben für nicht-entzündliche PNP höhere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte als für Patienten mit entzündlicher PNP ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 15).

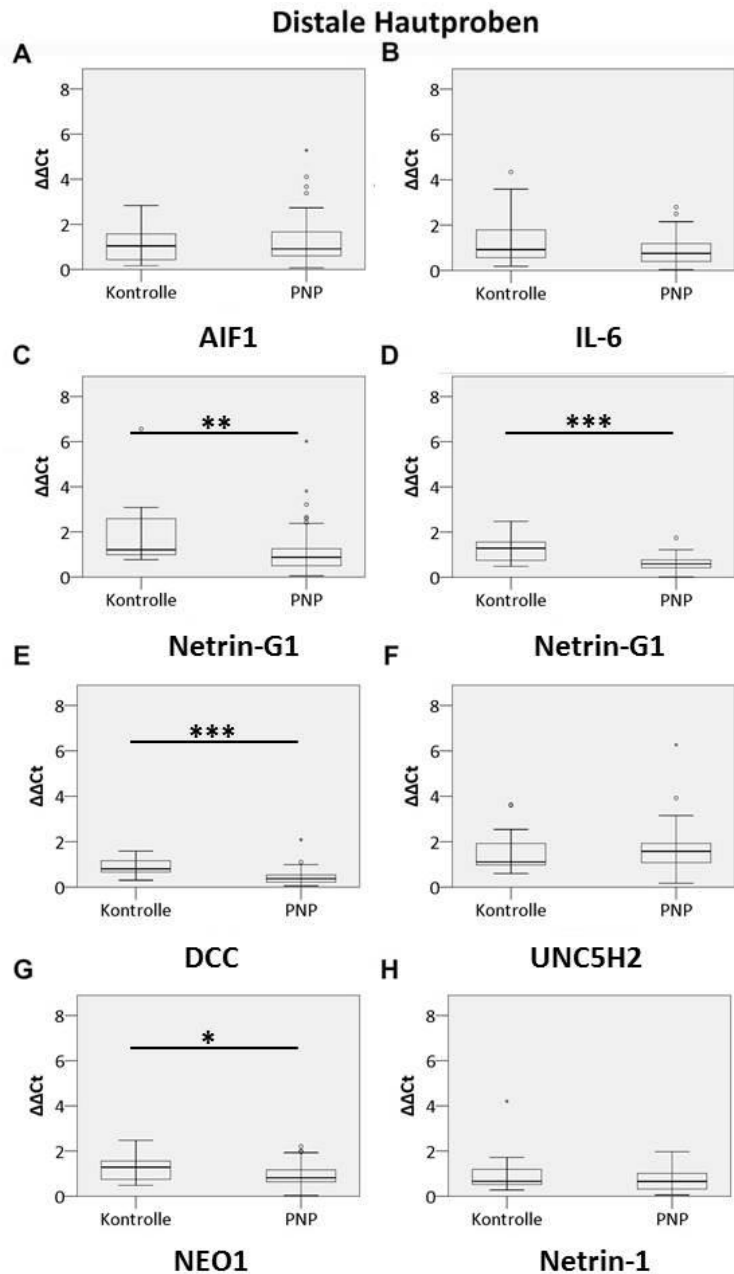
Beim Vergleich schmerzhafter und schmerzloser PNP mit gesunden Kontrollpersonen zeigten sich in proximalen Hautproben für AIF1 höhere Werte für schmerzhafte ( $p < 0,05$ ) und schmerzlose ( $p < 0,05$ ) PNP gegenüber Kontrollpersonen. Netrin-G1 wies hingegen für schmerzhafte PNP niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte gegenüber Kontrollpersonen auf ( $p < 0,05$ ). Zwischen schmerzhaften und schmerzlosen Erkrankungsformen fanden sich für beide Kandidatengene keine Unterschiede (siehe Abb. 16). In distalen Hautproben zeigten sich für DCC und Netrin-G2 sowohl für schmerzhafte (beide  $p < 0,001$ ), als auch für schmerzlose PNP

(DCC:  $p < 0,01$ ; Netrin-G2:  $p < 0,05$ ) niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte als im Kontrollkollektiv. Für Netrin-G1 und NEO1 zeigten sich für schmerzhaften Neuropathien niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (NEO1:  $p < 0,05$ ; Netrin-G1:  $p < 0,01$ ). Darüber hinaus zeigte sich für NEO1 in den distalen Hautproben ein Unterschied zwischen schmerzhaften und schmerzlosen PNP ( $p < 0,05$ ), da die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für schmerzlose PNP höher waren als für schmerzhafte Erkrankungsformen (siehe Abb. 17).

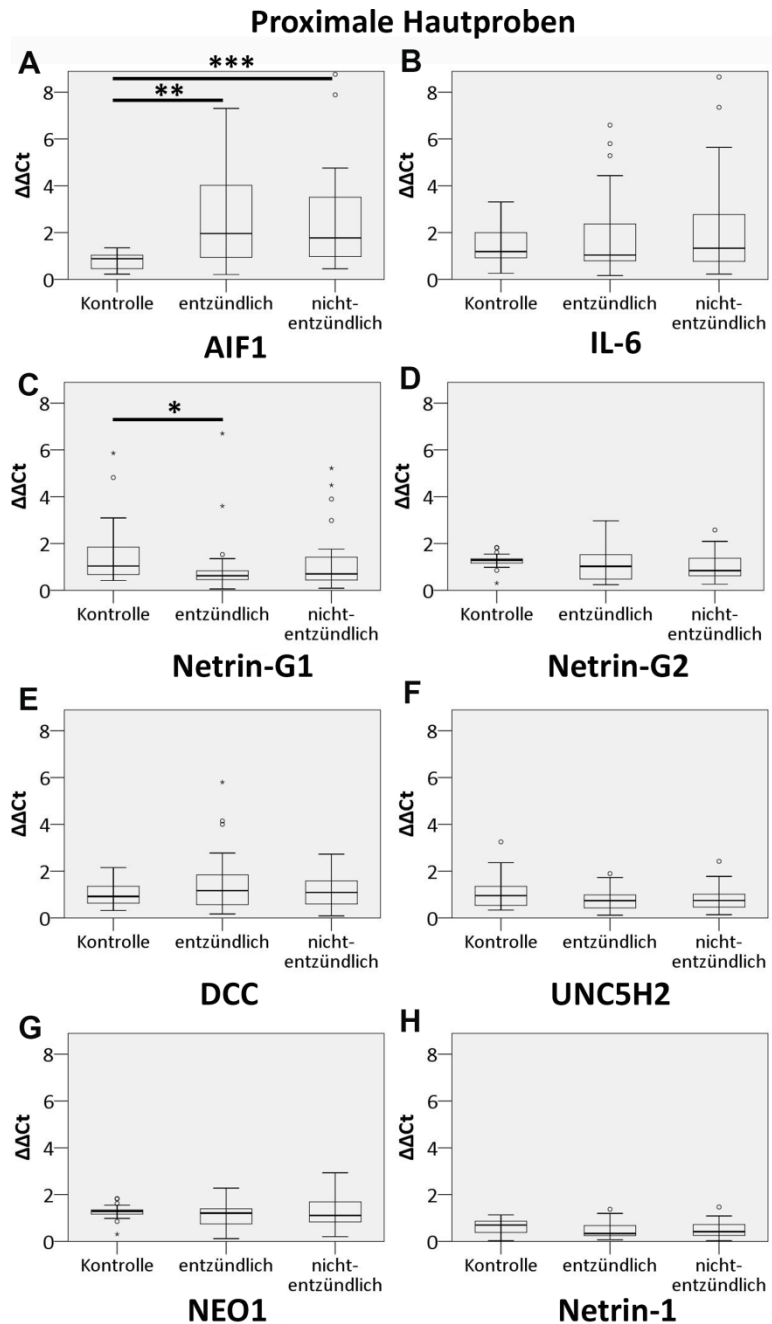
Insgesamt wiesen überwiegend Marker der Regeneration peripherer Nerven aus der Netrin-Familie signifikante Unterschiede der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte auf. So fanden sich für das Axonwachstum fördernde Netrin-G1 sowohl in proximalen, als auch in distalen Hautproben deutlich niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für das Patientenkollektiv verglichen mit gesunden Kontrollpersonen. Weitere Mitglieder der Netrin-Familie (DCC, Netrin-G2 und NEO1) zeigten diesen Unterschied lediglich in distalen Hautproben. Der inflammatorische Marker AIF1 war in proximalen Hautproben bei erkrankten Personen stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe. In distalen Hautproben ließen sich für Netrin-1, einem bifunktionalen Modulator aus der Netrin-Familie, niedrigere  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für entzündliche PNP als für nicht-entzündliche Erkrankungsformen ermitteln. NEO1 zeigte in distalen Hautproben einen Unterschied zwischen schmerzhaften und schmerzlosen Erkrankungsformen.



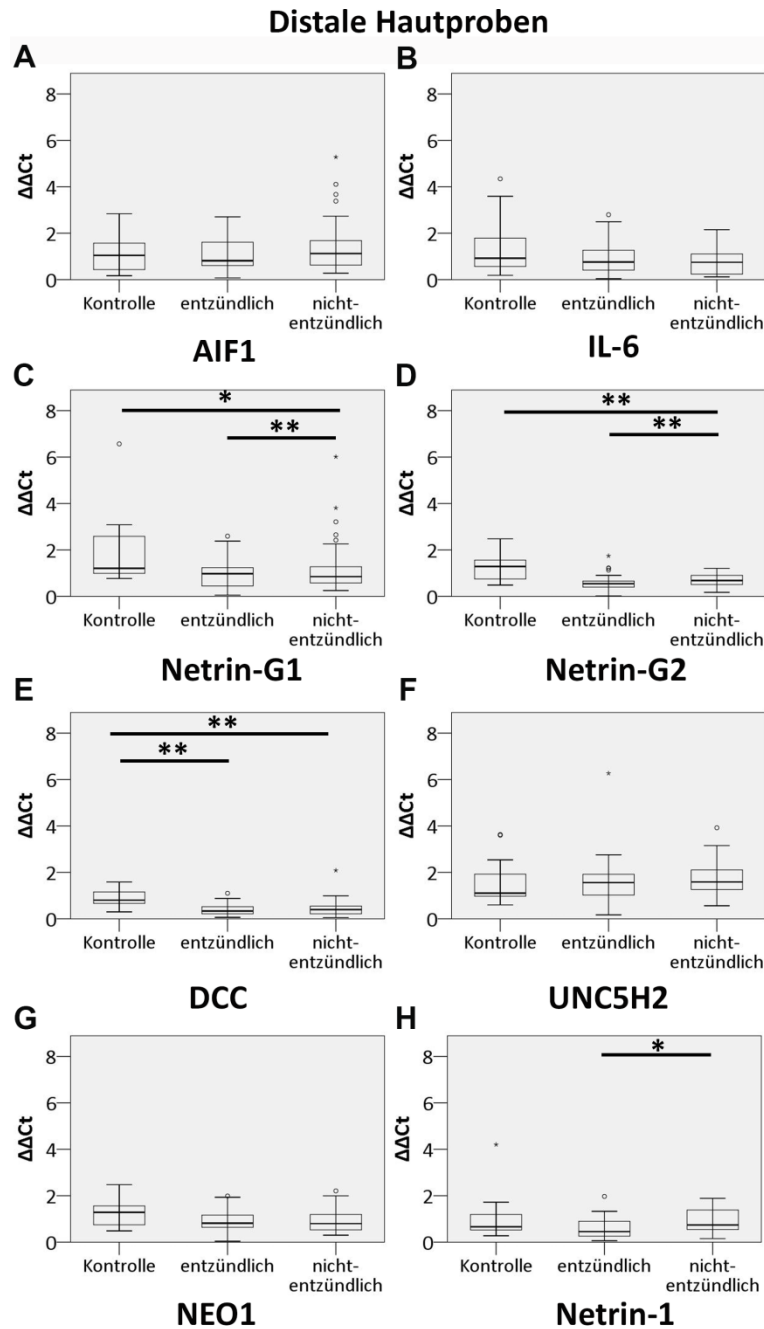
**Abbildung 12:** Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in proximalen Hautproben von PNP-Patienten und gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte (i.e. der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta Ct$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe  $\Delta\Delta Ct$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression in den Boxplots. Die Genexpression von Netrin-G1 ist in distalen Hautproben für gesunde Kontrollpersonen größer als für Patienten mit PNP (c). Die AIF1-Genexpression ist in proximalen Hautproben für gesunde Kontrollpersonen niedriger als für Patienten mit PNP (a). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* = p<0,05.



