

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Volkmann

**microRNA-Genexpressionsprofile  
in Blut-, Haut- und Nervenproben von  
Patienten mit Polyneuropathien**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Anna Hirschmann  
aus Göttingen

Würzburg, März 2020



Referentin:

Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Koreferent:

Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2020

Die Promovendin ist Ärztin.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Polyneuropathien .....	1
1.1.1	Klinische Charakteristika.....	1
1.1.2	Einteilung.....	1
1.1.3	Ätiologien der PNP .....	2
1.1.4	Diagnostik.....	3
1.1.5	Therapie .....	4
1.1.6	Biomarker bei PNP .....	5
1.2	microRNAs.....	6
1.2.1	miRNA-Biogenese .....	7
1.2.2	Identifizierung und Validierung von Zielmolekülen .....	8
1.2.3	Diagnostisches und therapeutisches Potenzial .....	10
1.3	miRNAs im zentralen und peripheren Nervensystem .....	11
1.3.1	lethal-7 miRNA-Familie .....	12
1.4	miRNAs und neuropathischer Schmerz.....	14
1.4.1	miRNA-103 und Cav1,2.....	16
1.5	Zielsetzung und Hypothese .....	18
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1	Patientenkohorte .....	19
2.2	Kontrollkohorte.....	19
2.3	Einteilung der Patientenkohorte .....	19
2.3.1	Einteilung nach Schmerz, Entzündung und Schädigungsmuster .....	20
2.3.2	Einteilung nach Ätiologie.....	20
2.4	Fragebögen zu Schmerzen und Depression .....	22
2.4.1	Neuropathic Pain System Inventory (NPSI) .....	22
2.4.2	Graded Chronic Pain Scale (GCPS) .....	22
2.4.3	Allgemeine Depressionsskala (ADS) .....	22
2.5	Standardisierte Untersuchungsscores.....	23
2.5.1	Overall Disability Sum Score (ODSS) .....	23
2.5.2	Modifizierter Toronto Clinical Neuropathy Score (mTCNS) .....	23
2.5.3	Modifizierter Medical Research Council-Score (mMRC) .....	24
2.6	Elektroneurographische Untersuchung .....	24
2.7	Blut- und Liquoruntersuchungen .....	24

2.8	Blutabnahme und -asservierung.....	25
2.9	Hautstanzbiopsie.....	26
2.10	Biopsie des N. suralis.....	27
2.11	RNA-Extraktion .....	27
2.12	Reverse Transkriptions-PCR.....	28
2.12.1	Reverse Transkriptions-PCR (Exiqon) .....	28
2.12.2	Reverse Transkriptions-PCR (TaqMan).....	29
2.13	Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR).....	30
2.13.1	qRT-PCR (Exiqon).....	31
2.13.2	qRT-PCR (TaqMan).....	32
2.13.3	Auswertung der qRT-PCR-Daten.....	33
2.14	Statistische Auswertung der Daten.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Epidemiologische Daten der Patienten- und Kontrollkohorte.....	35
3.2	Einteilung der Patientenkohorte .....	35
3.3	Fragebögen.....	36
3.3.1	NPSI .....	36
3.3.2	GCPS .....	37
3.3.3	ADS.....	38
3.3.4	Korrelation zwischen ADS und GCPS.....	39
3.4	Klinische Untersuchungsscores .....	39
3.5	Elektroneurographische Messergebnisse.....	40
3.6	Liquoranalyse.....	40
3.7	Therapie der PNP .....	41
3.8	Nervenfaserdichte in den Hautbiopsaten.....	43
3.9	Genexpressionsanalyse.....	44
3.9.1	Genexpressionsanalyse der miRNA-103a und Cacna1c.....	45
3.9.2	Genexpressionsanalyse der miR-let-7d .....	48
3.10	Korrelation der Genexpression mit den klinischen Daten.....	48
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>49</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	49
4.2	Score- und Fragebogendaten.....	49
4.3	Nervenfaserdichte in den Hautbiopsaten.....	49
4.4	Genexpressionsanalyse .....	51

4.4.1	miR-103a und Cacna1c .....	51
4.4.2	miR-let-7d.....	52
4.4.3	Fehlende Unterschiede zwischen den diagnostischen Subgruppen.....	54
4.5	Limitationen der Studie.....	54
4.5.1	Studiendesign.....	54
4.5.2	Herausforderungen bei der Analyse von miRNAs .....	55
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	57
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>63</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	63
6.2	Tabellenverzeichnis .....	65
6.3	Einteilung der Patientenkohorte nach Ätiologie .....	67
6.4	Patienten- und Fragebogendaten .....	68
6.4.1	Übersicht der Summenwerte der Fragebögen und Scores.....	68
6.4.2	Korrelation der GCPS-Items mit dem ADS-Summenwert.....	69
6.4.3	Übersicht der TCNS-Daten .....	70
6.4.4	Elektroneurographische Messergebnisse: N. suralis und N. tibialis .....	71
6.4.5	Elektroneurographische Messergebnisse: N. medianus, N. ulnaris und N. peronaeus .....	72
6.5	Materialtabellen.....	73
6.5.1	Verbrauchsmaterialien .....	73
6.5.2	Geräte und Laborhilfen .....	74
6.5.3	Reagenzien für Blutasservierung .....	75
6.5.4	Medikamente .....	75
6.5.5	Reagenzien für Aufarbeitung von Haut und Nerv .....	75
6.5.6	Reagenzien für RNA-Extraktion .....	76
6.5.7	Reagenzien für real-time-PCR (Exiqon).....	76
6.5.8	Reagenzien für quantitative real-time-PCR (TaqMan).....	76
6.5.9	Software .....	77
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Polyneuropathien

Unter Polyneuropathie (PNP) versteht man eine Schädigung des peripheren Nervensystems (PNS), von der definitionsgemäß mehrere Nerven betroffen sind. Vielfältige Ursachen bedingen die Beeinträchtigung motorischer, sensibler und autonomer Fasern des PNS. In Industrienationen ist die diabetische Neuropathie die häufigste PNP (Karki et al., 2016).

### 1.1.1 Klinische Charakteristika

PNP machen sich bei Patienten durch sensible, motorische und/oder autonome Symptome bemerkbar. Die sensiblen Symptome können sich als Plus- und Minussymptomatik äußern. Eine Plus-symptomatik beinhaltet z.B. Kribbelparästhesien und Schmerzen, während etwa Taubheitsgefühle und ein vermindertes Temperaturempfinden Minussymptome darstellen. Motorische Symptome kommen als Lähmungen und Muskelkrämpfe vor. Im Falle einer Beteiligung autonomer Fasern stellen sich vegetative Störungen ein, wie z.B. Hypo- oder Hyperhidrose, Hautrötung und Ödembildung sowie Kreislaufdysregulation und Blasen- und Mastdarmstörungen.

Der klinische Verlauf einer PNP ist interindividuell sehr unterschiedlich. Das Spektrum reicht von leichten, rein sensiblen Einschränkungen, die im Alltag gut kompensiert werden können, bis hin zu schweren Paresen mit Rollstuhlpflicht und starken Schmerzen.

### 1.1.2 Einteilung

Es bestehen zahlreiche Möglichkeiten der Einteilung von PNP. Im Folgenden sind einige aufgeführt:

- Zeitlicher Verlauf: akut (< 4 Wochen) – subakut (4-8 Wochen) – chronisch (> 8 Wochen)
- Verteilungstyp: symmetrisch – asymmetrisch, distal – proximal
- Schädigungstyp: axonal – demyelinisierend
- Art der Symptome: sensibel – motorisch – sensomotorisch – autonom

## Einleitung

- Ätiologie: erworben (z.B. entzündlich, metabolisch, medikamentös-toxisch)
  - hereditär (z.B. Charcot-Marie-Tooth Erkrankung)

### 1.1.3 Ätiologien der PNP

Zu den entzündlichen Ursachen einer PNP gehören Infektionen, wie z.B. Borreliose, Lepra oder HIV, und autoimmune Erkrankungen. Häufige Immunneuropathien sind die akute inflammatorische demyelinisierende PNP (AIDP), auch Guillain-Barré-Syndrom genannt (GBS), sowie die chronisch inflammatorische demyelinisierende PNP (CIDP). Zu dieser Gruppe zählt außerdem die paraproteinämische PNP, die durch Ablagerung von Immunglobulinen bei monoklonaler Gammopathie bedingt sein kann. Eine weitere Unterform der autoimmunen PNP ist die vaskulitische PNP, bei der die Neuropathie durch eine transmurale Entzündung der versorgenden Gefäße zustande kommt. Die vaskulitische PNP lässt sich unterteilen in eine PNP bei systemischer Vaskulitis und die nicht-systemische vaskulitische Neuropathie (NSVN), die sich durch eine isolierte Schädigung des peripheren Nervensystems auszeichnet (Collins & Hadden, 2017).

Unter den metabolischen PNP ist die diabetische PNP am häufigsten. Die Anzahl an Diabetespatienten, die im Laufe ihres Lebens eine Neuropathie entwickeln, variiert je nach Quelle zwischen 20% und 60% (Karki et al., 2016; Picon et al., 2012). Weitere metabolische Ursachen sind Schilddrüsenfunktionsstörungen, Amyloidose, Vitaminmangel und Unterernährung.

Bei der medikamentös-toxischen PNP ist häufig ein Alkoholabusus die Ursache. Als weitere auslösende Noxen kommen Medikamente, z.B. neurotoxische Chemotherapeutika, und Schwermetalle, wie Blei und Arsen, vor.

Gelegentlich tritt eine PNP auch als erstes Symptom einer neoplastischen Grunderkrankung auf. Hierbei führt eine primär gegen den Tumor gerichtete Immunantwort durch Kreuzreaktion mit neuronalen Antigenen zu einer Schädigung der Nerven. Diese sogenannte paraneoplastische PNP kommt am häufigsten bei Mamma- und Bronchialkarzinom sowie bei Lymphomen vor.

Die hereditären PNP stellen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe dar. Allein bei der Charcot-Marie-Tooth Erkrankung, die mit einer Prävalenz von

1 : 2.500 die häufigste erbliche Neuropathie ist, sind mehr als 1500 Mutationen in über 120 verschiedenen Genen bekannt (Juneja et al., 2019).

#### 1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose einer PNP erfolgt in erster Linie anhand klinischer Kriterien. Bei der klinisch-neurologischen Untersuchung finden sich typischerweise schlaffe Lähmungen und abgeschwächte oder ausgefallene Muskeleigenreflexe sowie sensible Ausfälle mit herabgesetztem Berührungs-, Schmerz-, Temperatur- und/ oder Vibrationsempfinden.

Die Zusatzdiagnostik dient der Klärung der Ätiologie sowie der Therapieplanung. Eine ausführliche Anamnese zu Symptomen, Verlauf und Vorerkrankungen und der neurologische Untersuchungsbefund können Hinweise auf die Ursache der PNP liefern. Mithilfe von elektroneurographischen Untersuchungen lassen sich dann u.a. axonale und demyelinisierende PNP unterscheiden, wobei Mischformen häufig vorkommen. Eine Demyelinisierung äußert sich etwa in einer Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und Verlängerung der distal motorischen Latenz (dmL), während eine verringerte Amplitude der Summenaktionspotenziale für eine axonale Schädigung spricht. Die laborchemische Analyse von Blut und Liquor kann über metabolische und entzündliche Ursachen Aufschluss geben. Bei positiver Familienanamnese und typischen klinischen Zeichen einer hereditären PNP (z.B. Hohlfüße, Krallenzehen, Wadenatrophie) ist eine genetische Testung indiziert. Weiterhin haben sich in den letzten Jahren die Magnetresonanztomographie und der hochauflösende Nervenultraschall als bildgebende Verfahren für das PNS etabliert und erlauben die morphologische Beurteilung der Nerven.

Falls trotz oben aufgeführter Diagnostik die Genese der PNP nicht geklärt werden kann, wird eine Nervenbiopsie durchgeführt, um eine potenziell behandelbare entzündliche Ursache nachzuweisen. Dabei wird aufgrund seiner guten Zugänglichkeit in der Regel der rein sensible N. suralis biopsiert.