**Abbildung 13:** Genexpression von Inflammations- und Regenerationsmarkern in distalen Hautproben von PNP-Patienten und gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (i.e. der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta\text{Ct}$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression in den Boxplots. Die Genexpression von Netrin-G1 und -G2 sowie DCC und NEO1 war in distalen Hautproben für Patienten mit PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c, d, e, g). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



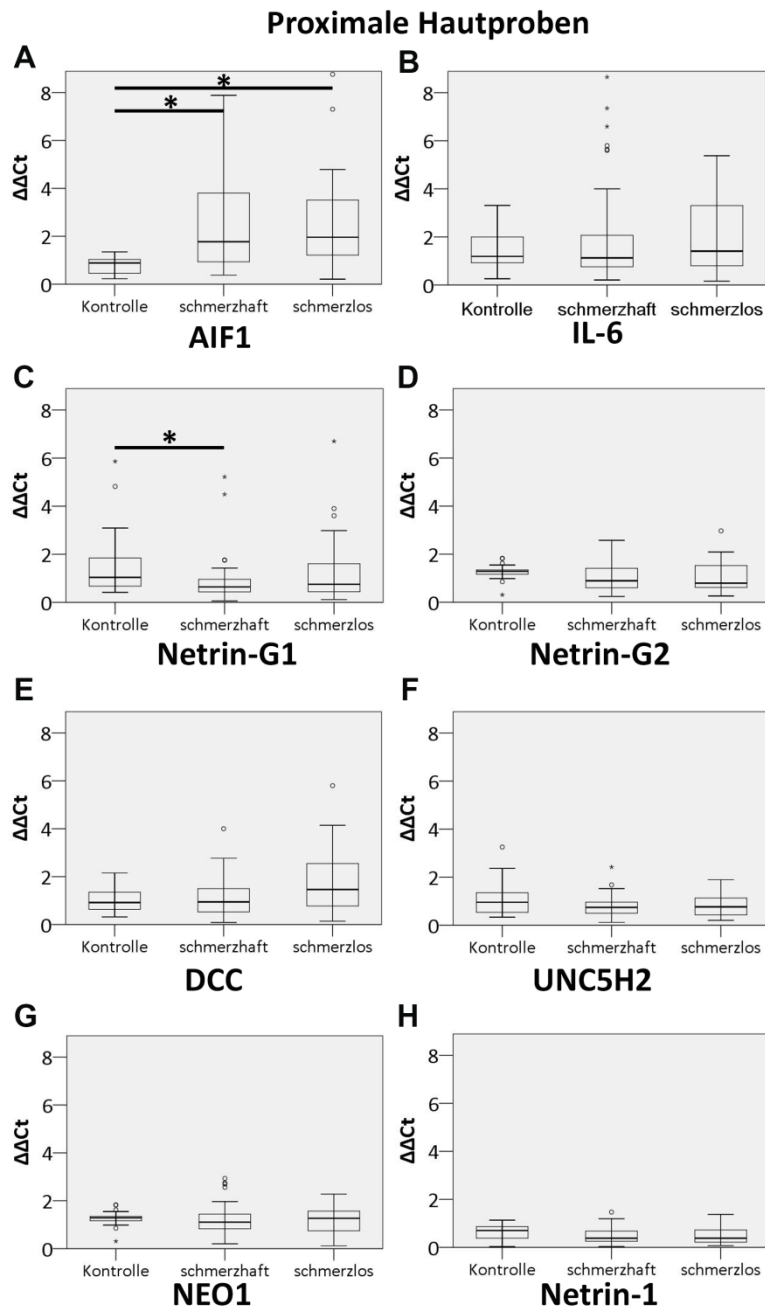
**Abbildung 14:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in proximalen Hautproben für entzündliche und nicht-entzündliche PNP sowie gesunde Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (i.e. der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta\text{Ct}$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression in den Boxplots. Die AIF1-Genexpression in proximaler Haut war für entzündliche und nicht-entzündliche PNP höher als für gesunde Kontrollpersonen (a). Die Genexpression von Netrin-G1 war in proximalen Hautproben für Patienten mit entzündlicher PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ .



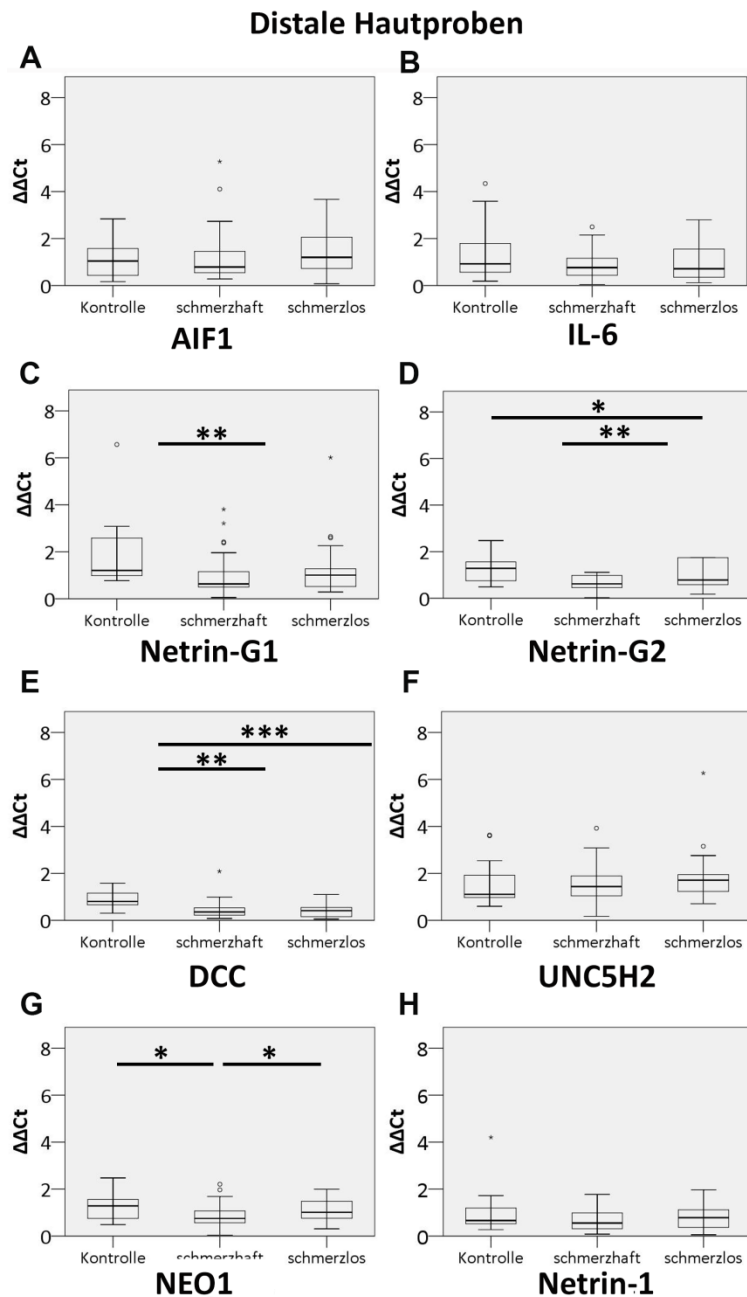
**Abbildung 15:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in distalen Hautproben für entzündliche und nicht-entzündliche PNP sowie gesunde Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte (i.e. der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta Ct$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe  $\Delta\Delta Ct$  -Werte bedeuten eine hohe Genexpression in den Boxplots.

In distalen Hautproben war die Genexpression von Netrin-G1 und -G2 sowie von DCC für Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c, d, e). Die Netrin-1-Genexpression war in distalen Hautproben für entzündliche PNP niedriger als für nicht-entzündliche PNP (h). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .





**Abbildung 16:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in proximalen Hautproben schmerzhafter und schmerzloser PNP sowie gesunder Kontrollproben. Die Boxplots zeigen die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte (i.e. der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta\text{Ct}$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression in den Boxplots. Die AIF1-Genexpression war in proximalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (a). Die Genexpression von Netrin-G1 war in proximalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \*\* =  $p < 0,05$ .

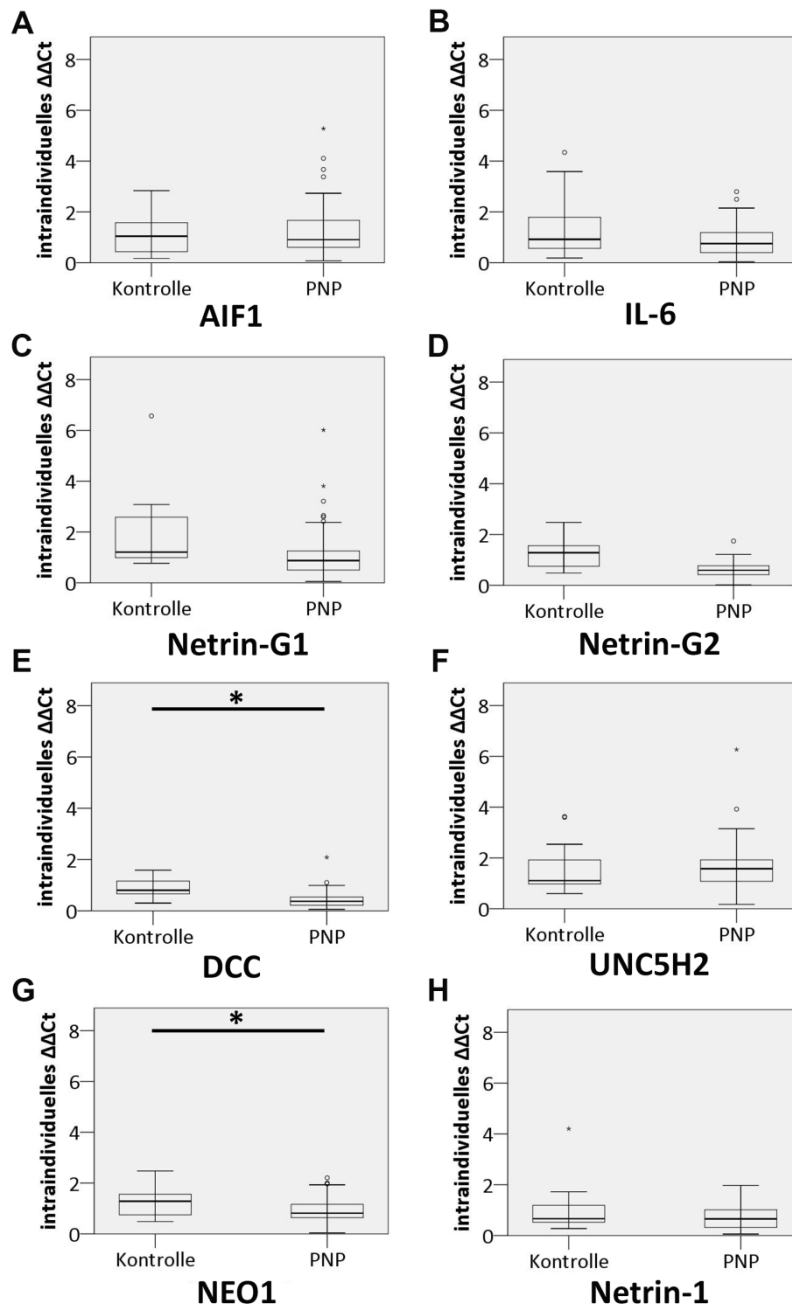


**Abbildung 17:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in distalen Hautproben schmerzhafter und schmerzloser PNP sowie gesunder Kontrollproben. Die Boxplots zeigen die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte (i.e. der interindividuelle Vergleich zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta Ct$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA mit gesunden Kontrollpersonen) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe  $\Delta\Delta Ct$ -Werte bedeuten eine hohe Genexpression in den Boxplots. Die Genexpression von Netrin-G1 und DCC war in distalen Hautproben für Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (d, e). Die Genexpression von Netrin-G1 war für Patienten mit schmerzhafter PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (c). Die NEO1-Genexpression in distalen Hautproben war für Patienten mit schmerzhafter PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen und für schmerzlose PNP höher als für schmerzhaft Erkrankungsformen (g). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* = < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001.

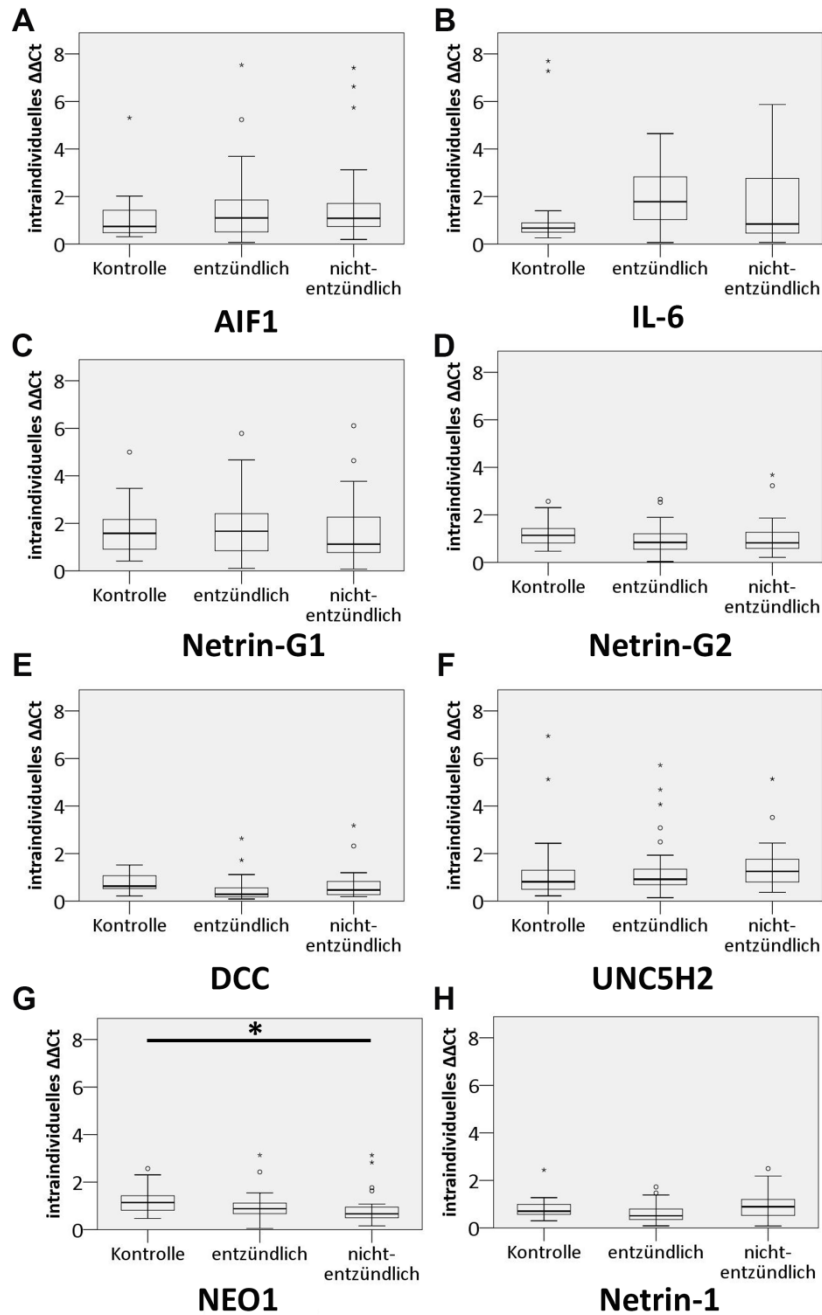
### **3.4.3. Auswertung der intraindividuellen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Hautbiopsate: Vergleich proximaler und distaler Proben**

Da für 58 Patienten und alle 17 Kontrollpersonen sowohl proximale, als auch distale Hautbiopsien vorhanden waren, konnte für diese Proben zudem eine intraindividuelle Genexpressionsanalyse durchgeführt werden. Unter der Annahme, dass die proximale Hautbiopsie des Oberschenkels aus einem nicht-erkrankten und die distale Unterschenkelprobe aus einem erkrankten Areal stammen, fungierte jeder Patient als seine eigene intraindividuelle Kontrollperson. Hohe intraindividuelle  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte bedeuten einen hohen Wert des Quotienten aus distaler und proximaler Probe. Somit entspricht ein hoher  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert eine vermehrte Genexpression im erkrankten Areal. In der Kontrollgruppe besteht kein Unterschied zwischen proximaler und distaler Hautprobe, sodass sich hier aus dem Quotienten der beiden Hautproben der Wert = 1 ergibt. Vergleich man die intraindividuelle  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aller Patienten mit der Kontrollgruppe, so zeigten sich sowohl für DCC ( $p < 0,05$ ), als auch für NEO1 ( $p < 0,05$ ) niedrigere Werte in der Patientengruppe (siehe Abb. 18). Für NEO1 ließen sich zudem bei Patienten mit nicht-entzündlicher PNP niedrigere intraindividuelle  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte gegenüber der Kontrollgruppe ermitteln ( $p < 0,05$ ). Zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP fand sich hingegen kein Unterschied (siehe Abb. 19). Vergleich man schmerzhafte, sowie schmerzlose PNP mit dem gesunden Kontrollkollektiv, so zeigten sich für schmerzhafte PNP niedrigere intraindividuelle  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für NEO1 als für gesunde Kontrollpersonen ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 20).

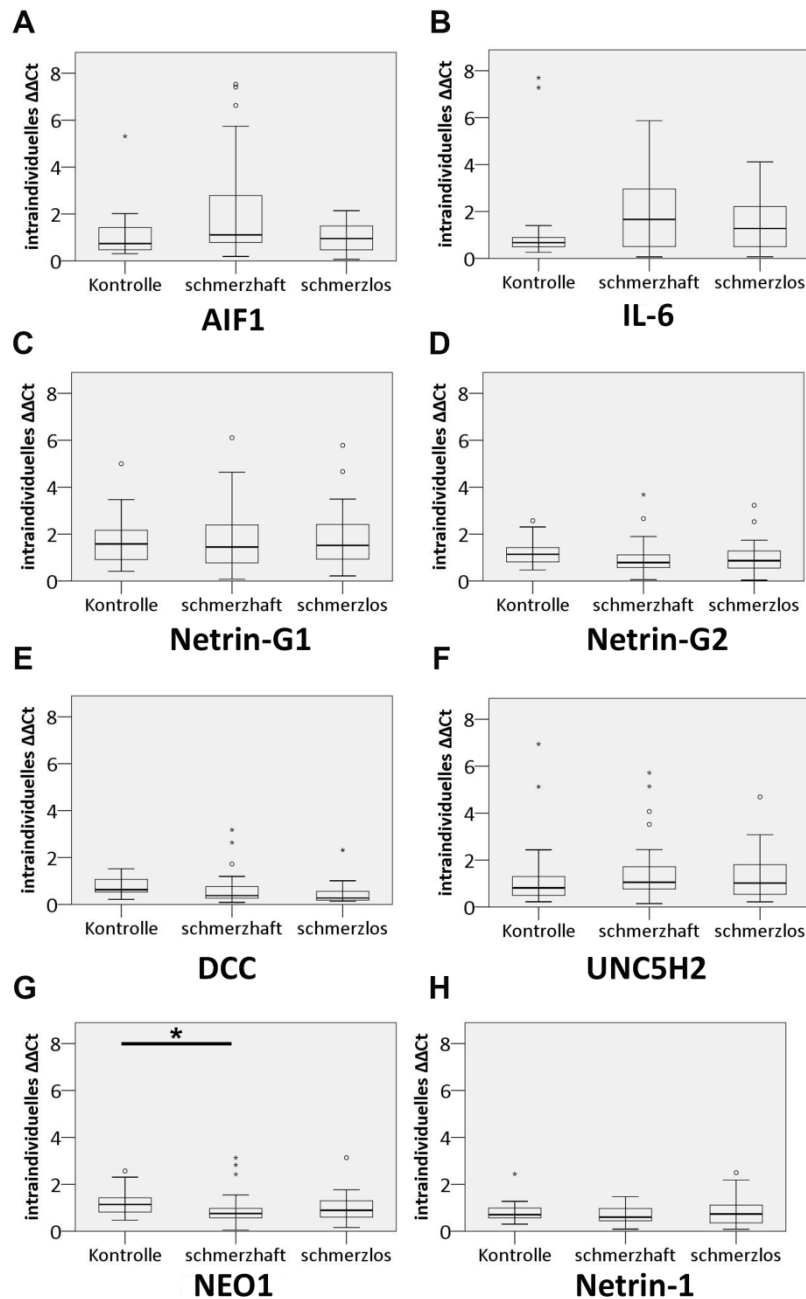
Insgesamt fanden sich auch hier wesentliche Unterschiede für Mitglieder der Netrin-Familie, die in die axonale Wegfindung involviert sind. Für die beiden bifunktionalen Rezeptoren NEO1 und DCC zeigten sich niedrigere intraindividuelle  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte im Patientenkollektiv verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Ein Unterschied der intraindividuelle  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen bzw. schmerzhaften und schmerzlosen Erkrankungsformen ließ sich nicht ermitteln.



**Abbildung 18:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in Hautproben von PNP-Patienten und gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die intraindividuellen  $\Delta\Delta Ct$ -Werte (i.e. der intraindividuelle Quotient zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta Ct$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA aus proximalen und distalen Hautproben eines Patienten oder einer Kontrollperson) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe intraindividuelle  $\Delta\Delta Ct$ -Werte bedeuten einen hohen Wert des Quotienten aus distaler und proximaler Probe. Somit entspricht ein hoher  $\Delta\Delta Ct$ -Wert einer vermehrten Genexpression in der distalen Hautprobe (i.e. im erkrankten Areal). Die Genexpression von DCC und NEO1 war für Patienten mit PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (e.g). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* = p<0,05.



**Abbildung 19:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in Hautproben von entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP sowie gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die intraindividuellen  $\Delta\Delta Ct$ -Werte (i.e. der intraindividuelle Quotient zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta Ct$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA aus proximalen und distalen Hautproben eines Patienten oder einer Kontrollperson) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe intraindividuelle  $\Delta\Delta Ct$ -Werte bedeuten einen hohen Wert des Quotienten aus distaler und proximaler Probe. Somit entspricht ein hoher  $\Delta\Delta Ct$ -Wert einer vermehrten Genexpression in der distalen Hautprobe (i.e. im erkrankten Areal). Die Genexpression von NEO1 war für Patienten mit nicht-entzündlicher PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (g). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ .



**Abbildung 20:** Genexpression der Inflammations- und Regenerationsmarker in Hautproben von schmerzhaften und schmerzlosen PNP sowie gesunder Kontrollgruppe. Die Boxplots zeigen die intraindividuellen  $\Delta\Delta Ct$ -Werte (i.e. der intraindividuelle Quotient zwischen dem individuell normalisierten  $\Delta Ct$ -Wert aus dem Verhältnis aus Zielgen und dem Haushaltsgen 18s RNA aus proximalen und distalen Hautproben eines Patienten oder einer Kontrollperson) für die Inflammationsmarker Allograft inflammatory factor 1 (AIF1; a) und Interleukin-6 (IL-6; b) sowie für die Regenerationsmarker Netrin-G1 (c), Netrin-G2 (d), deleted in colorectal cancer (DCC; e), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; f), Neogenin-1 (NEO1; g) und Netrin-1 (h). Hohe intraindividuelle  $\Delta\Delta Ct$ -Werte bedeuten einen hohen Wert des Quotienten aus distaler und proximaler Probe. Somit entspricht ein hoher  $\Delta\Delta Ct$ -Wert einer vermehrten Genexpression in der distalen Hautprobe (i.e. im erkrankten Areal). Die Genexpression von NEO1 war für Patienten mit schmerzhafter PNP niedriger als für gesunde Kontrollpersonen (g). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer, \* =  $p < 0,05$ .

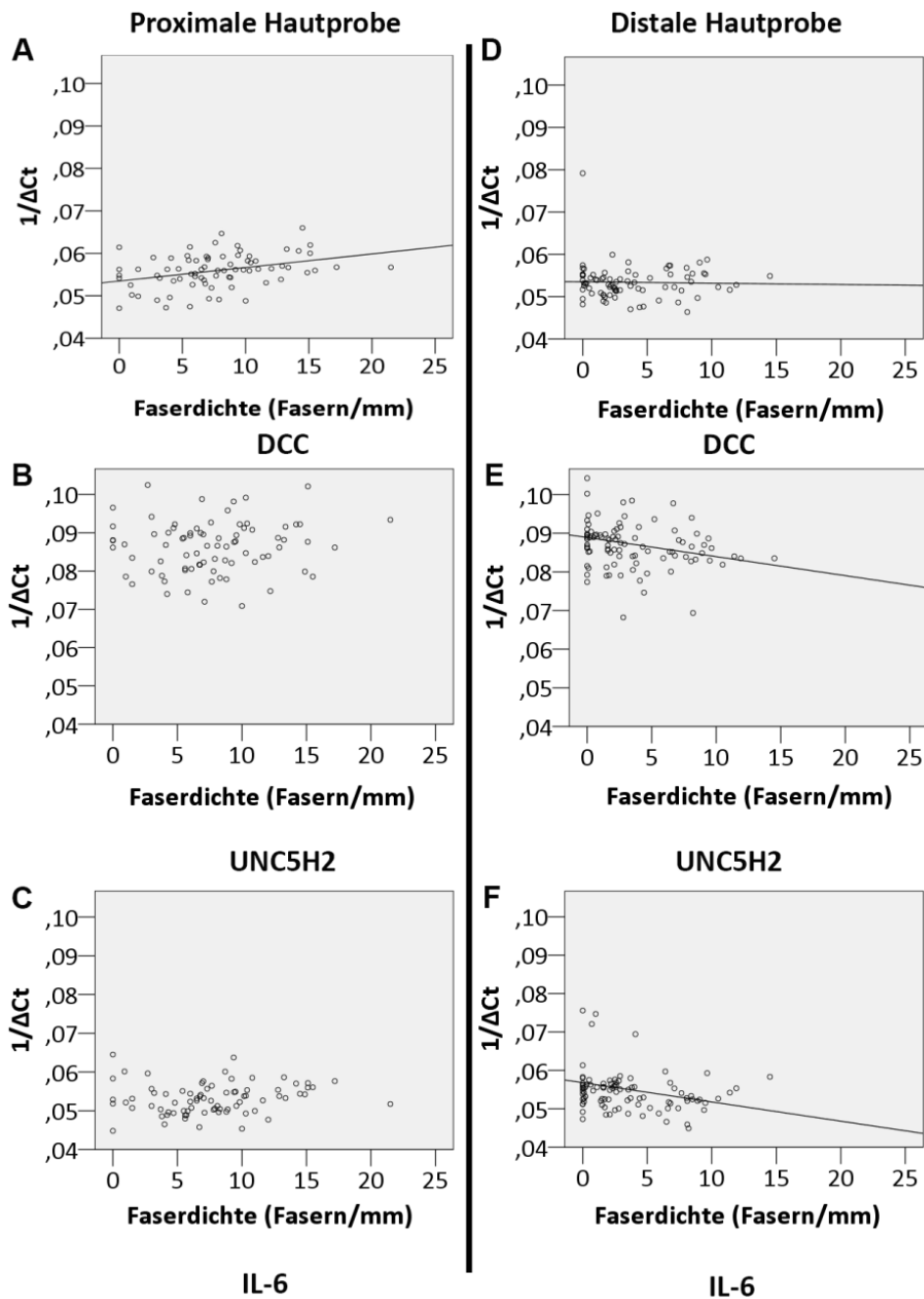
#### **3.4.4. Korrelation der Genexpression mit Nervenfaserdichte in den Hautbiopsien**

Bei Patienten mit PNP korrelierte DCC für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte proximal positiv (Korrelationskoeffizient  $+0,314$ ,  $p < 0,05$ ), und distal negativ (Korrelationskoeffizient  $-0,347$ ,  $p < 0,01$ ) mit der Faserdichte in den entsprechenden Hautproben. Zudem zeigte sich für UNC5H2 (Korrelationskoeffizient  $-0,285$ ,  $p < 0,05$ ) und für IL-6 (Korrelationskoeffizient  $-0,247$ ,  $p < 0,05$ ) eine negative Korrelation zwischen  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und der Faserdichte in den entsprechenden distalen Hautproben von Patienten (siehe Abb. 21).