Zur Beurteilung der dünn-myelinisierten A-delta- und nicht-myelinisierten C-Fasern kann eine Stanzbiopsie der Haut mit Quantifizierung der intraepi-

## Einleitung

dermalen Nervenfasern sowie zur Funktionstestung eine quantitative sensorische Testung (QST) hilfreich sein.

Dennoch bleibt die Ätiologie der PNP nach vollständiger Diagnostik, inklusive erweiterter laborchemischer Untersuchungen und Nervenbiopsie, auch an spezialisierten neurologischen Zentren bei 20% bis 30% der Patienten ungeklärt (Dyck et al., 1981; Heuß et al., 2012; Rudolph & Farbu, 2007; Visser et al., 2015). Da für eine adäquate Therapie die Kenntnis der Ätiologie notwendig ist, wäre ein diagnostischer Biomarker zur Identifikation der ätiologischen Subgruppen von großem Wert.

### 1.1.5 Therapie

Die Therapie der PNP besteht bei nicht-entzündlicher Genese meist in der Behandlung der Grunderkrankung. Bei Patienten mit diabetischer PNP kann beispielsweise eine gute Blutzuckereinstellung zu einer Besserung der Symptome führen. Eine PNP bei nachgewiesenem Vitaminmangel erfordert eine Substitution des jeweiligen Vitamins und eine toxische PNP die konsequente Eliminierung der schädigenden Substanz.

Schmerzhafte PNP erfordern häufig eine symptomatische Schmerztherapie. Hierbei kommen nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Antikonvulsiva (z.B. Pregabalin, Gabapentin), Antidepressiva und Opiate zum Einsatz.

Eine spezifische Therapie ist vor allem bei Patienten mit entzündlicher PNP möglich. Erregerbedingte PNP werden mit Antibiotika bzw. Virustatika behandelt. Bei immunvermittelten PNP werden Immunsuppressiva bzw. Immunmodulatoren eingesetzt. Die Wahl des geeigneten Medikaments richtet sich dabei nach aktuellen Leitlinien, z.B. der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Sommer et al., 2018).

Eine immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie kann bei Patienten mit entzündlicher PNP gute Wirkungen erzielen, jedoch ist das Therapieansprechen interindividuell sehr unterschiedlich und die breite Wirksamkeit der Medikamente bringt Nebenwirkungen mit sich. Daher wären Therapiemöglichkeiten, die spezifisch in De- und Regenerationsprozesse des peripheren Nervensystems eingreifen, wünschenswert.

### 1.1.6 Biomarker bei PNP

Ein Biomarker ist definitionsgemäß ein messbarer und objektivierbarer Parameter, der entweder die Diagnose einer Erkrankung erleichtern oder als Indikator für Prognose oder Therapieansprechen dienen kann. Er sollte leicht zu erheben sein und eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen (Dancey et al., 2010).

Ein Hinweis auf eine entzündliche PNP können erhöhte Entzündungsparameter (z.B. C-reaktives Protein oder Leukozyten) im Serum der Patienten sein. Beim GBS und der CIDP liegt oft eine zytoalbuminäre Dissoziation im Liquor vor, also eine Erhöhung des Liquoreiweißes bei normaler Zellzahl. Eine Nervenbiopsie kann ebenfalls hilfreich sein bei der Diagnose einer entzündlichen Neuropathie. CD68+ Makrophagen Cluster und MMP-9-Ablagerungen, die durch immunhistochemische Färbungen des Biopsats sichtbar gemacht werden, finden sich häufiger bei entzündlichen als bei nicht-entzündlichen PNP (Sommer & Toyka, 2011). Der Nachweis von Gefäßentzündung und -nekrose weist auf eine vaskulitische PNP hin. Bei der nicht-systemischen vaskulitischen PNP (NSVN) ist die Nervenbiopsie überdies die einzige Möglichkeit, eine definitive Diagnose zu stellen (Collins & Hadden, 2017).

In ausführlichen Leitlinien und Kriterienkatalogen sind klinische Kriterien, laborchemische und elektrophysiologische Untersuchungen sowie Auffälligkeiten bei der Nervenbiopsie zusammengefasst. Für die CIDP gibt es beispielsweise über 15 verschiedene Kriterienkataloge (Allen & Lewis, 2015). Trotzdem bleibt es aufgrund atypischer Verläufe und teilweise unzureichender Diagnosekriterien oft schwierig, die richtige Diagnose zu stellen (Lewis, 2017; Üçeyler et al., 2015).

Daher wurde in den letzten Jahren viel an potenziellen diagnostischen Biomarkern für PNP und ihre Subgruppen geforscht. Ein Ansatzpunkt sind bildgebende Verfahren. Die Bestimmung objektiver Parameter, z.B. des Nervenquerschnitts, in der Magnetresonanztomographie oder im hochauflösenden Ultraschall kann bei der Beurteilung von Nervenschädigungen hilfreich sein (Lichtenstein et al., 2018; Podnar, 2018). Ein weiterer Ansatzpunkt besteht in der Genexpressionsanalyse von Inflammations- und Remyelin-

## Einleitung

sierungsmarkern. Verschiedene Studien zeigten in den letzten Jahren insbesondere bei CIDP- und Vaskulitispatienten veränderte Genexpressionsprofile in Haut- (Lee et al., 2010; Leinders et al., 2017; Puttini et al., 2014) und Nervenbiopsien (Kinter et al., 2010; Schubert et al., 2019; Steck et al., 2011). Auch in Blutproben von Patienten mit PNP wurden wiederholt veränderte Genexpressionsprofile nachgewiesen (Ali et al., 2020; Beppu et al., 2015; Langjahr et al., 2018).

Auf der Suche nach Mustern bei der veränderten Genexpression fällt in verschiedenen Untersuchungsmaterialien wiederkehrend die Erhöhung proinflammatorischer Marker bei PNP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf (Jin & Park, 2018; Langjahr et al., 2018; Lee et al., 2010). Ein ähnliches Muster zeigt sich bei schmerzhaften im Vergleich zu schmerzlosen PNP-Patienten sowie bei Ratten in experimentellen Schmerzmodellen (Üçeyler et al., 2007; Zhang et al., 2018). Da Unterschiede in der Genexpression bisher nicht zwischen den ätiologischen Subgruppen gefunden wurden, die Herausforderung der PNP-Diagnostik jedoch in der Klärung der Ätiologie liegt, hat sich noch keiner der bislang analysierten Marker als diagnostischer Biomarker bei PNP durchgesetzt.

Einen neuen vielversprechenden Ansatzpunkt bieten microRNAs, die als nicht-kodierende RNA-Moleküle in diverse organische Prozesse eingreifen, indem sie die Proteinexpression beeinflussen. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen, da sich die Frage stellt, ob microRNAs in Zukunft eine Ergänzung oder Alternative als diagnostische Biomarker bei PNP darstellen könnten.

### 1.2 microRNAs

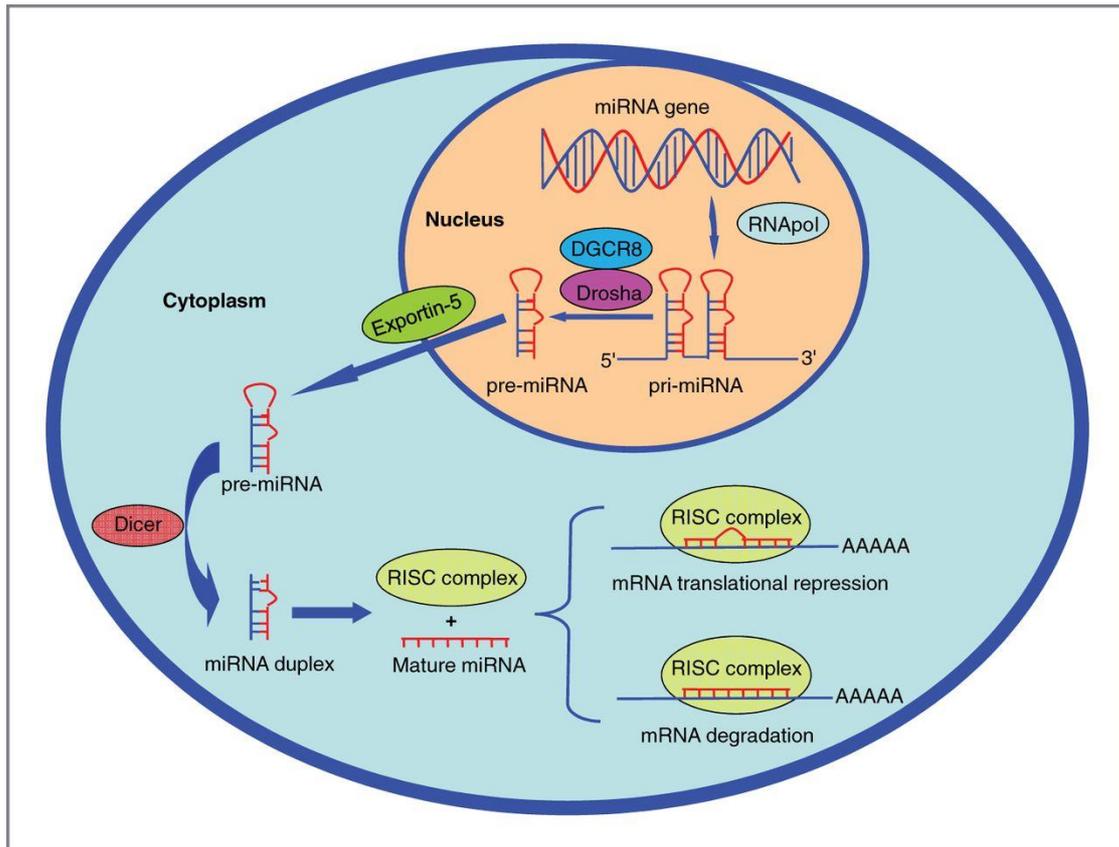
microRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht-kodierende RNA-Sequenzen, die posttranskriptional die Genexpression beeinflussen, indem sie hemmend auf die Translation von mRNA in Proteine wirken. Seit Lee et al. (1993) die erste miRNA, *lin-4* genannt, im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckte, wurden viele weitere miRNAs in Pflanzen, Tieren, Menschen und einigen Viren gefunden. Die letzte Version der miRBase, eine biologische Datenbank für miRNAs, enthält über 4.000 miRNA-Sequenzen in etwa 250 verschiedenen

Spezies. Über 2.500 verschiedene Sequenzen wurden bereits allein im menschlichen Organismus identifiziert (Kozomara et al., 2019).

miRNAs sind unter anderem involviert in die Entwicklung, Funktion und Regeneration des Herzens sowie bei der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen (Wojciechowska et al., 2017). Ihre Dysregulation fördert zudem die Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus (Lorenzen et al., 2012) und sie können bei der Genese und Progression von Malignomen als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken (Svoronos et al., 2016). Außerdem scheinen miRNAs die Entwicklung und Regeneration des Nervensystems zu beeinflussen (Wu et al., 2012; Zehir et al., 2010).

### 1.2.1 miRNA-Biogenese

miRNAs werden als langkettige pri-miRNAs transkribiert, die eine charakteristische Haarnadelstruktur formen. Anschließend folgt die Prozessierung zu etwa 70 Nukleotid langen pre-miRNAs durch Drosha, einem Enzym der Ribonuclease III (RNase III)-Familie, oder alternativ durch ein Spleißosom (Li & Rana, 2014). Die pre-miRNAs werden aus dem Nukleus in das Cytoplasma transportiert. Dort konvertiert Dicer, eine weitere RNase III, die pre-miRNAs zu reifen miRNAs. Der Führungsstrang wird in den RNA induced silencing complex (RISC) integriert, während der komplementäre Strang degradiert. Der RISC katalysiert das posttranskriptionale Gen-Silencing durch die miRNAs. Die Bindung erfolgt meist am 3' Ende der Ziel-mRNA durch die sogenannte seed region der miRNA, die aus 2-8 Nukleotiden besteht (Katz et al., 2016; Stavast & Erkeland, 2019). Ist diese vollständig komplementär zu ihrer Zielsequenz, folgt die Degradierung der mRNA, während eine unvollständige Basenpaarung die Translation blockiert. In jedem Fall bewirkt die miRNA eine reduzierte Proteinexpression ihrer Ziel-mRNA. Je mehr Kopien der Bindungsstelle am 3' Ende der Ziel-mRNA vorliegen, desto stärker fällt die Repression aus (Katz et al., 2016). Abbildung 1 stellt den Ablauf der miRNA-Biogenese schematisch dar:



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der miRNA-Biogenese:** Der klassische Pfad der miRNA-Biogenese umfasst folgende Schritte: Die „pri-miRNA“ wird im Nucleus von der RNA-Polymerase transkribiert und durch das Enzym Drosha zur „pre-miRNA“ verarbeitet. Diese wird durch Exportin 5 aus dem Nucleus in das Zytoplasma transportiert. Hier folgt die Prozessierung zur doppelsträngigen, reifen miRNA durch Dicer, ein weiteres Enzym. Die doppelsträngige miRNA wird in zwei Stränge aufgetrennt, von denen der aktive in den RISC integriert wird, während der andere passive Strang degeneriert. Inkomplette Basenpaarung verhindert die Translation und vollständige Basenpaarung führt zur Degradierung der Ziel-mRNA.

Abkürzungen: DGCR8 = DiGeorge syndrom critical region 8, miRNA = microRNA, mRNA = messenger RNA, RISC = RNA induced silencing complex, RNAPol = RNA-Polymerase

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der American Association for Cancer Research (AACR) (Yi et al., 2013).

### 1.2.2 Identifizierung und Validierung von Zielmolekülen

Vermutlich wird der Großteil der Gene im menschlichen Organismus durch miRNAs reguliert. Folglich hat das Interesse an miRNAs in der Forschung in den letzten Jahren immer mehr zugenommen. Für ein tiefgreifendes Verständnis der Funktion von miRNAs ist die Identifizierung von Zielproteinen von entscheidender Bedeutung (Agarwal et al., 2015). Bei der Suche nach Zielproteinen von miRNAs kommen experimentelle Methoden sowie *in silico* Analysen zum Einsatz. Die Anwendung von Microarrays nach exogener Veränderung des miRNA-Spiegels erlaubt die parallele Analyse von hunderten von

potenziellen Zielgenen. Der miRNA-Spiegel kann erhöht werden durch miRNA-Imitatoren, während eine Hemmung entweder durch den Knock-down eines miRNA-Gens erreicht wird oder durch das Zuführen eines antagonisierenden Oligonukleotids, das perfekt komplementär zur miRNA-Sequenz ist. Neben den vielgenutzten miRNA-Imitatoren und -Inhibitoren können auch virale Vektoren eingesetzt werden, die sich in das Genom einer Zelle integrieren und für miRNA-Inhibitoren oder pre-miRNA-Sequenzen kodieren (Bali & Kuner, 2014).

Seit 2003 werden außerdem bioinformatische Algorithmen angewendet, die über Lokalisierungs- und Sequenzanalysen miRNA-mRNA-Interaktionen vorhersagen (Stark et al., 2003). Die Algorithmen berücksichtigen dabei z.B. die Komplementarität einer möglichen Ziel-mRNA zur seed region und den Grad der evolutionären Konservierung (Thomas et al., 2010). miRNAs zeichnen sich durch eine hohe Konservierung aus, was bedeutet, dass ihre Gensequenzen über die Zeit wenig durch natürliche Selektion verändert wurden (Friedman et al., 2009). Diese Algorithmen sind ein wichtiges Instrument bei der Suche nach Zielproteinen und identifizieren viele hundert mögliche Zielgene für jede miRNA. Schwierigkeiten ergeben sich dennoch dadurch, dass die Bindungssequenzen oft sehr kurz sind, die Bindung eines Ziel-mRNA nicht immer eine genaue Basenpaarung erfordert und die Regeln der miRNA-mRNA-Interaktion noch nicht vollständig erforscht sind. Die Komplexität der Analysen bedingt daher viele falsch-positive Ergebnisse, während biologisch wichtige bereits bekannte Zielsequenzen durch die Algorithmen zum Teil nicht erkannt werden (Thomas et al., 2010).

Daher ist nach der Identifizierung möglicher Zielgene die experimentelle Validierung erforderlich. Mit direkten Methoden kann überprüft werden, ob eine spezifische miRNA-mRNA-Interaktion vorliegt. Hier kommen vor allem Reporter Assays zum Einsatz. Dabei wird ein Reporter gen, das z.B. für ein fluoreszierendes Protein kodiert, mit dem 3' Ende der mutmaßlichen Ziel-mRNA fusioniert, um dessen Expression messbar zu machen. In dem Fall, dass die Expression in der Präsenz der jeweiligen miRNA sinkt, spricht dies für eine spezifische miRNA-mRNA-Interaktion. Indirekte Methoden dienen der Zielgen-Validierung, können aber nicht das spezifische Bindungselement nachweisen,

## Einleitung

das für die Interaktion zwischen miRNA und mRNA verantwortlich ist. Ein Beispiel ist die exogene Veränderung des miRNA-Spiegels und die anschließende Expressionsanalyse des mutmaßlichen Zielgens mittels quantitativer real-time-PCR (qRT-PCR) (Bali & Kuner, 2014).

### 1.2.3 Diagnostisches und therapeutisches Potenzial

Die Dysregulation von miRNAs scheint bei vielen verschiedenen Erkrankungen eine Rolle zu spielen. Dabei zeigen sich reproduzierbare Muster, die nahelegen, miRNAs als Biomarker einzusetzen (Bernardo et al., 2012).

miRNA-Dysregulationen sind beispielsweise bei Malignomen bekannt, darunter Lungen-, Magen- und Ovarialkarzinome sowie Hirntumore (Deb et al., 2018; Ma et al., 2018; Shin & Chu, 2014; Yang et al., 2019). Viele dieser Tumorerkrankungen werden oft erst in späten Stadien diagnostiziert, was die Prognose deutlich verschlechtert. Daher wären nicht-invasive Marker für die Früherkennung von großem Wert. Einzelne miRNAs oder definierte Panels, gemessen z.B. im Serum der Patienten, könnten hier in Zukunft Anwendung finden (Bernardo et al., 2012). Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II und neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. M. Alzheimer und M. Parkinson, wird der Einsatz von miRNAs als diagnostische Biomarker erwogen (Klimczak et al., 2015; Lorenzen et al., 2012; van den Berg et al., 2020).

Die Dysregulation von miRNAs eröffnet nicht nur bei der Diagnostik, sondern auch bei der Therapie vieler Erkrankungen neue Möglichkeiten. Einer der ersten Wirkstoffe, der Eingang in klinische Studien fand, ist Miravirsen, ein miR-122-Inhibitor. Die leberspezifische miR-122 scheint das Hepatitis C-Virus zu stabilisieren und die Virusreplikation zu fördern (Luna et al., 2015). Eine Hemmung der miR-122 als neuer therapeutischer Ansatz zeigt sich vielversprechend in Phase-II-Studien. So könnte Miravirsen bald als erstes antagonistisches miR-Oligonukleotid für die Behandlung der Hepatitis C zugelassen werden (Li & Rana, 2014; Titze-de-Almeida et al., 2017).

Auch für die Behandlung von malignen Erkrankungen werden miRNA-Therapeutika entwickelt. Beispielsweise wird intensiv an der miR-34-Familie

geforscht, die die Expression von verschiedenen Onkogenen hemmt und damit dem Zellwachstum entgegenwirkt (Li & Rana, 2014). In Tiermodellen führte der Einsatz von miR-34-Imitator zu einer Reduktion der Tumorgroße (Wiggins et al., 2010). MRX34 ist ein in einem Lipid-Nanopartikel verkapselter miR-34-Imitator, der von Mirna Therapeutics entwickelt und in einer Phase-I-Studie bei verschiedenen humanen Tumoren getestet wurde. Die Studie musste allerdings aufgrund schwerer immunologischer Nebenwirkungen abgebrochen werden (Rupaimoole & Slack, 2017). Ein weiterer miRNA-bezogener Therapieansatz bei malignen Erkrankungen ist die Sensibilisierung von Tumorzellen gegen die Chemotherapie. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass miRNAs wie miR-let-7, miR-34 und miR-200 chemoresistente Tumorzellen sensibilisieren können (Stahlhut & Slack, 2015; Sun et al., 2012).

Weiterhin wurden einige miRNA-Inhibitoren und -Imitatoren zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ II entwickelt, die aktuell allerdings erst in präklinischen Studien getestet werden (Li & Rana, 2014; Rupaimoole & Slack, 2017).

Trotz der vielversprechenden Studien zu miRNA-Therapeutika, bleiben die Herausforderungen bei der Entwicklung und Anwendung vielfältig. Forschungsbedarf besteht vor allem bei der Zuführung der Oligonukleotide zu ihrem Zielgewebe oder -organ, um eine höhere Stabilität, gewebespezifischen Angriff und somit weniger unerwünschte Wirkungen zu erzielen (Rupaimoole & Slack, 2017).

### 1.3 miRNAs im zentralen und peripheren Nervensystem

Ein gängiges Verfahren, um die Funktion von miRNAs zu ergründen, besteht in der Eliminierung des Enzyms Dicer, das unerlässlich für die miRNA-Biogenese ist (siehe 1.2.1). Der Knock-Down von Dicer in verschiedenen Hirnregionen von Mäusen führt einerseits zum miRNA-Verlust und andererseits zu Apoptose und Degeneration von Nervenzellen (Davies et al., 2006; Schaefer et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass miRNAs eine wichtige Rolle beim Überleben von Neuronen spielen. Gestützt wird diese These von klinischen Studien, in denen eine Assoziation zwischen miRNA-Dysregulation und neurodegenerativen

Erkrankungen, z.B. M. Parkinson, M. Alzheimer, amyotropher Lateralsklerose und Chorea Huntington, festgestellt wurde (Espinosa-Parrilla et al., 2019; van den Berg et al., 2020). Auch während der Entwicklung des murinen Nervensystems scheinen Dicer und miRNAs wichtige Aufgaben zu erfüllen (Zehir et al., 2010). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sie bei der Regulierung von synaptischer Plastizität mitwirken (Ye et al., 2016).

Im peripheren Nervensystem scheinen miRNAs ebenfalls eine wichtige Rolle einzunehmen, insbesondere bei der Modulation von Schwann-Zellen, die die Myelinscheide um periphere Nerven bilden, und bei der Nervenregeneration. Die Eliminierung von Dicer in Schwann-Zellen kann die Zelldifferenzierung anhalten und Myelinisierung und Nervenregeneration behindern (Bremer et al., 2010; Gokbuget et al., 2018; Pereira et al., 2010; Viader et al., 2011; Yun et al., 2010). Außerdem fanden Wu et al. (2012) nach Quetschung des N. ischiadicus bei Mäusen eine geringere funktionelle Regenerationskapazität bei Tieren mit Dicer-Knock-Down als bei Wildtypen. Diese Experimente offenbaren eine wichtige Rolle der miRNAs bei der Regulierung der Nervenregeneration, was bedeuten könnte, dass sie bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von PNP beteiligt sind. Dies wiederum würde ein diagnostisches und therapeutisches Potential von miRNAs bei PNP nahelegen.

Ein Beispiel für miRNAs, die in De- und Regenerationsprozesse von Nerven involviert sind, ist die lethal-7 miRNA-Familie.

### 1.3.1 lethal-7 miRNA-Familie

Die lethal-7- (let-7-) miRNAs gehören mit lin-4 zu den am frühesten identifizierten miRNAs und wurden als erste humane miRNAs entdeckt (Roush & Slack, 2008).