Für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte ergab sich ebenfalls in distalen Hautproben von Patienten eine negative Korrelation zwischen der Faserdichte der jeweiligen Hautproben mit UNC5H2 (Korrelationskoeffizient  $-0,247$ ,  $p < 0,05$ ). In den proximalen Hautproben zeigten sich für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte keine Korrelationen.

Für die Kontrollpersonen ergab sich weder für distale, noch für proximale Hautproben eine Korrelation zwischen der Faserdichte in den Hautproben und der Genexpression ( $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) der in der Haut untersuchten Marker.

Zusammenfassend korrelierten die beiden Netrin-1 Rezeptoren DCC und UNC5H2 negativ mit der Nervenfaserdichte in distalen Hautproben von Patienten, nicht jedoch bei gesunden Kontrollpersonen.



**Abbildung 21:** Korrelationen zwischen der Nervenfaserdichte der Hautproben (in Fasern/mm) und der Genexpression (als  $1/\Delta Ct$ -Werte; i.e. die reziproken Wert aus dem Verhältnisse des  $\Delta Ct$ -Wertes des Zielgens mit dem normalisierten Haushaltsgen 18s RNA) von deleted in colorectal cancer (DCC; a,b), Uncoordinated5H2 (UNC5H2; c, d) und Interleukin-6 (IL-6; e, f) in proximalen und distalen Hautproben von PNP-Patienten. Die Genexpression von DCC korreliert in proximalen Hautproben positiv (Korrelationskoeffizient  $+0,314$ ,  $p < 0,05$ ) und in distalen Hautproben negativ (Korrelationskoeffizient  $-0,347$ ,  $p < 0,01$ ) mit der Nervenfaserdichte in den entsprechenden Hautproben (a, b). Die Genexpression von UNC5H2 und IL-6 korreliert in distalen Hautproben negativ mit der Faserdichte (UNC5H2: Korrelationskoeffizient  $-0,285$ ,  $p < 0,05$ ; IL-6: Korrelationskoeffizient  $-0,247$ ,  $p < 0,05$ ) (d, f).



### 3.4.5. Korrelation zwischen Patientenalter und Fragebögen mit der Genexpression in den Hautbiopsaten

Korrelierte man die Genexpression der Inflammationsmarker und die Marker der Regeneration peripherer Nerven mit dem Patientenalter ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Genexpression des Inflammationsmarkers AIF1 korrelierte positiv mit dem Alter in proximalen (Korrelationskoeffizient  $+0,217$  für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ) und distalen Hautproben (Korrelationskoeffizient  $+0,238$  für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ; Korrelationskoeffizient  $+0,238$  für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ). Der Regenerationsmarker DCC korrelierte hingegen negativ mit dem Patientenalter (Korrelationskoeffizient  $-0,417$  für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,01$ ; Korrelationskoeffizient  $-0,359$  für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,01$ ). Die  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte des Regenerationsmarkers NTNG2 korrelierten ebenfalls negativ mit dem Patientenalter (Korrelationskoeffizient  $-0,236$  für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ).

Auch die Daten der Fragebögen wurden mit der Genexpression der verschiedenen Zielgene in den Hautproben korreliert: Für den ADS-Gesamtsummenwert fand sich keinerlei Korrelation mit den Genexpressionsdaten aus den Hautproben ( $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte jeweils in proximalen und distalen Hautproben sowie  $i\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte). Der GCPS-Gesamtsummenwert korrelierte negativ mit den  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werten von NEO1 in distalen Hautproben (Korrelationskoeffizient  $-0,240$ ,  $p < 0,05$ ). Weitere Korrelationen zwischen dem GCPS-Gesamtsummenwert und  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werten sowie  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten proximal und distal sowie  $i\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der untersuchten Marker ergaben sich nicht.

Es fand sich keine Korrelation zwischen dem NPSI-Gesamtsummenscore und der Genexpression der untersuchten Marker in den Hautproben ( $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte proximal und distal sowie  $i\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte). Zusätzlich wurden die Items „Brennen“, „Druck“ und „Dysästhesie“ mit den Genexpressionsprofilen der Hautproben korreliert. Hier zeigte sich eine schwache positive Korrelation zwischen Netrin-1 in proximaler Haut ( $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte) und der Kategorie „Brennen“ (Korrelationskoeffizient  $+0,286$  für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ; Korrelationskoeffizient  $+0,281$  für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ).

Das Item „Druck“ korrelierte für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte und  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte negativ mit AIF1 in distaler Haut (Korrelationskoeffizient  $-0,227$  für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ; Korrelationskoeffizient  $-0,331$  für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,01$ ). Zusätzlich korrelierten die  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte von NEO1 in distaler Haut negativ mit dem Item „Druck“ (Korrelationskoeffizient  $-0,252$ ,  $p < 0,05$ ).

Für die Korrelation des Items „Dysästhesie“ mit den Genexpressionsdaten der Haut ergaben sich folgende Ergebnisse: Sowohl DCC, als auch UNC5H2 korrelierten in distalen Hautproben positiv mit der Kategorie „Dysästhesie“ (DCC: Korrelationskoeffizient +0,282 für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ; Korrelationskoeffizient +0,289 für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ; UNC5H2: Korrelationskoeffizient +0,333 für  $1/\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,01$ ; Korrelationskoeffizient +0,262 für  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte,  $p < 0,05$ ). Zudem korrelierte  $i\Delta\Delta\text{Ct}$  von UNC5H2 positiv mit dem Subscore „Dysästhesie“ (Korrelationskoeffizient +0,306,  $p < 0,05$ ).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

In vorliegender Arbeit ging es um die Ermittlung möglicher lokaler Biomarker zur Unterscheidung zwischen schmerzhaften und schmerzlosen beziehungsweise inflammatorischen und nicht-inflammatorischen PNP sowie zwischen diagnostischen PNP-Subgruppen. Ausgangspunkt waren Ergebnisse aus verschiedenen Microarray-Arbeiten an Nerven- und Hautbiopsaten (Renaud et al., 2005, Kinter et al., 2010, Steck et al., 2011), in denen sich Unterschiede in den RNA-Expressionsprofilen potenzieller Biomarker sowohl aus der Gruppe der Inflammationsmarker als auch aus der Gruppe der sogenannten Axonguidance Moleküle zwischen PNP-Subgruppen fanden. In unserer Studie untersuchten wir Genexpressionsprofile von Markern der Inflammation und Regeneration peripherer Nerven in Haut- und N. suralis-Biopsaten einer großen Kohorte von Patienten mit PNP unterschiedlicher Ätiologie. Wir konnten die Ergebnisse der obengenannten Studien weder in Haut- noch in Nervenproben bestätigen. Allerdings fanden wir bei PNP-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv Hinweise auf eine kutan reduzierte Genexpression von Netrinen, während die Genexpression des Inflammationsmarkers AIF1 in der Haut erhöht war.

			Inflammationsmarker		Regenerationsmarker					
			AIF1	IL6	Netrin-G1	Netrin-G2	DCC	UNC5H2	NEO1	Netrin 1
1/ $\Delta$ Ct	proximal	PNP : Kontrolle			↓	↓↓↓	↓			
		entzündlich: nicht-entzündlich								↓
		schmerzhaft : schmerzlos								
	distal	PNP : Kontrolle	↑↑		↓↓	↓↓↓	↓↓↓		↓	↓
		entzündlich: nicht-entzündlich								↓
		schmerzhaft : schmerzlos								
$\Delta\Delta$ Ct	proximal	PNP : Kontrolle	↑		↓					
		entzündlich: nicht-entzündlich								
		schmerzhaft : schmerzlos								
	distal	PNP : Kontrolle	↑↑		↓↓	↓↓↓	↓↓↓		↓	↓
		entzündlich: nicht-entzündlich								↓
		schmerzhaft : schmerzlos							↓	
Intraindividuelles $\Delta\Delta$ Ct		PNP : Kontrolle					↓		↓	
		entzündlich: nicht-entzündlich								
		schmerzhaft : schmerzlos								

Tabelle 8 : Tabellarische Übersicht der wichtigsten Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse der Hautproben.

#### **4.2. Fehlende Unterschiede innerhalb diagnostischer Subgruppen**

Ein Ziel dieser Arbeit war es einen oder mehrere Biomarker für diagnostische PNP-Subgruppen zu identifizieren. Ein solcher Biomarker würde die komplexe und häufig nicht eindeutige Diagnosestellung vereinfachen. In vorliegender Arbeit konnten für die untersuchten Zielgene weder in den Nerven- noch in den Hautbiopsaten Gruppen- oder Subgruppenunterschiede zwischen PNP-Patienten und Kontrollen gefunden werden. Ein wesentlicher Grund ist die bei zwar großer Gesamtkohorte, relativ niedrige Gruppenstärke in den jeweiligen PNP-Subkategorien. In früheren Arbeiten zeigten Renaud et al. sowohl für TAC1, als auch für AIF1, sowie SCD in Nervenproben von CIDP-Patienten eine erhöhte Genexpression verglichen mit Nervenproben gesunder Probanden. Zudem war AIF1 in den Nervenproben von Vaskulitis-Patienten im Vergleich mit normalen Nervenproben vermehrt exprimiert und SCD zeigte zusätzlich eine höhere Genexpression für CIDP Patienten verglichen mit Patienten mit Vaskulitis (Renaud et al., 2005, Kinter et al., 2010). Eine mögliche Ursache für unsere hierzu diskrepanten Befunde kann die in vorliegender Studie höhere Fallzahl im Vergleich mit den früheren Arbeiten sein (z.B. n=8 CIDP Patienten in Renaud et al. versus n=22 in vorliegender Arbeit). Ein weiterer Grund könnte in möglichen Unterschieden in der Patientenauswahl liegen; genaue Einschlusskriterien wurden in besagten Arbeiten nicht berichtet. Auch verwendeten Renaud et al. lediglich drei und Kinter et al. sieben Nervenproben von Vaskulitis-Patienten, wohingegen in vorliegender Arbeit 16 N. suralis-Biopsate von Patienten mit vaskulitischer Neuropathie untersucht wurden (Renaud et al., 2005, Kinter et al., 2010). In der Arbeit von Kinter et al. wurden die sieben Nervenproben von Vaskulitis-Patienten mit vier gesunden Kontrollnerven verglichen; eine der Kontrollproben stammte dabei von einer Autopsie, eine andere von einem fünfjährigen Kind, was den Datenvergleich jeweils deutlich einschränkt. Auch wird AIF1 in dieser Arbeit nur in drei der sieben Patientenproben vermehrt exprimiert und zudem in deutlich geringerem Ausmaß als zahlreiche andere Marker (Kinter et al., 2010). Der fehlende Unterschied der SCD-Expression zwischen Patienten mit CIDP und Vaskulitis liegt möglicherweise in der größeren Fallzahl in der hier durchgeführten Studie begründet.

Auf den Daten dieser beiden Studien basierend wurde eine dritte Microarray-Studie veröffentlicht (Steck et al., 2011), in der eine vermehrte Genexpression von TAC1 und SCD bei Nervenproben aus CIDP-Patienten verglichen mit Nerven gesunder Kontrollpersonen

sowie eine vermehrte AIF1-Genexpression bei Nervenproben von CIDP- und Vaskulitispatienten verglichen mit gesunden Nervenproben beschrieben wurde. Da die meisten Unterschiede im Vergleich mit Nerven gesunder Kontrollpersonen, deren Herkunft zudem in der Publikation nicht genannt wird, gefunden wurden, sind diese Ergebnisse nicht direkt mit unseren Daten vergleichbar.

Auch bei der Genexpression von inflammatorischen Markern und Markern der Regeneration peripherer Nerven in Hautbiopsaten von Patienten mit PNP fanden sich in vorliegender Arbeit keine Unterschiede zwischen den verschiedenen diagnostischen Subgruppen. Eine Arbeit von Lee et al. verglich mittels Microarray-Analyse und qRT-PCR die AIF1-Genexpression in Hautbiopsien aus dem Unterarm von Patienten mit verschiedenen PNP-Formen (CMT1, CIDP und diabetische Neuropathie) und gesunden Kontrollpersonen. Hier konnte bei CIDP-Patienten eine höhere AIF1-Genexpression nachgewiesen werden als bei gesunden Probanden (Lee et al., 2010). Aber auch diese Ergebnisse sind nicht direkt vergleichbar, da das Kontrollkollektiv aus nur sieben gesunden Personen bestand, die zudem am Unterschenkel biopsiert wurden. Ein methodischer Aspekt ist, dass bei den bisherigen Studien fast ausschließlich Microarray-Analysen als Screening-Methode eingesetzt wurden, ohne dass die hierbei auffälligen Marker stets mittels z.B. qRT-PCR validiert wurden (Morey et al., 2006). Auch sind die Vergleiche hinsichtlich Spezifität und Sensitivität der verschiedenen verfügbaren Array-Systeme bisher rar und hierbei gewonnene Ergebnisse lassen sich mit verschiedenen Microarray-Plattformen und in unterschiedlichen Laboren nur schlecht reproduzieren (Bammler et al., 2005).

#### **4.3. In der Haut ist die Genexpression von Mitgliedern der Netrin-Familie bei PNP-Patienten niedriger als bei gesunden Kontrollpersonen**

Der bifunktionale Modulator des Axonwachstums Netrin-1 zeigte in distalen Hautproben eine niedrigere Genexpression bei PNP Patienten verglichen mit dem gesunden Kontrollkollektiv (siehe Abb. 7h). Die zugehörigen, überwiegend das Axonwachstum fördernden Rezeptoren DCC und NEO1 waren in distalen Hautproben von PNP Patienten ebenfalls niedriger exprimiert als im gesunden Kontrollkollektiv (für DCC siehe Abb. 7e, 13e und 18e, für NEO1 siehe Abb. 7g, 13g und 18g). An beiden Hautentnahmeorten fand sich eine niedrigere Genexpressionen der beiden das Axon- und Dendritenwachstum regulierenden Marker Netrin-G1 und -G2 bei PNP-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen (siehe Abb. 6c, d; 7c, d; 12c und 13c, d). Der das Axonwachstum

hemmende Rezeptor UNC5H2 wies hingegen keine Gruppenunterschiede im Vergleich zwischen Patienten und gesunder Kontrollgruppe auf.

Inwiefern Netrin-1 eine wachstumshemmende oder -fördernde Wirkung auf das Axon hat, hängt von der Zusammensetzung der Rezeptoren auf der Oberfläche des axonalen Wachstumskonus ab (Huber et al., 2003, Round et al., 2007). Eine reduzierte Genexpression von Netrin-1 in erkrankten, distalen Hautproben hat somit keine eigene Aussagekraft, sondern ist abhängig von der Expression der zugehörigen Rezeptoren. DCC (Keino-Masu et al., 1996) und NEO1 (Cirulli et al., 2007) haben im Zusammenspiel mit dem Liganden Netrin-1 eine das Axonwachstum fördernde Wirkung und beide Rezeptoren waren in den distalen Hautproben von PNP-Patienten geringer exprimiert als in gesunder Haut. Somit ist es plausibel, dass die kombinierte Verminderung sowohl des Liganden als auch dieser Rezeptoren zur Nervenfaserverdegeneration beiträgt, auch wenn sich aus der vorliegenden Studie keine Ursache-Wirkungs-Beziehung ableiten lässt.

Da UNC5H2 und auch die gleichzeitige Expression von DCC und UNC5H2 zu einer Hemmung des Axonwachstums führen (Hong et al., 1999, Cirulli et al., 2007), wäre bei einer Schädigung peripherer Nerven eine Vermehrung von UNC5H2 zu erwarten gewesen, die wir nicht beobachten konnten. Es bleibt zu klären, ob und welche Rolle hierbei mögliche andere Faktoren spielen.

Deutliche Expressionsunterschiede fanden sich beim Vergleich von Patienten- und Kontrollhautproben für Netrin-G1 und -G2. Bislang wurde beim Menschen lediglich eine Mutation des Netrin-G1- und -G2-Gens als mögliche Ursache einer atypischen Form des Rett-Syndroms (Borg et al., 2005, Archer et al., 2006, Nectoux et al., 2007) sowie im Zusammenhang mit Schizophrenie (Aoki-Suzuki et al., 2005) und bipolaren Erkrankungen (Eastwood et al., 2008) diskutiert. Ob und was für eine Rolle sie im peripheren Nervensystem spielen, wurde bislang noch nicht untersucht. Wir fanden, dass die Netrin-G1- und G2-Expression in Hautproben von PNP Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen, insbesondere in den distalen Hautproben, deutlich geringer war. Da bei beiden Proteinen von einem wachstumsfördernden Einfluss auf periphere Nerven auszugehen ist (Nakashiba et al., 2002), könnte die reduzierte Genexpression bei PNP Patienten ebenfalls zur Nervenfaserverdegeneration beitragen. Zusammenfassend scheinen PNP mit einer verminderten Genexpression von kutanen Regenerationsmarkern einherzugehen. Leider liegt uns kein Kontrollkollektiv aus gesunden Nervenproben vor, sodass der Vergleich der

Genexpression dieser Marker zwischen Nervenproben von Patienten und gesunden Nerven nicht möglich ist. Weitere Studien, die die Wechselwirkung zwischen Nerven und Haut näher beleuchten sind erforderlich um u.a. zu klären, welche Zellen diese Regenerationsmarker produzieren. Für das Netrin-1-DCC-UNC5H2-System konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass die Aktivierung von Schwann-Zellen eine entscheidende Rolle spielt (Madison et al., 2000, Webber et al., 2011). Periphere Neuropathien betreffen jedoch nicht allein den Nerven, sondern verändern auch die Homöostase der Haut. Von besonderem Interesse ist es daher herauszufinden, welche Hautzellen beteiligt sein könnten.

#### **4.4. Die Genexpression für Netrin-1 ist in distalen Hautproben bei entzündlichen PNP niedriger als bei nicht-entzündlichen PNP**

Die Genexpression von Netrin-1 war in distalen Hautproben bei Patienten mit entzündlicher PNP niedriger als bei Patienten mit nicht-entzündlicher PNP (siehe Abb. 9h und 15h). Netrin-1 ist vor allem als bifunktionaler Modulator des Axonwachstums bekannt (Huber et al., 2003, Round and Stein, 2007). Dass Netrin-1 darüber hinaus Entzündungsprozesse hemmen kann, wurde in zahlreichen Arbeiten, v.a. im Mausmodell, gezeigt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmt Netrin-1 die Leukozytenmigration und dient aufgrund seiner starken Expression durch Endothelzellen als Barriere, die den Übertritt von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe verhindert (Ly et al., 2005). Darüber hinaus reguliert Netrin-1 die Entzündungsreaktion von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch Unterdrückung der COX-2-gesteuerten Prostaglandin-E2-Produktion (Ranganathan et al., 2013). *In vitro* konnte zudem gezeigt werden, dass Netrin-1 auch die Zytokinproduktion von T-Zellen hemmt (Tadagavadi et al., 2010). Bislang wurde dieser Effekt v.a. im Tiermodell untersucht (Mirakaj et al., 2011b, Ranganathan et al., 2013, Podjaski et al., 2015), stützt aber unsere Befunde einer reduzierten antientzündlichen Wirkung (i.e. Mangel an Netrin-1) in entzündlichen PNP. Ein Expressionsunterschied ließ sich in Nervenbiopsaten nicht nachweisen, was mit dem Zellrepertoire zusammenhängen könnte: während die Haut reich an sekretorisch hoch-aktiven Zellen wie etwa Keratinozyten und Fibroblasten ist, kommen im peripheren Nerven als Hauptquelle von Axonguidance Molekülen praktisch nur Schwann Zellen in Frage (Madison et al., 2000).



#### **4.5. Die Genexpression von NEO1 in distalen Hautproben ist bei schmerzloser PNP und gesunden Kontrollpersonen höher als bei schmerzhafter PNP**

In distalen Hautproben fand sich eine niedrigere Genexpression von NEO1 bei schmerzhaften PNP im Vergleich mit Patienten mit schmerzlosen PNP und gesunden Kontrollpersonen (siehe Abb. 11g, 17g und 20g). Des Weiteren korrelierte die NEO1-Genexpression negativ mit dem Gesamtsummenscore des GCPS-Schmerzfragebogens: eine hohe Schmerzstärke ging mit einer niedrigen NEO1 Genexpression einher. Zudem war eine hohe NEO1 Genexpression mit vermehrtem Druckschmerz (NPSI) assoziiert. Inflammatorische Prozesse sind bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen maßgeblich beteiligt (Moalem et al., 2006). Dass NEO-1 neben seiner Funktion als bifunktionaler Marker der Regeneration peripherer Nerven auch in Entzündungsprozesse involviert ist, konnte in neueren Arbeiten gezeigt werden. Beispielsweise ließ sich mittels NEO1 Knockout-Mäusen zeigen, dass die Unterdrückung der endogenen NEO1-Produktion zu einer Entzündungshemmung bei medikamentös induzierter Peritonitis und bei Lungenverletzungen führt (Konig et al., 2012, Mirakaj et al., 2012). Im gleichen Mausmodell konnte jedoch auch die entzündungshemmende Wirkung des Liganden RGMa im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor NEO1 nachgewiesen werden, da dieser die Leukozytenmigration bei medikamentös induzierter Peritonitis verhindert (Mirakaj et al., 2011a). Auch der zweite Ligand von NEO1, Netrin-1, hat eine anti-entzündliche Wirkung (Ly et al., 2005, Tadagavadi et al., 2010, Ranganathan et al., 2013). Ein möglicher Einfluss von NEO1 auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen ließe sich daher nicht allein durch die Beeinflussung inflammatorischer Prozesse erklären. Insbesondere da sich für NEO1 in vorliegender Arbeit keine Unterschiede zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP fanden. Dass NEO1 mit der NPSI-Kategorie Druck negativ korreliert, könnte auf einen Einfluss auf nozizeptive A $\beta$ -Nervenfasern (Djoughri et al., 2004) hinweisen. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, die das Zusammenspiel von NEO1 und seinen beiden Liganden Netrin-1 und RGMa in Bezug auf neuropathische Schmerzen untersuchen.

#### **4.6. Die AIF1-Genexpression ist in Hautproben von Patienten höher als bei gesunden Kontrollpersonen**

Die Genexpression von AIF1 war sowohl in distalen (siehe Abb. 7a und 13a) als auch in proximalen Hautproben (siehe Abb. 12a) für die Gesamtgruppe aller Patienten höher als für gesunde Kontrollpersonen. Allerdings fand sich in Nerven- und Hautproben kein Unterschied

in der AIF1-Genexpression zwischen den verschiedenen diagnostischen Subgruppen; darüber hinaus war die Genexpression zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen und schmerzhaften bzw. schmerzlosen PNP praktisch gleich.

AIF1 wirkt ähnlich einem pro-inflammatorischen Zytokin und wird u.a. von Makrophagen sezerniert (Deininger et al., 2000, Pashenkov et al., 2000). Zudem wird AIF1 unter dem Einfluss weiterer inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  z.B. nach Verletzungen in glatten Gefäßmuskelzellen gebildet (Tian et al., 2007). Dies konnte auch in Nervenbiopsaten von Patienten mit vaskulitischer PNP gezeigt werden (Broglio et al., 2008). In der Arbeit von Lee et al. ließ sich für CIDP-Patienten eine höhere AIF1-Genexpression in Hautbiopsaten vom Unterarm von PNP Patienten nachweisen als für gesunde Kontrollpersonen (Lee et al., 2010). Wir konnten zwar eine erhöhte Genexpression in proximalen und distalen Hautproben von PNP-Patienten verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe zeigen; Subgruppenunterschiede ergaben sich allerdings nicht. In der Arbeit von Lee et al. wurden elf CIDP-Patienten untersucht. Drei dieser Patienten wiesen sowohl proximale, als auch distale Symptome auf; acht Patienten litten lediglich unter distalen Symptomen. Zudem wurden sieben gesunde Kontrollpersonen untersucht. Wir untersuchten die AIF1-Genexpression in distalen und proximalen Hautbiopsaten der unteren Extremitäten von 14 CIDP-Patienten mit distaler Symptomatik. Es fand sich kein Gruppenunterschied. Auch zeigten sich keine Unterschiede zu anderen diagnostischen Subgruppen. Mögliche Gründe für die diskrepanten Studienergebnisse sind neben der Messmethodik die Unterschiede in Gruppengröße und Biopsieentnahmeorten. Auffällig bleibt, dass AIF1 offenbar auch in Körperregionen vermehrt exprimiert wird, die klinisch (noch) nicht von der PNP befallen sind (i.e. Oberschenkel und Unterarm). Möglicherweise könnte AIF1 ein früher Erkrankungsmarker sein. Bemerkenswert ist, dass weder in Haut- noch in Nervenproben Unterschiede in der AIF1-Genexpression zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP zu finden waren, obwohl AIF1 pro-inflammatorisch aktiv ist (Pashenkov et al., 2000). Ein möglicher Grund hierfür ist, dass die Unterscheidung in entzündliche und nicht-entzündliche PNP in vorliegender Studie überwiegend anhand klinischer Kriterien erfolgte, was nicht dem Inflammationsstatus des entnommenen Nervenbiopsats entsprechen muss; zudem kann die bei einigen Patienten durchgeführte immunsuppressive/immunmodulatorische Therapie vor Biopsie die ursprünglich vorhandenen entzündlichen Prozesse am Nerven und der umgebenden Haut verändert haben.

#### **4.7. Fehlende Unterschiede in der Genexpression von IL-6**

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in Haut- und Nervenbiopsaten weder ein Unterschied in der RNA-Expression von IL-6 zwischen Patienten und gesunden Kontrollpersonen, noch zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP beziehungsweise zwischen schmerzhaften und schmerzlosen Erkrankungsformen. Jedoch fand sich in den Nervenproben eine steigende IL-6-Genexpression mit zunehmendem Lebensalter.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein überwiegend pro-inflammatorisches Zytokin, das v.a. von T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen freigesetzt wird (Nijsten et al., 1987). Zudem scheint IL-6 nach peripherer Nervenschädigung in pro-inflammatorische und regenerative Prozesse involviert (Bastien et al., 2014) und an der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt zu sein (De Jongh et al., 2003, Lindenlaub et al., 2003, Üçeyler et al., 2015b).

In einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte in Hautbiopsaten von Patienten mit Neuropathien unterschiedlicher Ätiologie eine erhöhte IL-6-Genexpression bei PNP-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollpersonen gezeigt werden. Auch fand sich in Nervenbiopsaten von Patienten mit schmerzhafter PNP eine höhere IL-6 Genexpression als für schmerzlose PNP (Üçeyler et al., 2015b). Eine Studie von Yamamoto et al. zeigte eine deutlich erhöhte IL-6-Genexpression in N. suralis Biopsien von Patienten mit vaskulitischer PNP verglichen mit gesunden, aus Autopsien gewonnenen, Nerven (Yamamoto et al., 2001). Dass die IL-6-Konzentration in verschiedenen Geweben und Serum mit dem Lebensalter ansteigt, wurde bereits mehrfach gezeigt. (Ershler et al., 2000). Es wird vor allem die im fortgeschrittenem Lebensalter verminderte Produktion der IL-6 supprimierenden Sexualhormone als ursächlich angenommen (Ershler et al., 2000, Maggio et al., 2006). Der Anstieg freier Sauerstoffradikale mit zunehmendem Lebensalter, der zu einer vermehrten IL-6-Produktion führt, wird ebenfalls als mögliche Ursache diskutiert (Sarkar et al., 2006) wobei die Datenlage insgesamt diskrepant ist (Roubenoff et al., 1998, Beharka et al., 2001).