Zu ihren biologischen Funktionen zählt unter anderem die Regulation von Zellproliferation und -differenzierung (Roush & Slack, 2008). Es überrascht daher nicht, dass sie an der Entwicklung von Tumorerkrankungen beteiligt sind. Obwohl auch onkogene Wirkungen der let-7-miRNAs beschrieben sind (Brueckner et al., 2007), agieren sie zumeist als Tumorsuppressoren, z.B. durch die negative Regulation von Onkogenen, wie Ras, c-Myc und JAK (Wang

et al., 2012). Daher ist eine geringe let-7-Expression bei vielen Tumorerkrankungen, darunter Bronchial-, Ovarial- und Magenkarzinom, assoziiert mit einem schlechteren Outcome für die Patienten (Nair et al., 2012). Zudem sind die let-7-miRNAs bei der Entwicklung des Nervensystems und neuronalen De- und Regenerationsprozessen beteiligt (Fairchild et al., 2019; Lehmann et al., 2012; Wang et al., 2019). Beispielsweise stellten Gokbuget et al. (2015) eine wichtige Rolle der let-7-miRNAs bei der Myelinisierung fest. Sie fanden während der Embryonalentwicklung eine starke Expression von let-7-miRNAs im N. ischiadicus von Mäusen. Hohe miR-let-7-Expression sorgte für eine verringerte Expression des Transmembranproteins Notch, das inhibitorisch auf die Myelinisierung wirkt. Dies resultierte in verstärkter Expression von Krox20 (auch Egr2 genannt), das als positiver Regulator der Myelinisierung bekannt ist, sowie einer erhöhten Anzahl an myelinisierten Axonen. Im Gegensatz hierzu bewirkte niedrige miR-let-7-Expression eine Störung der Myelinisierung.

Eine weitere Studie von Li et al. (2015) untersuchte die let-7-miRNAs im Zusammenhang mit Nervenverletzungen. Hierbei ergaben sich in den ersten Tagen nach Quetschung des N. ischiadicus bei Ratten ähnliche zeitabhängige Expressionsprofile der verschiedenen let-7-miRNAs. Der nerve growth factor (NGF), ein direktes Zielmolekül der let-7-miRNAs, zeigte mit diesen im zeitlichen Verlauf eine negative Korrelation. NGF ist ein neurotropher Faktor, der Differenzierung und Funktion von peripheren Nervenzellen fördert und positive Effekte bei der Prävention von Neuropathien in Tiermodellen für Diabetes mellitus zeigte (Manni et al., 2013). Die miR-let-7d, die in der Studie als repräsentatives Beispiel der miR-let-7-Familie ausgewählt wurde, bewirkte eine Reduktion der NGF-Sekretion sowie eine verringerte Proliferation und Migration von primären Schwann-Zellen in vitro. In vivo zeigte sich nach Quetschung des N. ischiadicus ebenfalls eine Reduktion der Proliferation und Migration der Schwann-Zellen sowie ein geringeres axonales Wachstum. Applikation von miR-let-7d-Inhibitor führte zu einer Abschwächung dieser Effekte, was dafür spricht, dass miR-let-7d-Inhibitoren positive Wirkungen auf

## Einleitung

die Nervenregeneration und damit ein Potential für die Therapie von Neuropathien haben könnten.

Einen weiteren Hinweis auf das Potential von miR-let-7-Therapeutika lieferten He et al. (2010), die eine Regulierung des  $\mu$ -Opioid-Rezeptors (MOR) durch miR-let-7 feststellten. Die Autoren schlugen die Hemmung der MOR-Expression durch miR-let-7 als möglichen Mechanismus für die Entwicklung von Opioid-Toleranz vor. MOR bindet Morphin und ist der wichtigste Rezeptor für die Wirkung von Opioidanalgetika (Matthes et al., 1996). Morphin bewirkte eine Hochregulierung von miR-let-7 sowie eine Reduktion der MOR-Expression in vitro und in Mausmodellen. Mittels Knock-Down von miR-let-7 konnte die Entwicklung der Opioid-Toleranz teilweise verhindert werden. Weitere miRNAs, die möglicherweise bei der Entwicklung von Opioid-Toleranz involviert sind, werden unter 1.4 beschrieben.

### 1.4 miRNAs und neuropathischer Schmerz

Bei chronischen neuropathischen Schmerzen findet sich typischerweise eine Veränderung der Proteinexpression von Signalmolekülen, Transmittern und Ionenkanälen, die zur Übererregbarkeit von nozizeptiven Neuronen beiträgt. Da miRNAs eine wichtige Aufgabe bei der Regulierung der Proteinexpression einnehmen, ist eine Beteiligung ihrerseits auch bei der Chronifizierung von neuropathischen Schmerzen wahrscheinlich (Niederberger et al., 2011).

Diese Hypothese wird durch viele Studienergebnisse gestützt. Es wurden beispielsweise miRNA-Dysregulationen in diversen Schmerzmodellen, wie bei der chronischen konstriktiven Nervenläsion (chronic constriction injury, CCI) (Cao et al., 2019; Genda et al., 2013; Li et al., 2013), Spinalnerven-Ligation (spinal nerve ligation, SNL) (Chang et al., 2017; Imai et al., 2011) und Axotomie des N. ischiadicus (Kusuda et al., 2011), festgestellt. Auch beim Menschen sind miRNA-Dysregulationen im Zusammenhang mit schmerzhaften Erkrankungen, wie Endometriose, dem Fibromyalgiesyndrom und dem komplexen regionalen Schmerzsyndrom, bekannt (Orlova et al., 2011; Qiu et al., 2020; Zhang et al., 2020). An dieser Stelle kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen der miRNA-Expression mit neuronalen Regenerations-

prozessen oder anderen Aspekten der Pathophysiologie abgesehen von Schmerzen zusammenhängen (Lutz et al., 2014).

Kausale Zusammenhänge zwischen miRNA-Dysregulation und neuropathischen Schmerzen lassen sich vermuten durch Studien, die sich mit der Involvierung von Ionenkanälen und Signalmolekülen bei der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen und deren Regulierung durch miRNAs beschäftigen. Um einen möglichen Mechanismus in dieser Hinsicht zu illustrieren, sind in Tabelle 1 fünf Studien aufgeführt, in denen bei Ratten in experimentellen Schmerzmodellen die Expression verschiedener miRNAs und ihrer Zielgene analysiert wurde. Die untersuchten Zielmoleküle sind jeweils Kationenkanäle, die bei der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen eine wichtige Rolle spielen (Woolf & Salter, 2000). Durch SNL- und CCI-Operationen, die bei den Versuchstieren mechanische und thermische Überempfindlichkeit auslösten, kam es zu einer Reduktion der untersuchten miRNA sowie zu einer verstärkten Expression des jeweiligen Zielmoleküls. Die miRNA-Substitution bewirkte eine Suppression der erhöhten Zielgenexpression sowie eine Abschwächung der durch SNL oder CCI hervorgerufenen mechanischen Überempfindlichkeit.

miRNA	Schmerzmodell	Material	Zielmolekül	Auswirkungen der miRNA-Ersatztherapie	Studie
miR-182	SNL	DRG	Nav1,7	miR-182-Injektion in das Spinalganglion bewirkte verringerte Nav1,7-Expression sowie Reduktion der mechanischen Allodynie	Cai et al. (2018)
miR-96	CCI	DRG	Nav1,3	Intrathekale miR-96-Injektionen bewirkte verringerte Nav1,3-Expression sowie Reduktion von Hitzeempfindlichkeit und mechanischer Allodynie	Chen et al. (2014)
miR-7a	SNL/CCI	DRG-Neuron	Spannungsabhängiger Natriumkanal ( $\beta$ -Untereinheit)	Überexpression der miR-7a bewirkte verringerte Expression der $\beta$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals sowie Schmerzreduktion	Sakai et al. (2013)

<b>miR-103</b>	SNL	Hinterhorn des Rückenmarks	Cav1,2	Intrathekale miR-103-Injektion bewirkte verringerte Cav1,2-Expression sowie Reduktion von neuropathischen Schmerzen	Favereaux et al. (2011)
<b>miR-183</b>	SNL	DRG	Nav1,3	Intrathekale miR-183-Injektionen bewirkte verringerte Nav1,3-Expression sowie Reduktion der mechanischen Allodynie	Lin et al. (2014)

**Tabelle 1: Überblick über Studien, die die Rolle von Ionenkanälen und deren Regulierung durch miRNAs bei der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen untersuchen:** In den vorliegenden Studien wurde die Runterregulierung der untersuchten miRNA bei verschiedenen Ratten-Schmerzmodellen festgestellt. Zur gleichen Zeit wurde eine erhöhte Expression des jeweiligen miRNA-Zielmoleküls gemessen. Die miRNA-Ersatztherapie führte zu einer Reduktion der Zielgenexpression sowie zur Abschwächung der durch CCI oder SNL ausgelösten neuropathischen Schmerzen.

Abkürzungen: CCI = chronic constriction injury, DRG = dorsal root ganglion, miRNA = microRNA, SNL = spinal nerve ligation

Es besteht auch ein therapeutisches Potential von miRNAs bei neuropathischen Schmerzen. Z.B. gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von miRNAs an der Entwicklung von Opioid-Toleranz darunter miR-23b, miR-339, miR-133b, miR-219 und die let-7 miRNA-Familie (Zhang, Qiu, et al., 2019). Beispielhaft wurde ein Mechanismus der let-7 miRNAs bei der Entwicklung von Opioid-Toleranz bereits unter 1.3.1 beschrieben. Es besteht die Hoffnung, dass miRNA-Therapeutika in Zukunft die Entwicklung von Opioid-Toleranz verzögern könnten. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Therapie neuropathischer Schmerzen könnte die Anwendung von miRNA-Imitatoren sein. Wie in Tabelle 1 aufgeführt konnte die miRNA-Ersatztherapie in verschiedenen Schmerzmodellen eine Abschwächung der mechanischen und thermischen Überempfindlichkeit erreichen (Cai et al., 2018; Chen et al., 2014; Favereaux et al., 2011; Lin et al., 2014).

Ein interessantes Beispiel für eine miRNA im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen ist die miR-103 und eines ihrer Zielgene *Cacna1c*, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

#### 1.4.1 miRNA-103 und Cav1,2

Unter den vielfältigen Funktionen der miR-103 nimmt ihre zumeist onkogene Wirkung bei Tumorerkrankungen einen hohen Stellenwert ein. Sie fördert

Zellwachstum und Metastasierung beim kolorektalem Karzinom (Geng et al., 2014; Zheng et al., 2016) und hemmt die Expression von Tumorsuppressorgen wie p57 und LATS2, was zu einer onkogenen Wirkung beim Osteosarkom und hepatozellulären Karzinom führt (Han et al., 2018; Wang et al., 2018). Auf der anderen Seite stellten Fu et al. (2016) beim Prostata-Karzinom eine inhibitorische Wirkung der miR-103 auf Tumorzellwachstum und -migration fest.