Dass sich in vorliegender Arbeit keine Unterschiede in der IL-6 Genexpression zwischen Patienten und gesunden Kontrollpersonen sowie zwischen verschiedenen Erkrankungsformen fanden, könnte möglicherweise im unterschiedlichen Verhältnis von Kontroll- zu Patientenkollektiv liegen. Bei Üçeyler et al. wurde eine insgesamt etwas größere Patientenkohorte (n=133 bei Üçeyler et al. versus n=97 in vorliegender Studie) mit einer ähnlich großen Gruppe gesunder Kontrollpersonen verglichen, sodass das relative Verhältnis von Patienten- und Kontrollkollektiv verschieden ist. Darüber hinaus unterschied sich das

Patientenkollektiv auch in seiner Zusammensetzung der einzelnen Subgruppen. Die fehlenden Auffälligkeiten in der Subgruppe der vaskulitischen PNP, die aufgrund der Arbeit von Yamamoto et al. zu erwarten gewesen wären, sind am ehesten in dem fehlenden Vergleich mit gesunden Kontrollnerven begründet.

#### **4.8. Kritikpunkte und Grenzen der vorliegenden Arbeit**

Wesentliche Limitation der vorliegenden Studie sind die niedrige Anzahl gesunder Kontrollpersonen und die fehlende Übereinstimmung in Geschlecht und Alter mit dem Patientenkollektiv. Dies war v.a. bedingt durch die strengen Einschlusskriterien für gesunde Kontrollpersonen, die eine normale IENFD in den Hautbiopsien voraussetzten. Gerade bei älteren Probanden fanden sich zudem häufig weitere Ausschlusskriterien wie z.B. eine Diabeteserkrankung oder Hinweise auf eine PNP bei den Neurographien. Darüber hinaus war trotz eines insgesamt großen Patientenkollektivs von 97 Personen die Anzahl an Patienten in den einzelnen diagnostischen Subgruppen gering. Eine weitere Einschränkung dieser Arbeit ist, dass lediglich die Gen- nicht jedoch die Proteinexpression untersucht werden konnte. Der Grund hierfür war v.a. die geringe Menge an vorhandenem Gewebe (wenige mm kleine Haut- und Nervenproben). Die geringe Materialmenge verhinderte zudem, dass alle in den Nervenproben untersuchten Kandidatengene auch in den Hautproben untersucht werden konnten und umgekehrt. Ein weiterer Aspekt ist, dass nicht mit Sicherheit der Teil des N. suralis biopsiert wurde, an dem die Erkrankung am aktivsten war. Insbesondere bei entzündlichen PNP kommt es häufig zu einem diskontinuierlichen Befall des Nerven, sodass die Möglichkeit besteht, dass bei der Biopsie ein wenig oder gar nicht betroffener Nervenabschnitt entnommen wurde. Dies könnte die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse beeinflusst haben. Weiterhin kann diese Arbeit die Frage ob Veränderungen in der Genexpression von Regenerationsmarkern peripherer Nerven Ursache oder Folge einer PNP-Erkrankung ist nicht beantworten, da hierfür ein longitudinales Studiendesign erforderlich wäre.

#### **4.9. Ausblick**

Insgesamt wurde das Ziel der Arbeit einen Biomarker in Haut- bzw. Nervenbiopsien von Patienten mit schmerzhaften und schmerzlosen PNP, insbesondere zur Unterscheidung verschiedener ätiologischer Subgruppen zu entdecken, nicht erreicht. Dennoch konnten wertvolle Hinweise auf die Pathophysiologie der PNP gewonnen werden. Insbesondere

scheinen Mitglieder der Netrin-Familie darin eine Rolle zu spielen. Dies ist ein Ansatz der in Zukunft weiter verfolgt werden sollte. Zusätzliche Studien mit größeren Patientenzahlen, insbesondere um die Anzahl an Patienten in den einzelnen diagnostischen Subgruppen zu erhöhen und ein größeres Kontrollkollektiv sind erforderlich um die Ergebnisse dieser Studie zu bestätigen. Um die Wechselwirkung zwischen Hautzellen und peripheren Nerven besser verstehen zu können, wäre die Etablierung von Kokulturen aus menschlichen Hautzellen und z.B. Spinalganglienneuronen wünschenswert. Hierbei könnten zum einen größere Gewebemengen generiert werden um auch Proteinanalysen durchführen zu können; ergänzende histologische Färbungen könnten Hinweise auf die Zellen geben, die Regenerationsmarker und inflammatorische Marker produzieren. Zum anderen könnte durch Zugabe von Regenerationsmarkern und Wachstumsfaktoren die direkte Wirkung auf das Nervenwachstum getestet werden.

## 5. Zusammenfassung

Polyneuropathien sind eine ätiologisch heterogene Erkrankung des peripheren Nervensystems. In bis zu 30% der Fälle ist eine Zuordnung zu einem bestimmten PNP Subtyp auch nach aufwändiger und zum Teil invasiver Diagnostik nicht möglich. Bislang fehlt ein diagnostischer Biomarker bei PNP, der z.B. bei der Unterscheidung zwischen einzelnen diagnostischen Subgruppen oder entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungsformen helfen könnte. In einer prospektiven Studie mit insgesamt 97 Patienten mit Neuropathien verschiedenster Ätiologie und 17 gesunden Kontrollpersonen erstellten wir Genexpressionsprofile von inflammatorischen Markern und Markern der Regeneration peripherer Nerven in Haut- und N. suralis-Biopsaten. Es wurden Inflammationsmarker (TAC1, CRMP2, AIF1, IL-6) und Marker, die in die Regeneration peripherer Nerven involviert sind (SCD, Netrin-1, DCC, UNC5H2, NEO1, Netrin-G1, Netrin-G2), mittels qRT-PCR untersucht. Alle Patienten erhielten eine N. suralis-Biopsie und/oder eine Hautbiopsie von Ober- beziehungsweise Unterschenkel. Weder in den Haut- noch in den N. suralis-Biopsaten konnten Unterschiede in der Genexpression dieser Marker zwischen einzelnen diagnostischen Subgruppen gefunden werden. Der Inflammationsmarker AIF1 war jedoch in Patienten-Hautproben sowohl proximal als auch distal höher exprimiert als bei gesunden Kontrollpersonen ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ). Zudem fand sich in den Hautproben von PNP-Patienten eine deutlich reduzierte Genexpression von Regenerationsmarkern aus der Netrin-Familie verglichen mit den Hautproben gesunder Probanden (Netrin-1, DCC, UNC5H2, NEO1 sowie Netrin-G1 und G2;  $p < 0,05$  bis  $p < 0,001$ ). Ferner wies Netrin-1 in distalen Hautproben bei Patienten mit einer entzündlichen PNP eine niedrigere Genexpression auf, als bei Patienten mit einer nicht-entzündlichen Erkrankungsform ( $p < 0,05$ ). Die Genexpression von NEO1 in distalen Hautproben war bei schmerzloser PNP und gesunden Kontrollpersonen höher als bei schmerzhafter PNP ( $p < 0,05$ ). Sowohl eine Erhöhung bestimmter Inflammationsmarker als auch eine Verminderung von Regenerationsmarkern peripherer Nerven können bei der Pathophysiologie von Polyneuropathien involviert sein. Insbesondere Mitglieder der Netrin-Familie scheinen eine komplexe Rolle für das Axonwachstum, jedoch auch für entzündliche Prozesse zu spielen.

## 6. Literaturverzeichnis:

- Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB (1997) The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein. *Nature* 386:838-842.
- Aoki-Suzuki M, Yamada K, Meerabux J, Iwayama-Shigeno Y, Ohba H, Iwamoto K, Takao H, Toyota T, Suto Y, Nakatani N, Dean B, Nishimura S, Seki K, Kato T, Itohara S, Nishikawa T, Yoshikawa T (2005) A family-based association study and gene expression analyses of netrin-G1 and -G2 genes in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57:382-393.
- Archer HL, Evans JC, Millar DS, Thompson PW, Kerr AM, Leonard H, Christodoulou J, Ravine D, Lazarou L, Grove L, Verity C, Whatley SD, Pilz DT, Sampson JR, Clarke AJ (2006) NTNG1 mutations are a rare cause of Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 140:691-694.
- Arimura N, Menager C, Fukata Y, Kaibuchi K (2004) Role of CRMP-2 in neuronal polarity. *J Neurobiol* 58:34-47.
- Atkinson AJ, Jr., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets D. L., Downing G. J., Hoth D. F., Oates J. A., Peck C. C., Schooley R. T., Spilker B. A., Woodcock, J., Zeger S. L. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69:89-95.
- Austin PJ, Moalem-Taylor G (2010) The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J Neuroimmunol* 229:26-50.
- Baker KA, Moore SW, Jarjour AA, Kennedy TE (2006) When a diffusible axon guidance cue stops diffusing: roles for netrins in adhesion and morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:529-534.
- Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, Bumgarner RE, Bushel PR, Chaturvedi K, Choi D, Cunningham ML, Deng S, Dressman HK, Fannin RD, Farin FM, Freedman JH, Fry RC, Harper A, Humble MC, Hurban P, Kavanagh TJ, Kaufmann WK, Kerr KF, Jing L, Lapidus JA, Lasarev MR, Li J, Li YJ, Lobenhofer EK, Lu X, Malek RL, Milton S, Nagalla SR, O'Malley J P, Palmer VS, Pattee P, Paules RS, Perou CM, Phillips K, Qin LX, Qiu Y, Quigley SD, Rodland M, Rusyn I, Samson LD, Schwartz DA, Shi Y, Shin JL, Sieber SO, Slifer S, Speer MC, Spencer PS, Sproles DI, Swenberg JA, Suk WA, Sullivan RC, Tian R, Tennant RW, Todd SA, Tucker CJ, Van Houten B, Weis BK, Xuan S, Zarbl H, Members of the Toxicogenomics Research C (2005) Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nat Methods* 2:351-356.
- Bastien D, Lacroix S (2014) Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 258:62-77.
- Beharka AA, Meydani M, Wu D, Leka LS, Meydani A, Meydani SN (2001) Interleukin-6 production does not increase with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56:B81-88.
- Beiter T, Artelt MR, Trautmann K, Schluesener HJ (2005) Experimental autoimmune neuritis induces differential microglia activation in the rat spinal cord. *J Neuroimmunol* 160:25-31.
- Berg A, Zelano J, Cullheim S (2010) Netrin G-2 ligand mRNA is downregulated in spinal motoneurons after sciatic nerve lesion. *Neuroreport* 21:782-785.
- Beschorner R, Engel S, Mittelbronn M, Adjodah D, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2000) Differential regulation of the monocytic calcium-binding peptides macrophage-inhibiting factor related protein-8 (MRP8/S100A8) and allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol* 100:627-634.
- Borg I, Freude K, Kubart S, Hoffmann K, Menzel C, Laccone F, Firth H, Ferguson-Smith MA, Tommerup N, Ropers HH, Sargan D, Kalscheuer VM (2005) Disruption of Netrin G1 by a balanced chromosome translocation in a girl with Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 13:921-927.
- Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E, Rostaing S, Lanteri-Minet M, Collin E, Grisart J, Boureau F (2004) Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 108:248-257.
- Brandt C, Pedersen BK (2010) The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2010:520258.

- Breuer S, Pech K, Buss A, Spitzer C, Ozols J, Hol EM, Heussen N, Noth J, Schwaiger FW, Schmitt AB (2004) Regulation of stearyl-CoA desaturase-1 after central and peripheral nerve lesions. *BMC Neurosci* 5:15.
- Bril V, Tomioka S, Buchanan RA, Perkins BA (2009) Reliability and validity of the modified Toronto Clinical Neuropathy Score in diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabet Med* 26:240-246.
- Brittain JM, Duarte DB, Wilson SM, Zhu W, Ballard C, Johnson PL, Liu N, Xiong W, Ripsch MS, Wang Y, Fehrenbacher JC, Fitz SD, Khanna M, Park CK, Schmutzler BS, Cheon BM, Due MR, Brustovetsky T, Ashpole NM, Hudmon A, Meroueh SO, Hingtgen CM, Brustovetsky N, Ji RR, Hurley JH, Jin X, Shekhar A, Xu XM, Oxford GS, Vasko MR, White FA, Khanna R (2011) Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca(2)(+) channel complex. *Nat Med* 17:822-829.
- Broglio L, Erne B, Tolnay M, Schaeren-Wiemers N, Fuhr P, Steck AJ, Renaud S (2008) Allograft inflammatory factor-1: a pathogenetic factor for vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 38:1272-1279.
- Burns TM, Mauermann ML (2011) The evaluation of polyneuropathies. *Neurology* 76:S6-13.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-193.
- Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, Qiu J, McMahon SB, Thompson SW (2004) Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci* 24:4432-4443.
- Charrier E, Reibel S, Rogemond V, Aguera M, Thomasset N, Honnorat J (2003) Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 28:51-64.
- Chopra K, Tiwari V (2012) Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. *Br J Clin Pharmacol* 73:348-362.
- Cirulli V, Yebra M (2007) Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:296-306.
- Cole SJ, Bradford D, Cooper HM (2007) Neogenin: A multi-functional receptor regulating diverse developmental processes. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1569-1575.
- Collins MP (2012) The vasculitic neuropathies: an update. *Curr Opin Neurol* 25:573-585.
- Collins MP, Dyck PJ, Gronseth GS, Guillevin L, Hadden RD, Heuss D, Leger JM, Notermans NC, Pollard JD, Said G, Sobue G, Vrancken AF, Kissel JT (2010) Peripheral Nerve Society Guideline on the classification, diagnosis, investigation, and immunosuppressive therapy of non-systemic vasculitic neuropathy: executive summary. *J Peripher Nerv Syst* 15:176-184.
- Dalakas MC (2011) Potential biomarkers for monitoring therapeutic response in patients with CIDP. *J Peripher Nerv Syst* 16 Suppl 1:63-67.
- Dancey JE, Dobbin KK, Groshen S, Jessup JM, Hruszkewycz AH, Koehler M, Parchment R, Ratain MJ, Shankar LK, Stadler WM, True LD, Gravell A, Grever MR (2010) Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res* 16:1745-1755.
- de Freitas MR (2007) Infectious neuropathy. *Curr Opin Neurol* 20:548-552.
- De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LH, De Deyne CS, Heylen RJ (2003) The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg* 96:1096-1103, table of contents.
- Deininger MH, Seid K, Engel S, Meyermann R, Schluesener HJ (2000) Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas. *Acta Neuropathol* 100:673-680.
- Devigili G, Tugnoli V, Penza P, Camozzi F, Lombardi R, Melli G, Broglio L, Granieri E, Lauria G (2008) The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain* 131:1912-1925.
- Djoughri L, Lawson SN (2004) Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Brain Res Rev* 46:131-145.



- Dominguez E, Rivat C, Pommier B, Mauborgne A, Pohl M (2008) JAK/STAT3 pathway is activated in spinal cord microglia after peripheral nerve injury and contributes to neuropathic pain development in rat. *J Neurochem* 107:50-60.
- Dyck PJ, Low PA, Windebank AJ, Jaradeh SS, Gosselin S, Bourque P, Smith BE, Kratz KM, Karnes JL, Evans BA, et al. (1991) Plasma exchange in polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 325:1482-1486.
- Eastwood SL, Harrison PJ (2008) Decreased mRNA expression of netrin-G1 and netrin-G2 in the temporal lobe in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33:933-945.
- Eftimov F, van Schaik I (2013) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: update on clinical features, phenotypes and treatment options. *Curr Opin Neurol* 26:496-502.
- England JD, Asbury AK (2004) Peripheral neuropathy. *Lancet* 363:2151-2161.
- England JD, Gronseth GS, Franklin G, Carter GT, Kinsella LJ, Cohen JA, Asbury AK, Szigeti K, Lupski JR, Latov N, Lewis RA, Low PA, Fisher MA, Herrmann DN, Howard JF, Jr., Lauria G, Miller RG, Polydefkis M, Sumner AJ (2009a) Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 72:177-184.
- England JD, Gronseth GS, Franklin G, Carter GT, Kinsella LJ, Cohen JA, Asbury AK, Szigeti K, Lupski JR, Latov N, Lewis RA, Low PA, Fisher MA, Herrmann DN, Howard JF, Jr., Lauria G, Miller RG, Polydefkis M, Sumner AJ (2009b) Practice Parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 72:185-192.
- England JD, Gronseth GS, Franklin G, Miller RG, Asbury AK, Carter GT, Cohen JA, Fisher MA, Howard JF, Kinsella LJ, Latov N, Lewis RA, Low PA, Sumner AJ (2005) Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 64:199-207.
- Ershler WB, Keller ET (2000) Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med* 51:245-270.
- Faber CG, Hoeijmakers JG, Ahn HS, Cheng X, Han C, Choi JS, Estacion M, Lauria G, Vanhoutte EK, Gerrits MM, Dib-Hajj S, Drenth JP, Waxman SG, Merkies IS (2012) Gain of function *Nanu1.7* mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol* 71:26-39.
- Garbay B, Boiron-Sargueil F, Shy M, Chbihi T, Jiang H, Kamholz J, Cassagne C (1998) Regulation of oleoyl-CoA synthesis in the peripheral nervous system: demonstration of a link with myelin synthesis. *J Neurochem* 71:1719-1726.
- Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ (2003) Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin. *J Biol Chem* 278:32561-32568.
- Gold R, Bayas A, Toyka KV (2005) [Autoimmune neuropathies--current aspects of immunopathologic diagnostics and therapy]. *Nervenarzt* 76:1009-1021; quiz 1022-1003.
- Gorson KC, Ropper AH (1995) Idiopathic distal small fiber neuropathy. *Acta Neurol Scand* 92:376-382.
- Graus F, Dalmau J (2013) Paraneoplastic neuropathies. *Curr Opin Neurol* 26:489-495.
- Gwathmey KG, Burns TM, Collins MP, Dyck PJ (2014) Vasculitic neuropathies. *Lancet Neurol* 13:67-82.
- Hadden RDM, Nobile-Orazio E, Sommer CL, Hahn AF, Illa I, Morra E, Pollard JD, Lunn MPT, Bouche P, Cornblath DR, Evers E, Koski CL, Legar J-M, van den Bergh P, van Doorn PA, van Schaik IN (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of paraproteinemic demyelinating neuropathies. Report of a Joint Task Force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--first revision. *J Peripher Nerv Syst* 15:185-195.

- Hautzinger M, Bailer, M. (1993) Allgemeine Depressionsskala. Manual Weinheim Beltz Test Gesellschaft.
- Heuss D, Haupt W, Kuntzer T, Löscher B, Neuendörfer B, Rautenstrauss B, Renaud S, Sommer C (2012) Leitlinien für Diagnostik bei Polyneuropathien. Deutsche Gesellschaft für Neurologie
- Hilz MJ, Marthol H, Neundorfer B (2000) [Diabetic somatic polyneuropathy. Pathogenesis, clinical manifestations and therapeutic concepts]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 68:278-288.
- Holzapfel B, Wickert, L. (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) - Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 37:120-126.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97:927-941.
- Hoskisson PA, England R, Sharples GP, Hobbs G (2004) Modulation of glycogen and trehalose levels in *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:225-233.
- Hovaguimian A, Gibbons CH (2011) Diagnosis and treatment of pain in small-fiber neuropathy. *Curr Pain Headache Rep* 15:193-200.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci* 26:509-563.
- Hughes R, Bensa S, Willison H, Van den Bergh P, Comi G, Illa I, Nobile-Orazio E, van Doorn P, Dalakas M, Bojar M, Swan A, Inflammatory Neuropathy C, Treatment G (2001) Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol* 50:195-201.
- Hughes RA (2002) Peripheral neuropathy. *BMJ* 324:466-469.
- Hughes RA, Cornblath DR (2005) Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 366:1653-1666.
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Menager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:781-782.
- Jain K (2010) *Handbook of Biomarkers: Humana Press Verlag, Springer Science+Business Media.*
- Jerath NU, Shy ME (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies: Understanding molecular pathogenesis could lead to future treatment strategies. *Biochim Biophys Acta.*
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87:175-185.
- Kinter J, Broglio L, Steck AJ, Tolnay M, Fuhr P, Latov N, Kalbermatten D, Sinnreich M, Schaeren-Wiemers N, Renaud S (2010) Gene expression profiling in nerve biopsy of vasculitic neuropathy. *J Neuroimmunol* 225:184-189.
- Koeberle PD, Tura A, Tassew NG, Schlichter LC, Monnier PP (2010) The repulsive guidance molecule, RGMa, promotes retinal ganglion cell survival in vitro and in vivo. *Neuroscience* 169:495-504.
- Koike H, Sobue G (2006) Alcoholic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 19:481-486.
- Koike H, Tanaka F, Sobue G (2011) Paraneoplastic neuropathy: wide-ranging clinicopathological manifestations. *Curr Opin Neurol* 24:504-510.
- Konig K, Gatidou D, Granja T, Meier J, Rosenberger P, Mirakaj V (2012) The axonal guidance receptor neogenin promotes acute inflammation. *PLoS One* 7:e32145.
- Kumar N (2014) Neurologic aspects of cobalamin (B12) deficiency. *Handb Clin Neurol* 120:915-926.
- Lacomis D (2002) Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 26:173-188.
- Latov N, Dalakas M, Vallat JM, Donofrio P, Hartung HP, Toyka KV (2011) Biomarkers in the diagnosis and therapy of CIDP: Proceedings of the Biomarkers Faculty Meeting; June 8-9, 2010, Athens, Greece. *J Peripher Nerv Syst* 16 Suppl 1:1-2.
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies IS, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Sole J, European Federation of Neurological S, Peripheral Nerve S (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 17:903-912, e944-909.

- Lee G, Xiang Z, Brannagan TH, 3rd, Chin RL, Latov N (2010) Differential gene expression in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) skin biopsies. *J Neurol Sci* 290:115-122.
- Lee HK, Seo IA, Suh DJ, Hong JI, Yoo YH, Park HT (2009a) Interleukin-6 is required for the early induction of glial fibrillary acidic protein in Schwann cells during Wallerian degeneration. *J Neurochem* 108:776-786.
- Lee HK, Wang L, Shin YK, Lee KY, Suh DJ, Park HT (2009b) Interleukin-6 induces proinflammatory signaling in Schwann cells: a high-throughput analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 382:410-414.
- Lee S, Kim JH, Lee CS, Kim Y, Heo K, Ihara Y, Goshima Y, Suh PG, Ryu SH (2002) Collapsin response mediator protein-2 inhibits neuronal phospholipase D(2) activity by direct interaction. *J Biol Chem* 277:6542-6549.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M (1997) Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature* 386:833-838.
- Lin JC, Ho WH, Gurney A, Rosenthal A (2003) The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nat Neurosci* 6:1270-1276.
- Lindenlaub T, Sommer C (2003) Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol* 105:593-602.
- Liu X, Strable MS, Ntambi JM (2011) Stearoyl CoA desaturase 1: role in cellular inflammation and stress. *Adv Nutr* 2:15-22.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, Tseng AA, Prodhon P, Moore KJ, Kinane TB (2005) Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14729-14734.
- Madison RD, Zomorodi A, Robinson GA (2000) Netrin-1 and peripheral nerve regeneration in the adult rat. *Exp Neurol* 161:563-570.
- Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L (2006) Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:575-584.
- Maimone D, Annunziata P, Simone IL, Livrea P, Guazzi GC (1993) Interleukin-6 levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 47:55-61.
- Martyn CN, Hughes RA (1997) Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62:310-318.
- McLeod JG (1995) Investigation of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58:274-283.
- Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE (1998) The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 395:801-804.
- Merkies IS, Schmitz PI, van der Meche FG, Samijn JP, van Doorn PA (2002) Clinimetric evaluation of a new overall disability scale in immune mediated polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:596-601.
- Meuth SG, Kleinschnitz C (2010) Multifocal motor neuropathy: update on clinical characteristics, pathophysiological concepts and therapeutic options. *Eur Neurol* 63:193-204.
- Mirakaj V, Brown S, Laucher S, Steinl C, Klein G, Kohler D, Skutella T, Meisel C, Brommer B, Rosenberger P, Schwab JM (2011a) Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6555-6560.
- Mirakaj V, Gatidou D, Potzsch C, Konig K, Rosenberger P (2011b) Netrin-1 signaling dampens inflammatory peritonitis. *J Immunol* 186:549-555.
- Mirakaj V, Jennewein C, Konig K, Granja T, Rosenberger P (2012) The guidance receptor neogenin promotes pulmonary inflammation during lung injury. *FASEB J* 26:1549-1558.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51:240-264.
- Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM (2006) Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 8:175-193.

- Morita T, Sobue K (2009) Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* 284:27734-27745.
- Nakashiba T, Ikeda T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, Culotti JG, Itohara S (2000) Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci* 20:6540-6550.
- Nakashiba T, Nishimura S, Ikeda T, Itohara S (2002) Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. *Mech Dev* 111:47-60.
- Nectoux J, Girard B, Bahi-Buisson N, Prieur F, Afenjar A, Rosas-Vargas H, Chelly J, Bienvenu T (2007) Netrin G1 mutations are an uncommon cause of atypical Rett syndrome with or without epilepsy. *Pediatr Neurol* 37:270-274.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ (1996) Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384:360-364.
- Niimi K, Nishimura-Akiyoshi S, Nakashiba T, Itohara S (2007) Monoclonal antibodies discriminating netrin-G1 and netrin-G2 neuronal pathways. *J Neuroimmunol* 192:99-104.
- Nijsten MW, de Groot ER, ten Duis HJ, Klasen HJ, Hack CE, Aarden LA (1987) Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* 2:921.
- Noguchi K, Kawai Y, Fukuoka T, Senba E, Miki K (1995) Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. *J Neurosci* 15:7633-7643.
- Pashenkov M, Efendic S, Zhu J, Zou LP, Ostenson CG, Mustafa M (2000) Augmented expression of daintain/allograft inflammatory factor-1 is associated with clinical disease: dynamics of daintain/allograft inflammatory factor-1 expression in spleen, peripheral nerves and sera during experimental autoimmune neuritis. *Scand J Immunol* 52:117-122.
- Paton CM, Ntambi JM (2009) Biochemical and physiological function of stearyl-CoA desaturase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E28-37.
- Pedersen-Bjergaard U, Nielsen LB, Jensen K, Edvinsson L, Jansen I, Olesen J (1989) Analgesia and local responses induced by neurokinin A and substance P in human skin and temporal muscle. *Peptides* 10:1147-1152.
- Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML (2004) mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* 494:233-239.
- Podjaski C, Alvarez JI, Bourbonniere L, Larouche S, Terouz S, Bin JM, Lecuyer MA, Saint-Laurent O, Larochelle C, Darlington PJ, Arbour N, Antel JP, Kennedy TE, Prat A (2015) Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation. *Brain* 138:1598-1612.
- Postler E, Rimner A, Beschorner R, Schluesener HJ, Meyermann R (2000) "Allograft-inflammatory-factor-1 is upregulated in microglial cells in human cerebral infarctions". *J Neuroimmunol* 108:244-250.
- Quach TT, Duchemin AM, Rogemond V, Aguera M, Honnorat J, Belin MF, Kolattukudy PE (2004) Involvement of collapsin response mediator proteins in the neurite extension induced by neurotrophins in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci* 25:433-443.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM (2004) Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol* 6:756-762.
- Ranganathan PV, Jayakumar C, Mohamed R, Dong Z, Ramesh G (2013) Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production. *Kidney Int* 83:1087-1098.
- Reilly MM, Shy ME (2009) Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:1304-1314.
- Renaud S, Hays AP, Brannagan TH, 3rd, Sander HW, Edgar M, Weimer LH, Olarte MR, Dalakas MC, Xiang Z, Danon MJ, Latov N (2005) Gene expression profiling in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol* 159:203-214.
- Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F, Treede RD (2006) Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 10:77-88.