Eine miRNA kann die Expression von bis zu ca. 200 Zielgenen beeinflussen (Lewis et al., 2005). Als Beispiel hierfür beschreiben Wilfred et al. (2007) die Regulierung vieler verschiedener am Fett- und Energiestoffwechsel beteiligten Gene durch miR-103 und miR-107. In einer Studie von Trajkovski et al. (2011) wurde Caveolin-1, ein Stabilisator des Insulinrezeptors und damit ein Verstärker des Insulinsignalweges, als Zielmolekül der miR-103 identifiziert. Die Autoren fanden eine erhöhte Expression der miR-103 sowie eine erniedrigte Caveolin-1-Expression bei übergewichtigen Mäusen. Der Einsatz eines miRNA-Antagomirs führte zu einem Anstieg der Caveolin-1-Expression und einer verbesserten Insulinsensitivität. Auch im Plasma von Patienten mit pathologischer Glukosetoleranz korrelierte eine erhöhte miR-103a-Expression mit einer reduzierten Expression von Caveolin-1 (Luo et al., 2019). Vorläufigen Daten von Phase I/IIa-Studien zufolge schien RG-125, ein miR-103/107-Inhibitor, die Insulinsensitivität bei Patienten mit Typ-2 Diabetes und Nicht-alkoholischer Steatohepatitis zu verbessern. Allerdings wurde die Entwicklung von RG-125 im Juni 2017 zugunsten anderer erfolgversprechenderen Studien ausgesetzt (Bajan & Hutvagner, 2020). Außerdem stellten Favereaux et al. (2011) fest, dass die miR-103 die Expression des neuronalen L-Typ spannungsabhängigen Kalziumkanals beeinflusst, dessen Hochregulierung eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von chronischen neuropathischen Schmerzen spielt (Fossat et al., 2010). Dabei wurden alle drei Untereinheiten des Kalziumkanals, Cav1,2- $\alpha$ 1, - $\alpha$ 2 $\delta$ 1 und - $\beta$ 1, mittels Luciferase Assay als direkte Zielmoleküle der miR-103 bestätigt. Die Untereinheiten werden jeweils kodiert von den Genen *Cacna1c*, *Cacna2d1* und *Cacnab1*. Allerdings ist nur Cav1,2- $\alpha$ 1 spezifisch für den untersuchten Kalziumkanal, während die anderen

## Einleitung

beiden Untereinheiten auch bei anderen spannungsabhängigen Kalziumkanälen zu finden sind. In Ratten mit experimenteller Neuropathie zeigte sich eine reduzierte Expression der miR-103 sowie eine Hochregulierung der drei Cav1,2-Untereinheiten. Die intrathekale Injektion von miR-103 bewirkte eine geringere Expression von Cav1,2 und eine Reduktion der durch SNL hervorgerufenen neuropathischen Schmerzen.

### 1.5 Zielsetzung und Hypothese

Die Prävalenz der PNP wird in einer epidemiologischen Studie von Hanewinkel et al. (2016) auf 5 - 8% geschätzt. Etwa die Hälfte der Patienten leiden an neuropathischen Schmerzen. In den vielen bereits dargestellten Studien spiegelt sich die wachsende Bedeutung von miRNAs im Zusammenhang mit Neuropathie, neuropathischen Schmerzen sowie mit Nervende- und -regenerationsprozessen wider. Bisher beschränkt sich ein Großteil der Veröffentlichungen auf die Forschung an Tiermodellen.

Das Ziel dieser Studie war es, miRNA-Genexpressionsprofile bei PNP-Patienten zu charakterisieren. Dafür wurden die miR-let-7 sowie die miR-103 als vielversprechende Beispiele ausgewählt. Wie Favereaux et al. (2011) untersuchten wir bei letzterer die Unterform miR-103a. Außerdem wurde die Expression von Cacna1c, einem Zielgen der miR-103a, das für die  $\alpha$ 1-Untereinheit des Kalziumkanals Cav1,2 kodiert, gemessen.

Die Hypothesen lauteten:

1. Die Genexpression der untersuchten miRNAs bei PNP-Patienten unterscheidet sich von der Expression bei gesunden Kontrollprobanden.
2. Die Expression von Cacna1c korreliert invers mit der Expression der miR-103a und zeigt einen Unterschied zwischen Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP.
3. Es bestehen unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile zwischen den PNP-Subgruppen, die als Biomarker genutzt werden könnten.

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

### **2.1 Patientenkohorte**

Die untersuchte Patientenkohorte setzte sich aus 116 Patienten zusammen, die im Rahmen ihres stationären Aufenthaltes zwischen Februar 2015 und November 2016 an der Neurologischen Universitätsklinik rekrutiert wurden. Alle Studienteilnehmer erteilten nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Würzburg befürwortete die Studie (AZ 52/14).

Im Rahmen der diagnostischen Abklärung wurden bei jedem Patienten eine ausführliche Anamnese, klinisch-neurologische Untersuchung, elektrophysiologische Messungen, Blutuntersuchungen und eine Liquorpunktion durchgeführt. Außerdem wurden standardisierte Untersuchungsscores erhoben und die Patienten füllten Fragebögen zu Schmerzen und Depression aus. Falls trotz dieser Diagnostik die Ätiologie der PNP nicht geklärt werden konnte, erfolgte eine Biopsie des N. suralis und/oder eine Hautstanzbiopsie.

### **2.2 Kontrollkohorte**

Die Kontrollkohorte bestand aus 22 Freiwilligen, die sich aus Patienten der Neurologischen Universitätsklinik und aus Patientenangehörigen zusammensetzen. Alle Kontrollprobanden unterzogen sich einer Blutentnahme und einige von ihnen auch einer Hautstanzbiopsie. Anamnese, klinisch-neurologische Untersuchung, elektrophysiologische Messung des N. suralis und N. tibialis, inklusive F-Welle, und QST dienten zum Ausschluss einer PNP. Weitere Ausschlusskriterien waren ein Diabetes mellitus, Alkoholabusus, eine maligne Erkrankung oder aktuelle Chemotherapie, rheumatische Erkrankungen, pathologische Schilddrüsenwerte und chronische Schmerzkrankungen.

Die Probanden wurden nur bei unauffälliger Anamnese, Untersuchung und elektrophysiologischer Messergebnisse in die Studie eingeschlossen.

### **2.3 Einteilung der Patientenkohorte**

Um bezüglich der miRNA-Daten Vergleiche innerhalb der Patientenkohorte ziehen zu können, wurde diese in Subgruppen unterteilt. Die Unterteilung

erfolgte in schmerzhaft und nicht-schmerzhaft PNP, in entzündliche und nicht-entzündliche PNP und in axonale und demyelinisierende PNP. Außerdem wurde eine Aufteilung nach der Ätiologie der PNP vorgenommen.

### 2.3.1 Einteilung nach Schmerz, Entzündung und Schädigungsmuster

Die Einteilung in schmerzhaft und nicht-schmerzhaft PNP erfolgte anhand des GCPS-Fragebogens (siehe 2.4). Eine PNP wurde als schmerzhaft gewertet, wenn der Patient bei der Frage nach dem aktuellen Schmerz oder bei der Frage nach dem maximalen Schmerz innerhalb der letzten vier Wochen mindestens 3 von 10 Punkten auf der numerischen Ratingskala (NRS) angab.

Die Gruppe der entzündlichen PNP setzte sich zusammen aus Patienten mit vaskulitischer PNP, CIDP, GBS, progressiver idiopathischer axonaler PNP (PIAN), paraproteinämischer PNP und Patienten mit unklarer Ätiologie, bei denen Hinweise auf eine entzündliche Genese der PNP zu finden waren, wie erhöhte Entzündungsparameter, Zellzahl- oder Eiweißerhöhung im Liquor oder Entzündungszellen in der Haut- und Nervenbiopsie.

Die Einordnung nach dem Schädigungsmuster wurde mithilfe der Elektroneurographie sowie histologisch vorgenommen. Bei rein axonalem oder demyelinisierendem Schädigungsmuster in der Elektroneurographie und der Nervenbiopsie wurde der Patient in die Gruppe der axonalen bzw. demyelinisierenden PNP eingeordnet. Wenn sich Elektroneurographie und Histologie nicht deckten, wurde ein Mischbild diagnostiziert.

### 2.3.2 Einteilung nach Ätiologie

Folgende ätiologische Subgruppen wurden unterschieden:

- Diabetische PNP: Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus und typischen klinischen, elektrophysiologischen und laborchemischen Merkmalen wurden in diese Gruppe eingeteilt.
- CIDP: Anhand der Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group (INCAT)-Kriterien wurden Patienten mit CIDP diagnostiziert.
- GBS: Die Diagnose eines GBS wurde anhand aktueller Leitlinien gestellt (Joint Task Force, 2010a).

- Vaskulitische PNP: In diese Gruppe wurden Patienten mit systemischer vaskulitischer PNP und nicht-systemischer vaskulitischer Neuropathie (NSVN) eingeordnet (Collins et al., 2010).
- Hereditäre PNP: Im Falle einer nachgewiesenen Genmutation oder bei positiver Familienanamnese kombiniert mit einem typischen klinischen Befund (z.B. Hohlfüße, Krallenzehen) wurde eine hereditäre PNP diagnostiziert.
- PIAN: Die Einteilung in diese Gruppe erfolgte bei akut auftretenden sensiblen und motorischen Symptomen und axonalem Schädigungsmuster in der Elektrophysiologie. Histologisch zeigten sich typischerweise Entzündungszellen und ebenfalls ein axonaler Schaden. Außerdem wurde eine Besserung nach Kortikosteroidbehandlung zur Diagnosestellung mit herangezogen (Vrancken et al., 2004).
- Chronische idiopathische axonale PNP (CIAP): Im Gegensatz zu der PIAN fand sich bei den Patienten mit CIAP ein langsamerer Verlauf und es zeigten sich histologisch keine Hinweise auf eine Entzündung. Wie bei der PIAN ist auch für die CIAP ein axonales Schädigungsmuster in der Elektrophysiologie und Nervenbiopsie typisch (Zis et al., 2016).
- Paraproteinämische PNP: Bei Nachweis von IgM-Paraprotein mit oder ohne zusätzlichen anti-MAG-Antikörpern wurde eine paraproteinämische PNP diagnostiziert (Joint Task Force, 2010b).
- Toxische PNP: Patienten mit axonal betonter Neuropathie und Alkoholabusus oder Chemotherapie in der Vorgeschichte bildeten die Gruppe „Toxische PNP“.
- „Unklar“: Falls bei einem Patienten trotz umfangreicher Diagnostik die Ätiologie der PNP nicht geklärt werden konnte, wurde er der Gruppe „Unklar“ zugeordnet.
- „Sonstige“: Alle Diagnosen mit  $n \leq 2$  wurden in der Gruppe „Sonstige PNP“ zusammengefasst.

### 2.4 Fragebögen zu Schmerzen und Depression

#### 2.4.1 Neuropathic Pain System Inventory (NPSI)

Da Neuropathische Schmerzen sehr heterogen und schwer zu objektivieren sind, wurde der NPSI verwendet, um unterschiedliche Dimensionen und Qualitäten von Schmerz erfassen und besser vergleichen zu können. In diesem Fragebogen bewertet der Patient verschiedene Schmerzqualitäten und Missempfindungen auf einer Skala von 0 („kein Schmerz“) bis 10 („maximal vorstellbarer Schmerz“). Abschließend werden ein Summenwert und für die Kategorien Brennen, Druck, Attackenartiger Schmerz, Evozierter Schmerz und Par-/Dysästhesie jeweils Punktwerte von 0 bis 1 berechnet. Dazu wird für jede Kategorie der Durchschnitt aus den Punkten, die der Patient jeweils für die Fragen dieser Kategorie vergeben hat, errechnet und durch zehn geteilt (Bouhassira et al., 2004; Sommer et al., 2011)

#### 2.4.2 Graded Chronic Pain Scale (GCPS)

Um die Beeinträchtigung der Patienten durch ihre Schmerzen einzuschätzen, wurde die GCPS verwendet. Jeweils auf einer Skala von 0 bis 10 beurteilen die Patienten hierbei einerseits die Schmerzintensität (aktuell, maximal, im Durchschnitt) und andererseits die durch Schmerzen verursachte subjektive Beeinträchtigung ihrer Arbeitsfähigkeit und ihrer Alltags- und Freizeitaktivitäten in den letzten vier Wochen. Hieraus werden ein Punktwert für die Intensität und einer für die Behinderung berechnet, jeweils mit einem Minimum von 0 („kein Schmerz“ / „keine Beeinträchtigung“) und einem Maximum von 100 („stärkster vorstellbarer Schmerz“ / „keine Aktivität mehr möglich“) (Von Korff et al., 2005).