- Roubenoff R, Harris TB, Abad LW, Wilson PW, Dallal GE, Dinarello CA (1998) Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53:M20-26.
- Round J, Stein E (2007) Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 17:15-21.
- Rouzaut A, Lopez-Moratalla N, de Miguel C (2000) Differential gene expression in the activation and maturation of human monocytes. *Arch Biochem Biophys* 374:153-160.
- Sander HW, Latov N (2003) Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology* 60:S8-15.
- Saperstein DS, Amato AA, Wolfe GI, Katz JS, Nations SP, Jackson CE, Bryan WW, Burns DK, Barohn RJ (1999) Multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy: the Lewis-Sumner syndrome. *Muscle Nerve* 22:560-566.
- Sarkar D, Fisher PB (2006) Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 236:13-23.
- Schmidt EF, Strittmatter SM (2007) The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Adv Exp Med Biol* 600:1-11.
- Sederholm BH (2010) Treatment of chronic immune-mediated neuropathies: chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy, multifocal motor neuropathy, and the Lewis-Sumner syndrome. *Semin Neurol* 30:443-456.
- Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V (2002) The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev* 54:285-322.
- Shanley L, Lear M, Davidson S, Ross R, MacKenzie A (2011) Evidence for regulatory diversity and auto-regulation at the TAC1 locus in sensory neurones. *J Neuroinflammation* 8:10.
- Singer MA, Vernino SA, Wolfe GI (2012) Idiopathic neuropathy: new paradigms, new promise. *J Peripher Nerv Syst* 17 Suppl 2:43-49.
- Skundric DS, Lisak RP (2003) Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration. *Exp Diabetes Res* 4:303-312.
- Sommer C, Gold, R., Hartung, H.P., Heuss, D., Kieseier, B., Koeppen, S., Steck, A., Stoll, G., Tackenberg, B., Toyka, K. V., Zimprich F (2012) Deutsche Gesellschaft für Neurologie- Leitlinien für die Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden.
- Sommer C, Lauria G (2007) Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurol* 6:632-642.
- Sommer C, Richter H, Rogausch JP, Frettlow J, Lungenhausen M, Maier C (2011) A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). *BMC Neurol* 11:104.
- Steck AJ, Kinter J, Renaud S (2011) Differential gene expression in nerve biopsies of inflammatory neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 16 Suppl 1:30-33.
- Tadagavadi RK, Wang W, Ramesh G (2010) Netrin-1 regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production and inflammation through UNC5B receptor and protects kidney against ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 185:3750-3758.
- Tazir M, Hamadouche T, Nouioua S, Mathis S, Vallat JM (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot-Marie-Tooth diseases: an update. *J Neurol Sci* 347:14-22.
- Tian Y, Autieri MV (2007) Cytokine expression and AIF-1-mediated activation of Rac2 in vascular smooth muscle cells: a role for Rac2 in VSMC activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C841-849.
- Üçeyler N, Geng A, Reiners K, Toyka KV, Sommer C (2015a) Non-systemic vasculitic neuropathy: single-center follow-up of 60 patients. *J Neurol* 262:2092-2100.
- Üçeyler N, Kafke W, Riediger N, He L, Necula G, Toyka KV, Sommer C (2010) Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy. *Neurology* 74:1806-1813.

- Üçeyler N, Riediger N, Kafke W, Sommer C (2015b) Differential gene expression of cytokines and neurotrophic factors in nerve and skin of patients with peripheral neuropathies. *J Neurol* 262:203-212.
- Üçeyler N, Sommer C (2008) Status of immune mediators in painful neuropathies. *Curr Pain Headache Rep* 12:159-164.
- Utans U, Arceci RJ, Yamashita Y, Russell ME (1995) Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J Clin Invest* 95:2954-2962.
- Valls-Canals J, Povedano M, Montero J, Pradas J (2002) Diabetic polyneuropathy. Axonal or demyelinating? *Electromyogr Clin Neurophysiol* 42:3-6.
- van den Berg B, Walgaard C, Drenthen J, Fokke C, Jacobs BC, van Doorn PA (2014) Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol* 10:469-482.
- Van den Bergh PY, Hadden RD, Bouche P, Cornblath DR, Hahn A, Illa I, Koski CL, Leger JM, Nobile-Orazio E, Pollard J, Sommer C, van Doorn PA, van Schaik IN, European Federation of Neurological S, Peripheral Nerve S (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol* 17:356-363.
- van Schaik IN, Léger J-M, Nobile-Orazio E, Cornblath DR, Hadden RDM, Koski CL, Pollard JD, Sommer C, Illa I, van den Bergh P, van Doorn P (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of multifocal motor neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--first revision. *J Peripher Nerv Syst* 15:295-301.
- Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ (1994) Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol* 127:2009-2020.
- Von Korff M, Ormel J, Keefe FJ, Dworkin SF (1992) Grading the severity of chronic pain. *Pain* 50:133-149.
- Vrancken AF, Notermans NC, Jansen GH, Wokke JH, Said G (2004) Progressive idiopathic axonal neuropathy--a comparative clinical and histopathological study with vasculitic neuropathy. *J Neurol* 251:269-278.
- Webber CA, Christie KJ, Cheng C, Martinez JA, Singh B, Singh V, Thomas D, Zochodne DW (2011) Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. *Glia* 59:1503-1517.
- Whitesell J (2010) Inflammatory neuropathies. *Semin Neurol* 30:356-364.
- Wilson NH, Key B (2006) Neogenin interacts with RGMa and netrin-1 to guide axons within the embryonic vertebrate forebrain. *Dev Biol* 296:485-498.
- Wilson NH, Key B (2007) Neogenin: one receptor, many functions. *Int J Biochem Cell Biol* 39:874-878.
- Wilson SM, Xiong W, Wang Y, Ping X, Head JD, Brittain JM, Gagare PD, Ramachandran PV, Jin X, Khanna R (2012) Prevention of posttraumatic axon sprouting by blocking collapsin response mediator protein 2-mediated neurite outgrowth and tubulin polymerization. *Neuroscience* 210:451-466.
- Wu X, Zou X, Chang Q, Zhang Y, Li Y, Zhang L, Huang J, Liang B (2013) The Evolutionary Pattern and the Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase Genes. *Biomed Res Int* 2013:856521.
- Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N, Sobue G (2001) Pathology-related differential expression regulation of NGF, GDNF, CNTF, and IL-6 mRNAs in human vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 24:830-833.
- Yurchenco PD, Wadsworth WG (2004) Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr Opin Cell Biol* 16:572-579.
- Zhao YY, Yan DJ, Chen ZW (2013) Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell Immunol* 284:75-83.

Zivkovic SA, Lacomis D, Lentzsch S (2009) Paraproteinemic neuropathy. *Leuk Lymphoma* 50:1422-1433.

## 7. Anhang

### 7.1. Materialien

#### Chemikalien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	FA Braun, Tuttlingen, Deutschland
Chlorophorm		Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
DEPC-Wasser	Diethyl-Pyro-Carbonat behandeltes Wasser	Laboreigene Herstellung
Ethanol 75% mit DEPC-Wasser		Laboreigene Herstellung
Glycogen		FA Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Isopropanol		Merck KGAA, Darmstadt, Deutschland
PFA	4% Paraformaldehyd	Laboreigene Herstellung
Phosphatpuffer	0,1M	Laboreigene Herstellung
Saccharose	10%	Laboreigene Herstellung
Trizol <sup>®</sup>		FA Invitrogen, Carlsbad (California), USA

#### Verbrauchsmaterial

Material	Bezeichnung	Hersteller
Hautbiopsiestanze	Biopsie-Punch 5mm	FA Stiefel Laboratories, Irland
Caps	0,2 ; 1,5 ; 2,0 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Kompressen	Sterile Kompressen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH und Co KG, Wetter, Deutschland
Pflaster	Leukomed	FA BNS medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	10µl/100µl/1000µl	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland



Reaktionsplatten für Real-Time-PCR	Micro Amp <sup>®</sup> Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Skalpell	Skalpellklinge	FA Braun, Tuttlingen, Deutschland
Sterile Pflasterstreifen	Leukostrip	FA Smith & Nephew, Hull, England
Verschlussfolien für PCR-Reaktionsplatten	Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate MicroAmp <sup>®</sup> Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### Geräte und Laborhilfen

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Heizblock		FA Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Homogenisator	MICRA	ART Prozess und Labortechnik GmbH und Co KG, Deutschland
Kühlzentrifuge	Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop	NanoDrop1000	FA Thermo Scientific, Wilmington, USA
PCR-Cycler für Reverse Transkription	Gene Amp PCR-System 9100	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Pipetman Gilson 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real-Time PCR-Cycler	StepOnePlus <sup>TM</sup>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schüttler	GLW L-40	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland
Thermoschüttler	TS 100 Thermoshaker	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland
Vortexer	GLW L-46	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland

### Medikamente

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Lokalanästhetikum	Scandicain 1%	AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland

### Enzyme, Puffer und Nukleinsäuren für reverse Transkription und PCR

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Nukleotide	deoxyNTPs Mixture	Taq Man Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Primer	Random Hexamers	
Puffer	10x RT-Buffer	
	25 mM MgCl <sub>2</sub>	
Reverse Transkriptase	Multiscribe Reverse Transcriptase	
RNase Inhibitor	RNase Inhibitor	
Puffer, Nukleotide, DNA Polymerase	TaqMan® Universal PCR Master Mix	Taq Man, Gene expression assay, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### Primer

Primer	Assay-ID	Hersteller
18s	4319413E	Taq Man, Gene expression assay, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
AIF1	Hs00610419_m1	
CRMP2	Hs00265851_m1	
DCC	Hs00180437_m1	
SCD	Hs01682761_m1	
IL6	Hs00174131_m1	
Neogenin 1	Hs00933950_m1	
Netrin 1	Hs00924151_m1	
Netrin G1	Hs01552822_m1	
Netrin G2	Hs00287286_m1	
TAC1	Hs00243225_m1	
TNFα	Hs00174128_m1	
UNC5H2	Hs00900710_m1	

## Software

<b>Artikel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Literaturverwaltungsprogramm	EndNote X5	Thomson Reuters, New York City, USA
PCR-Cycler-Software	StepOnePlus-Software	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Spectrophotometer-Software	NanoDrop 1000 V3.8.1. Windows 7	FA PeqLab, Erlangen, Deutschland
Statistische Auswertung	SPSS 20	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Tabellenkalkulation, Textverarbeitung	Office 2010 Paket	Microsoft Inc., Redmond, USA

## 7.2. Abkürzungen

ADS	Allgemeine Depressionsskala
AIF1	Allograft inflammatory factor 1
ANA	Antinukleäre Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
cDNA	Copy-DNA
CIAP	Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie
CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
CMAP	Muskelsummenaktionspotentiale
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CMT1	Charcot-Marie-Tooth Neuropathie Typ 1
CRMP2	Collapsin response mediator protein 2
CRP	C-reaktives Protein
CT	Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus
DCC	Deleted in colorectal cancer
DFNS	Deutscher Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz
GCPS	Graded Chronic Pain Scale
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
INCAT	Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
IL-6	Interleukin-6
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
INF $\gamma$	Interferon- $\gamma$
MADSAM	Multifokale erworbene demyelinisierende sensible & motorische Neuropathie
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MMN	Multifokale Motoneuropathie
mRNA	Messenger-RNA
mTCNS	Modifizierter Toronto Clinical Neuropathy Score
NEO1	Neogenin 1
NGF	Nerve growth factor
NGL1	Netrin-G-Ligand 1
NGL2	Netrin-G-Ligand 2

NPSI	Neuropathic pain scale inventory
NRS	Numerische Ratingskala
NSVN	Nicht-systemische Vaskulitis des PNS
ODSS	Overall Disability Sum Score
OGTT	Oraler Glucose-Toleranztest
PGP9.5	Pan axonal marker protein gene product 9.5
PIAN	Progressive idiopathische axonale Neuropathie
PNP	Polyneuropathie
PNS	Peripheres Nervensystem
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RF	Rheumafaktor
RGMa	Repulsive Guidance Molecule
rpm	Revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
SFN	Small fiber neuropathy
SNAP	Sensibles Nervenaktionspotential
TAC1	Tachykinin precursor 1
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
QST	Quantitative sensorische Testung
UNC5H2	Uncoordinated gene 5H2
ZNS	Zentrales Nervensystem