#### 2.4.3 Allgemeine Depressionsskala (ADS)

Da Patienten mit PNP zu depressiven Symptomen neigen (D'Amato et al., 2016; Merkies & Kieseier, 2016), wurde die ADS eingesetzt, um eine Risikoeinschätzung bezüglich einer Depressionserkrankung vornehmen zu können. Der Fragebogen besteht aus 20 Aussagen zu häufigen Depressionssymptomen, wie Niedergeschlagenheit, Antriebslosigkeit, Schlafstörungen, Konzentrationsschwierigkeiten, Verunsicherung und Angst, denen die Patienten

die Zeitangaben „selten“ (0 Punkte), „manchmal“ (1 Punkt), „öfters“ (2 Punkte) oder „meistens“ (3 Punkte) zuordnen. Die Punkte werden addiert, wobei die maximal mögliche Punktzahl 60 beträgt. Ab einem Gesamtwert von 23 Punkten besteht definitionsgemäß eine klinisch relevante, abklärungsbedürftige depressive Symptomatik (Hautzinger et al., 2012).

## 2.5 Standardisierte Untersuchungsscores

### 2.5.1 Overall Disability Sum Score (ODSS)

Der ODSS ist ein standardisierter Untersuchungsscore zur Einschätzung des Behinderungsgrades bei Patienten mit Immunneuropathie. Für die oberen Extremitäten werden zwischen 0 und 5 Punkte, für die unteren Extremitäten zwischen 0 und 7 Punkte vergeben und die beiden Werte addiert. So wird eine Punktzahl von minimal 0 (keine Behinderung) und maximal 12 Punkten (schwerste Behinderung) erreicht (Merkies et al., 2002).

### 2.5.2 Modifizierter Toronto Clinical Neuropathy Score (mTCNS)

Der TCNS wurde zur Quantifizierung sensibler Symptome und Defizite bei Patienten mit diabetischer PNP entwickelt (Bril & Perkins, 2002). In der vorliegenden Studie wurde eine modifizierte Version des Fragebogens verwendet. Jeder Untersuchungsbefund (Spitz-/Stumpfdiskrimination, Temperaturempfinden, Oberflächensensibilität, Vibrationsempfinden, Lagesinn) sowie jedes Symptom (Fußschmerzen, Taubheitsgefühl, Kribbeln, Muskelschwäche, Ataxie, Symptome in den Armen) wurde dabei auf einer Skala von 0 bis 3 bewertet. Dabei ergab sich insgesamt eine mögliche Punktzahl von 0 (keine Symptome vorhanden) bis 33 (starke Symptome, die sowohl das Wohlbefinden als auch die Alltagsaktivitäten einschränken). In der ursprünglichen Version des Scores wurden für Befunde und Symptome jeweils nur ein Punktwert von 0 (Befund negativ, bzw. Symptom nicht vorhanden) oder 1 (Befund positiv, bzw. Symptom vorhanden) vergeben. Außerdem wurde bei der modifizierten im Gegensatz zur ursprünglichen Version des Scores der Reflexstatus nicht mitberücksichtigt.

### 2.5.3 Modifizierter Medical Research Council-Score (mMRC)

Um das Ausmaß der paresebedingten Bewegungseinschränkung der Patienten zu erfassen, wurde bei jedem Patienten eine modifizierte Version des MRC-Scores erhoben (Merkies et al., 2003). Dabei wurden die folgenden Muskeln nach den MRC-Kraftgraden von 0 (komplette Lähmung) bis 5 (volle Kraft) auf beiden Seiten beurteilt: Schulterabduktoren, Armbeuger, Armstrecker, Handstrecker, Fingerstrecker, Fingerspreizer, Hüftbeuger, Kniestrecker, Fußheber, Fußsenker, Großzehenheber und Großzehensenker. Von den ermittelten Kraftgraden wurden jeweils die der stärker betroffenen Seite addiert. Somit ergab sich eine mögliche Gesamtpunktzahl von 0 bis 60. Im Gegensatz zu der ursprünglichen Version des Scores wurden die Hand- und Fußmuskeln berücksichtigt, dafür gingen alle untersuchten Muskeln nur einseitig in den Score ein.

### 2.6 Elektroneurographische Untersuchung

Es wurden jeweils der N. suralis, der N. tibialis und je nach klinischer Beteiligung weitere Nerven, z.B. N. medianus, N. ulnaris und N. peroneus, untersucht. Laborintern gilt bei rein sensiblen Nerven, wie dem N. suralis, eine Amplitude des Summenaktionspotenzials von  $\geq 10 \mu\text{V}$  (Ausnahme: ab 65 Jahren  $\geq 5 \mu\text{V}$ ) und bei motorischen Nerven eine Amplitude von  $\geq 10 \mu\text{V}$  (Ausnahme: N. peroneus  $\geq 5 \mu\text{V}$ ) als unauffällig. Die NLG sollte mindestens bei 40 m/s liegen, um als normwertig zu gelten.

### 2.7 Blut- und Liquoruntersuchungen

Zur Diagnosestellung und Klassifizierung der PNP wurden einige Blut- und Liquoruntersuchungen durchgeführt. Es wurden ein kleines Blutbild, Differentialblutbild, C-reaktives Protein, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Nieren- und Leberwerte, HbA1c und Schilddrüsenwerte (TSH) bestimmt. Weiterhin wurde zum Ausschluss einer pathologischen Glukosetoleranz bei einigen Patienten ein oraler Glukosetoleranztest (OGTT) durchgeführt. Bei Verdacht auf eine Autoimmunerkrankung wurden Rheumafaktor, anti-nukleäre Antikörper (ANA) und anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) bestimmt. Zum Ausschluss einer monoklonalen Gammopathie diente eine Serumeiweiß-

elektrophorese. Außerdem erfolgte bei Hinweisen auf eine hereditäre PNP eine molekulargenetische Untersuchung.

Im Liquor wurden Zellzahl, Glukose, Laktat und Protein bestimmt. Weiterhin wurde er auf oligoklonale Banden untersucht.

## 2.8 Blutabnahme und -asservierung

Die Blutabnahme für die Genexpressionsanalyse erfolgte zwischen 7 und 9 Uhr morgens, um zirkadiane Schwankungen der gemessenen miRNAs und Proteine auszuschließen. Patienten und Probanden blieben 12 Stunden vor der Blutentnahme nüchtern.

Es wurden zwei Serummonovetten à 4,7 mL und zwei EDTA-Monovetten à 9 mL entnommen und anschließend 30 Minuten lang auf Eis aufrecht stehen gelassen. Die zwei Serummonovetten und eine von den EDTA-Monovetten wurden 10 Minuten lang bei 1200 RCF und 20°C zentrifugiert, um Serum und Plasma zu erhalten. Der Überstand wurde jeweils in 0,5 mL Tubes aliquotiert und bei -80°C gelagert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Um weiße Blutzellen (White Blood Cells = WBC) zu isolieren, wurden 7,5 mL Erythrozytenlysepuffer (EL Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland) in fünf 15 mL Falcon-Tubes gegeben. Dazu wurden jeweils 1,5 mL Blut aus der verbleibenden EDTA-Monovette pipettiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 25 Minuten, wobei jedes Falcon-Tube zweimal zwischendurch gevortext wurde. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten (4°C, 400 RCF). Der Überstand wurde abgeschüttet und das Sediment in 3 mL EL Puffer resuspendiert. Der oben genannte Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand abpipettiert. In einem Falcon-Tube, dessen Inhalt zum Zählen der isolierten WBC verwendet wurde, erfolgte die Resuspension in 1 mL Lymphoprep TM (Fresenius SE & Co. KgaA, Bad Homburg, Deutschland). 10 µL von dem Zellgemisch wurden mit 10 µL Trypanblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in einem Mischfeld gemischt und hiervon wiederum 10 µL in eine Neubauer improved Zählkammer (A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland) gegeben. Die Zellen wurden unter einem Mikroskop (Olympus CKX41, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg,

Deutschland) gezählt und die Zellzahl in  $x \text{ mal } 10^6$  pro mL angegeben. Der Inhalt der weiteren vier Falcon-Tubes wurde resuspendiert in 0,5 mL RNAprotect cell reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) und jeweils in ein 0,5 mL Tube gegeben. Die Proben wurden anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.9 Hautstanzbiopsie

Die Hautstanzbiopsien wurden am Unterschenkel 10 cm proximal des Malleolus lateralis, am Oberschenkel 20 cm distal des Trochanter major und an der radialen Seite des Zeigefingers zwischen Grundgelenk und proximalen Interphalangealgelenk entnommen.

Vor der Biopsie wurde eine viermalige Desinfektion durchgeführt, dreimal gefolgt von Trockenwischen durch einen sterilen Tupfer, beim letzten Mal von 30 Sekunden Einwirkzeit. Die Biopsiestelle wurde mit Scandicain 1% betäubt. Alle weiteren Schritte wurden mit sterilen Einmalhandschuhen durchgeführt. Biopsiert wurde am Unterschenkel und Oberschenkel mit einer sterilen 5 mm Einmal-Biopsiestanze (Fa. Stiefel, Offenbach am Main, Deutschland). Am Zeigefinger wurden 3 mm entnommen. Die Biopsiestellen wurden mit Sterilen Heftpflastern (Smith&Nephew, London, England) und Pflastern versorgt.

Das Biopsat wurde mit Pinzette und Skalpell abgehoben und in zwei Teile geteilt. Hiervon wurde einer über Nacht in RNA Later gelagert und am nächsten Tag nach dem Abpipettieren des RNA Later bis zur weiteren Verarbeitung bei der RNA-Extraktion bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Der andere Teil wurde in 4% PFA Lösung gegeben und für 30 Minuten in Phosphatpuffer fixiert. Zur Vorbereitung auf die immunhistochemischen Färbungen erfolgte anschließend eine dreimalige Waschung mit 0,1 M Phosphatpuffer, jeweils für 10 Minuten. Über Nacht wurde die Biopsie bis zur weiteren Verarbeitung in 10% Saccharose bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

Um die intraepidermalen Nervenfasern sichtbar zu machen, wurde eine Färbung mit einem Antikörper gegen das protein gene product 9.5 (PGP 9.5) durchgeführt, das in allen Axonen exprimiert wird (Koskinen et al., 2005).

## 2.10 Biopsie des N. suralis

Die Nervenbiopsie wurde oberhalb des Malleolus lateralis von Neurochirurgen der Uniklinik Würzburg nach einem standardisierten Verfahren durchgeführt (Üçeyler et al., 2015). Die Hälfte der Biopsie, die später für die Genexpressionsanalyse verwendet wurde, wurde über Nacht in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Der RNA Later wurde am nächsten Morgen abpipettiert und das Nervenstück bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren. Die andere Hälfte der Biopsie wurde in 4% PFA-Lösung gegeben und für die histologische Routinediagnostik aufgearbeitet.

## 2.11 RNA-Extraktion

Für die Extraktion von RNA und miRNA aus WBC, Haut und Nerv wurde das miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die ersten Schritte der RNA-Isolation wurden auf Eis durchgeführt. Zu Beginn wurde das jeweilige Material mit 700 µL Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und das Gemisch homogenisiert. Die Suspension aus RNAlater cell reagent und WBC wurde vorher aufgetaut.

Die Homogenisierung erfolgte im Falle der WBC mit einer Pipette, bei Haut und Nerv hingegen mit einem Dispergierstab (MICCRA GmbH, Müllheim, Deutschland). Dieser wurde vor Verwendung für die nächste Probe jeweils mit DEPC-Wasser gereinigt.

Anschließend folgte ein Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Um die Zellen in dem jeweiligen Gewebe zu lysieren, wurden 140 µL Chloroform hinzugegeben, die Proben wurden 15 Sekunden lang geschüttelt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben durch einen Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 12.000 RCF, 4°C) in eine wässrige und eine organische Phase aufgeteilt.

Die weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Da sich die RNA in der wässrigen Phase ansammelt, wurde die oben schwimmende wässrige Phase in ein anderes Reaktionsgefäß transferiert, in das vorher 525 µL 100% Ethanol vorgelegt wurden. Gemischt wurde durch Auf- und

Abpipettieren. 700  $\mu$ L von jeder Probe wurde auf eine Trennsäule gegeben und die Säule zentrifugiert (8.000 RCF, 20 sec, 18°C). Die Flüssigkeit im Auffanggefäß wurde nach diesem wie nach allen folgenden Zentrifugations-schritten verworfen. Der Rest der Probe wurde auf die Trennsäule pipettiert und der oben genannte Zentrifugationsschritt wiederholt.

Im Anschluss wurden 700  $\mu$ L RWT Puffer auf die Trennsäule gegeben und zentrifugiert (8.000 RCF, 20 sec, 18°C). Danach wurden 500  $\mu$ L RPE Puffer auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (8.000 RCF, 20 sec, 18°C). Im letzten Waschschrift wurden 500  $\mu$ L 80% Ethanol hinzugefügt und die Trennsäule zentrifugiert (8.000 RCF, 2 min, 18°C). Anschließend wurde das Auffanggefäß durch ein frisches ersetzt und die Trennsäule zum Trocknen der Membran mit offenem Deckel zentrifugiert (18.000 RCF, 5 min, 18°C). Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Säule auf ein 2 mL Safe-Lock Tube gesetzt. 14  $\mu$ L RNase-freies Wasser wurden auf die Membran der Trennsäule gegeben und zentrifugiert (18.000 RCF, 1 min, 18°C), um die RNA zu eluieren. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.12 Reverse Transkriptions-PCR

Im nächsten Schritt erfolgte die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus der isolierten RNA. Für die miRNA-PCR wurde ein Verfahren der Firma Exiqon angewendet. Das Zielmolekül der miR-103a, der Kalziumkanal *Cacna1c*, wurde mithilfe von Reagenzien der Firma TaqMan untersucht.

#### 2.12.1 Reverse Transkriptions-PCR (Exiqon)

Die cDNA-Synthese aus der aus Blut, Haut und Nerv extrahierten RNA für die miRNA-PCR erfolgte mit dem Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon A/S, Vedbaek, Dänemark). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Mithilfe des NanoDrop One Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) wurde die RNA-Konzentration gemessen und anschließend 5 ng/dl Verdünnungen hergestellt. Es wurde ein Premix hergestellt mit der folgenden Zusammensetzung pro Probe:

- 2  $\mu$ L Reaktionspuffer

- 5 µL Nuklease-freies Wasser
- 1 µL Enzym Mix

8 µL Mastermix und 2 µL von der verdünnten RNA wurden zusammenpipettiert, gevortext und abzentrifugiert. Die Reverse Transkription erfolgte in dem PCR Thermocycler primus 96 advanced (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) nach in Tabelle 2 stehendem Ablauf:

Zeit	Temperatur
60 Minuten	42°C
5 Minuten	95°C
∞	4°C

**Tabelle 2: Cyclor-Einstellung für reverse Transkription-PCR (miRNA-Genexpressionsanalyse)**

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung für die qPCR bei -20°C gelagert.

### 2.12.2 Reverse Transkriptions-PCR (TaqMan)

Um die cDNA für die qPCR von *Cacna1c* herzustellen, wurden Reagenzien von TaqMan (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden 250 ng von der RNA aus WBC eingesetzt und 500 ng von der RNA aus Gewebe (Haut und Nerv). Die abweichende Menge an Gewebe-RNA wurde gewählt, da die Qualität der RNA aus Gewebe erfahrungsgemäß geringer ist als die aus Zellen. Dem entsprechenden Probenvolumen wurde destilliertes Wasser zugefügt, sodass im Falle der WBC ein Endvolumen von 32,8 µL und im Falle von Gewebe eines von 34,75 µL erreicht wurde. Die folgenden Schritte wurden nur bei WBC-RNA durchgeführt: Es wurden 5 µL Random Hexamers hinzupipettiert, die Proben 3 Minuten lang bei 85°C inkubiert und 2 µL Oligo-DT zugegeben. Am Ende wurde der in Tabelle 3 beschriebene Premix hinzugefügt:

	Zellen (pro Probe)	Gewebe (pro Probe)
<b>10x Buffer</b>	10 µL	10 µL
<b>MgCl<sup>2</sup> 25mM</b>	22 µL	22 µL
<b>dNTP 10mM</b>	20 µL	20 µL
<b>Random Hexamers</b>	-	5 µL
<b>RNase Inhibitor</b>	2 µL	2 µL
<b>MultiScribe</b>	6,25 µL	6,25 µL

**Tabelle 3: Reagenzien für die reverse Transkriptions-PCR (Cacna1c-Genexpressionsanalyse)**

Abkürzungen: MgCl<sup>2</sup>= Magnesiumchlorid, dNTP= Desoxynucleotidtriphosphate, PCR = Polymerase-Kettenreaktion

Die Reverse Transkriptions-PCR erfolgte in einem Thermocycler primus 96 advanced. Tabelle 4 gibt die verwendeten Cyclerprogramme an:

	Temperatur Zellen	Temperatur Gewebe	Dauer
<b>Annealing</b>	25°C	25°C	10 Minuten
<b>Reverse Transkription</b>	48°C	37°C	60 Minuten
<b>Enzymaktivierung</b>	95°C	95°C	5 Minuten

**Tabelle 4: Cycler-Einstellung für die reverse Transkriptions-PCR (Cacna1c-Genexpressionsanalyse)**

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung für die qPCR bei -20°C gelagert.

### 2.13 Quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung und Quantifizierung von RNA. Dabei erfolgt die Amplifizierung der Genfragmente und eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit. Die Anzahl der nötigen PCR-Zyklen, um ein überschwelliges Fluoreszenzsignal zu erhalten, wird als Ct-Wert bezeichnet. Somit ist dieser umgekehrt proportional zur Zielgenexpression, das heißt je höher die Genexpression, desto niedriger ist der Ct-Wert.

Für jedes Zielgen wurde ein spezifischer Kalibrator ermittelt und bei jedem Lauf mitgemessen, auf den alle Messergebnisse bezogen wurden. Für die Kalibratorbestimmung wurde bei allen Proben der Kontrollprobanden die Expression des Zielgens gemessen und der Mittelwert aus den Ct-Werten

ermittelt. Als Kalibrator wurde die Probe verwendet, die am nächsten am Mittelwert lag. Der Kalibrator durfte nicht um mehr als einen Ct-Wert von den Kalibratorwerten der anderen Läufe abweichen, damit der jeweilige Lauf in die Berechnung mit aufgenommen werden konnte. Um die Vergleichbarkeit der Läufe zu gewährleisten, wurde außerdem auf jeder Platte noch eine Probe von aus Blut isolierten WBC eines Probanden mitgemessen, die ebenfalls höchstens um einen Ct-Wert schwanken durfte. Für die Normierung der Messergebnisse untereinander, also um Schwankungen z.B. durch Pipettierfehler auszugleichen, wurde als Haushaltsgen die 5sRNA für die miRNA-PCR und die 18sRNA für die Cacna1c-PCR verwendet.

#### 2.13.1 qRT-PCR (Exiqon)

Die Quantifizierung der miRNA erfolgte durch die miCURY LNA™ Universal microRNA PCR (Exiqon A/S, Vedbaek, Dänemark).

Zunächst wurden die cDNA-Proben aufgetaut, gevortext, zentrifugiert und jeweils eine 1:80 Verdünnung hergestellt (79 µL Nuklease-freies Wasser, 1 µL cDNA). Diese wurde abermals gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für die miRNA und das Haushaltsgen hergestellt. Jeder Reaktionsansatz beinhaltete:

- 5 µL ExiLENT SYBR® Green master mix
- 1 µL Primer
- 1 µL ROX auf 50 µL Mastermix

Von jedem Reaktionsansatz wurden jeweils 6 µL pro Probe in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Dazu wurden jeweils 4 µL Probe pipettiert. Das Zielgen wurde als Triplet und das Haushaltsgen sowie die Kontrollprobe als Duplett gemessen. Um eine Verunreinigung der Reaktionsansätze auszuschließen, wurde außerdem eine Leerprobe gemessen, bei der statt der Probe 4 µL Nuklease-freies Wasser zu dem jeweiligen Reaktionsansatz hinzugegeben wurden. Die Platten wurden mittels Verschlussfolien versiegelt und kurz zentrifugiert (1min, 20°C, 1200 RCF), bevor sie in den real-time-PCR-Cycler (StepOnePlus, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gegeben wurden. Tabelle 5 gibt die Cycler-Einstellungen für die Amplifikation wieder:

	Temperatur	Dauer
<b>Denaturierung</b>	95°C	10 min
<b>40 Amplifikationszyklen:</b>		
<b>Denaturierung</b>	95°C	15 sec
<b>Extension</b>	60°C	1 min

Tabelle 5: Cyclor-Einstellung für die qRT-PCR (miRNA-Genexpressionsanalyse)

### 2.13.2 qRT-PCR (TaqMan)

Für die Cacna1c-Genexpressionsanalyse wurden TaqMan-Reagenzien von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Zu Beginn wurden die cDNA-Proben aufgetaut und vor Verwendung gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Reaktionsansätze für das Ziel- und das Haushaltsgen, in diesem Fall die 18sRNA. Tabelle 6 beschreibt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze:

	Reaktionsansatz für Zielgen	Reaktionsansatz für 18s
<b>Nuklease-freies Wasser</b>	1,75 µL	4,25 µL
<b>Mastermix</b>	2 µL	2 µL
<b>Primer</b>	0,25 µL	0,25 µL
<b>Volumen pro Well</b>	4 µL	6,5 µL

Tabelle 6: Reagenzien für die Reaktionsansätze für Zielgen und 18sRNA

Die Reaktionsansätze wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit der jeweiligen cDNA Probe auf 9 µL pro Well aufgefüllt. Im Falle des Zielgens entsprach dies 4 µL Reaktionsansatz und 5 µL Probe; im Falle der 18sRNA wurden 6,5 µL Reaktionsansatz und 2,5 µL Probe zusammenpipettiert. Das Zielgen wurde wieder als Triplett und das Haushaltsgen sowie die Kontrollprobe als Duplett gemessen. Wie bei der miRNA-PCR wurde auch hier eine Leerprobe mitgemessen, bei der die Probe durch Nuklease-freies Wasser ersetzt wurde, um eine Verunreinigung der Reaktionsansätze auszuschließen. Die Platte wurde mit einer Verschlussfolie versiegelt und in den Cyclor gegeben. Die verwendeten Cyclor-Einstellungen finden sich in Tabelle 7:

	Temperatur	Dauer
<b>Annealing</b>	50°C	2 min
<b>Denaturierung</b>	95°C	10 min
<b>40 Amplifikationszyklen:</b>		
<b>Denaturierung</b>	95°C	15 sec
<b>Extension</b>	60°C	1 min

Tabelle 7: Cyclers-Einstellung für qRT-PCR (Cacna1c-Genexpressionsanalyse)

### 2.13.3 Auswertung der qRT-PCR-Daten

Die Daten der qRT-PCR wurden mithilfe der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode ausgewertet. Dabei wurde zunächst bei Proben und Kalibrator jeweils der Ct-Wert des Haushaltsgens von dem des Zielgens subtrahiert und anschließend der  $\Delta Ct$ -Wert des Kalibrators von dem der Probe abgezogen. Dies ergab den  $\Delta\Delta Ct$ -Wert.

$$\Delta Ct (Probe/Kalibrator) = Ct Zielgen - Ct Haushaltsgen$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (Probe) - \Delta Ct (Kalibrator)$$

Hohe  $\Delta\Delta Ct$ -Werte zeigten eine höhere Genexpression der Probe im Vergleich zum Kalibrator an. Mithilfe folgender arithmetischer Formel wurde der relative Expressionsunterschied zwischen Patienten und Kontrollen bei Blut- und Hautproben berechnet:

$$\text{Relativer Genexpressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Aufgrund der fehlenden Kontrollgruppe bei den Nervenproben wurde hier der  $\Delta Ct$ -Wert für die Analyse verwendet. Da niedrige  $\Delta Ct$ -Werte hoher Genexpression entsprechen, wurde zur besseren Veranschaulichung die reziproke Darstellung gewählt und die Genexpression in den Nervenproben in  $1/\Delta Ct$  angegeben.

### 2.14 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM SPSS Statistics 24 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Die Daten der Genexpressionsanalyse zeigten im Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung. Daher wurde für ihre Analyse der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test, bzw. der Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei Stichproben, angewendet. Nicht-parametrische

## Patienten, Material und Methoden

Tests beruhen auf der Vergabe von Rängen anstelle der absoluten Werte. Mithilfe des ebenfalls nicht-parametrischen Spearman's-Rho-Tests wurden Korrelationen überprüft. Das Signifikanzniveau für alle Tests wurde auf  $p = 0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Epidemiologische Daten der Patienten- und Kontrollkohorte

Es wurden 116 Patienten in die Studie eingeschlossen, davon 37 Frauen (31,9%) und 79 Männer (68,1%). Der Altersmedian betrug zum Zeitpunkt der Rekrutierung 62,0 (20-83) Jahre und die mediane Krankheitsdauer 4,0 (0,04-20) Jahre. Weder beim medianen Alter noch bei der Krankheitsdauer zeigten sich Unterschiede zwischen Männern und Frauen.

Von den 27 untersuchten Kontrollprobanden mussten fünf aus der Studie ausgeschlossen werden, da ihre IENFD in der Hautbiopsie unter den labor-internen Normwerten lag. Die 22 eingeschlossenen Kontrollprobanden setzen sich aus 13 Frauen (59,1%) und 9 Männern (40,9%) zusammen. Ihr medianes Alter lag bei 53,5 (20-83) Jahren (Frauen: 52,0 (24-63) Jahre; Männer: 62,0 (20-83) Jahre).

#### 3.2 Einteilung der Patientenkohorte

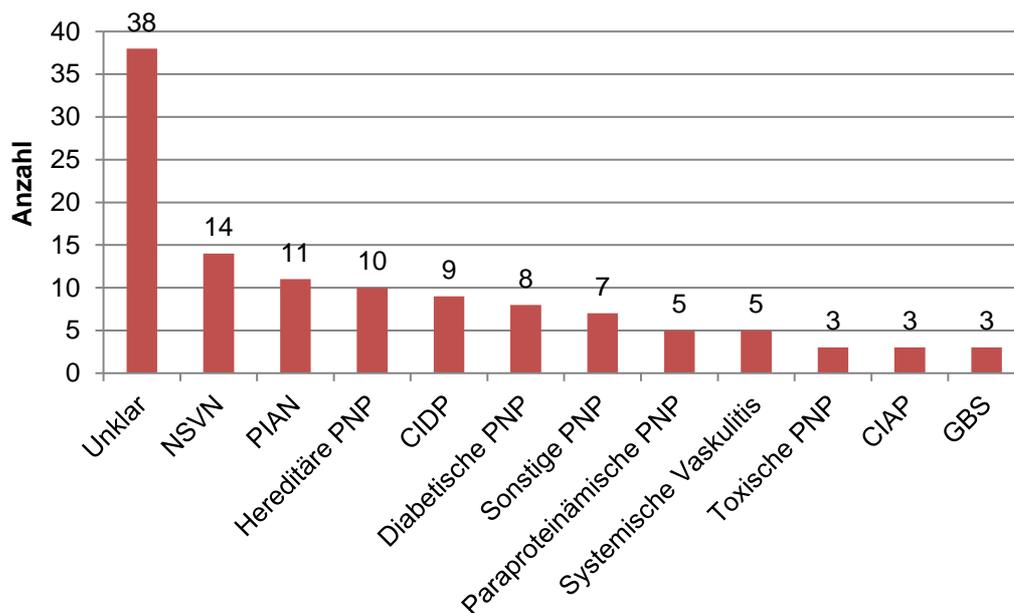
64/116 (55,2%) Patienten wurden in die Gruppe der Patienten mit schmerzhafter und 48/116 (41,4%) in die Gruppe der Patienten mit schmerzloser PNP eingeteilt.

Der Gruppe der Patienten mit entzündlicher PNP wurden 64/116 (44,8%) und derjenigen mit nicht-entzündlicher PNP 52/116 (55,2%) Patienten zugeordnet.

Bei der Aufteilung nach Schädigungsmuster fanden sich 65/116 (56,0%) Patienten mit axonaler PNP, 14/116 (12,1%) Patienten mit demyelinisierender PNP und 37/116 (31,9%) mit einem Mischbild. Diese Einteilung erfolgte anhand histologischer und elektrophysiologischer Kriterien, wie oben ausgeführt (siehe 2.3.1).

Abbildung 2 gibt die Patientenhäufigkeit nach Ätiologie wieder:

## Ergebnisse



**Abbildung 2: Einteilung der Patientenkohorte nach Ätiologie**

Abkürzungen: CIAP = Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie; CIDP = Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; GBS = Guillain-Barré-Syndrom; NSVN = Nicht-systemische vaskulitische Neuropathie; PIAN = Progressive idiopathische axonale Neuropathie, PNP = Polyneuropathie

Für den Vergleich zwischen den klinischen Daten und den Genexpressionsprofilen der diagnostischen Subgruppen wurden nur Subgruppen mit  $n \geq 5$  herangezogen. Außerdem wurde die Gruppe „sonstige PNP“ aufgrund ihrer Heterogenität ebenfalls von diesen Vergleichen ausgeschlossen (siehe 6.3).

### 3.3 Fragebögen

Von den 116 Patienten beantworteten 113 den NPSI und jeweils 112 die GCPS und die ADS. Eine Auflistung der Summenwerte der Fragebögen und Untersuchungsscores im Vergleich zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP, schmerzhaften und schmerzlosen PNP und zwischen Frauen und Männern findet sich im Anhang (siehe 6.4.1).

#### 3.3.1 NPSI

92/113 (81,4%) Patienten gaben Schmerzen oder Parästhesien an. Die meisten Patienten berichteten von Parästhesien oder Druckschmerzen (siehe Tabelle 8). Der Median des NPSI Summenwertes betrug 0,12 (0-0,65). Weder für den Summenwert noch für die einzelnen Schmerzqualitäten ergaben sich Unterschiede zwischen den diagnostischen Subgruppen.

Schmerzqualität	Positive Antworten
Parästhesien	71/113 (63%)
Druck	55/113 (49%)
Attacken	46/113 (41%)
Evozierte Schmerzen	45/113 (40%)
Brennen	40/113 (35%)

**Tabelle 8: Angaben zur Schmerzqualität im NPSI**

Abkürzungen: NPSI = Neuropathic pain symptom inventory

### 3.3.2 GCPS

In der Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP ergab sich bei der aktuellen Schmerzintensität ein Median von 4/10 NRS (0-8/10). Diese Patienten gaben außerdem im Median 8/10 (3-10/10) NRS bei der maximalen und 5/10 (0-8/10) NRS bei der durchschnittlichen Schmerzintensität an. 50/64 (78,1%) Patienten mit schmerzhafter PNP fühlten sich im Alltag durch die Schmerzen eingeschränkt, 51/64 (79,7%) spürten eine Einschränkung in der Freizeit und 49/64 (76,6%) gaben eine Einschränkung ihrer Arbeitsfähigkeit an. Bei Patienten mit schmerzhafter PNP fand sich für die Schmerzen ein Intensitätsscore von 51,7 (20-86,7) und ein Behinderungsscore von 41,7 (0-100).

Der höchste Intensitätsscore lag mit einem Median von 46,7 (0-86,7) bei Patienten mit PNP unklarer Ätiologie vor. Die stärkste Behinderung verspürten Patienten mit CIDP mit einem Median von 80 (0-100). Allerdings ergaben sich auch hier keine Unterschiede zwischen den verschiedenen diagnostischen Subgruppen. Eine Übersicht der GCPS-Fragebogendaten findet sich in Tabelle 9 und Tabelle 10.

	Median (Min.-Max.)	
	Alle Patienten	Schmerzhafte PNP
Aktueller Schmerz	0 (0-8)	4 (0-8)
Maximaler Schmerz	0 (0-10)	8 (3-10)
Durchschnittlicher Schmerz	0 (0-8)	5 (0-8)
Tage ohne übliche Aktivität	0 (0-31)	4,5 (0-31)
Einschränkung Alltag	0 (0-10)	4 (0-10)

## Ergebnisse

Einschränkung Freizeit	0 (0-10)	5 (0-10)
Einschränkung Arbeitsfähigkeit	0 (0-10)	5 (0-10)
Intensitätsscore	0 (0-86,7)	51,67 (20-86,7)
Behinderungsscore	0 (0-100)	41,67 (0-100)

**Tabelle 9: Übersicht der GCPS-Fragebogendaten – Einzelne GCPS-Items in der gesamten Patientenkohorte und bei Patienten mit schmerzhafter PNP**

Abkürzungen: GCPS = Graded chronic pain scale, PNP = Polyneuropathie

	Median (Min.-Max.)	
	Intensitätsscore	Behinderungsscore
Diabetische PNP	26,5 (0-70)	0 (0-66,7)
Toxische PNP	0 (0-73,3)	0 (0-80)
Systemische vaskulitische PNP	0 (0-66,7)	0 (0-80)
NSVN	30 (0-83,3)	0 (0-63,33)
Hereditäre PNP	20 (0-76,7)	15 (0-80)
PIAN	0 (0-33,3)	1,7 (0-63,3)
CIDP	33,3 (0-53,3)	80 (0-100)
Paraproteinämische PNP	0 (0-0)	0 (0-0)
Unklare Ätiologie	46,7 (0-86,7)	25 (0-80)

**Tabelle 10: Übersicht der GCPS-Fragebogendaten – Intensitäts- und Behinderungsscore im Vergleich zwischen den ätiologischen Subgruppen**

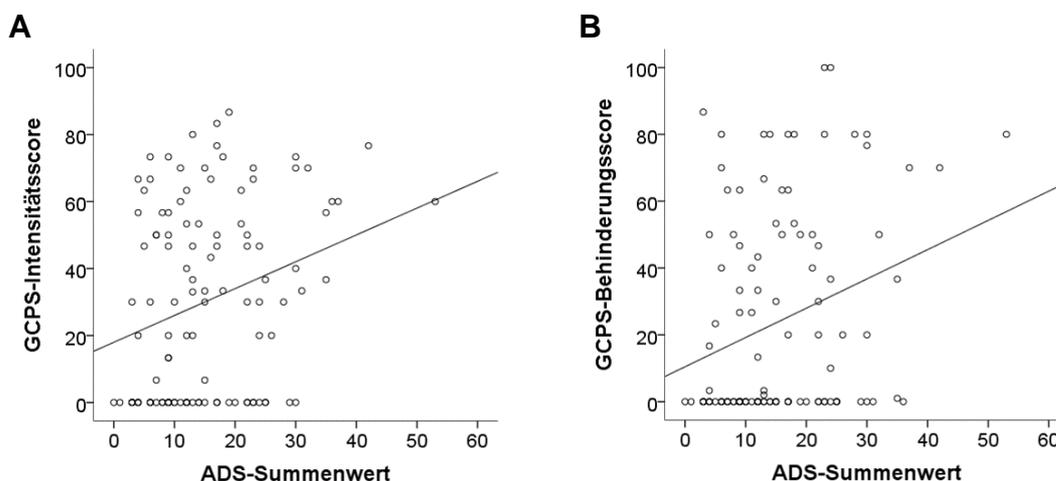
Abkürzungen: CIDP = Chronisch inflammatorische demyelinisierende PNP, GCPS = Graded chronic pain scale, NSVN = Nicht-systemische vaskulitische PNP, PIAN = Progressive idiopathische axonale Neuropathie, PNP = Polyneuropathie

### 3.3.3 ADS

Der ADS-Summenwert der gesamten Patientenkohorte lag bei einem Median von 13 (0-53). Bei 26/112 (23,2%) Patienten fanden sich klinisch relevante und weiter abklärungsbedürftige Symptome. In der Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP zeigte sich mit einem Median von 16 (3-53) ein höherer Wert als bei Patienten mit schmerzloser PNP, bei denen der Median bei 9,5 (0-30) Punkten lag ( $p < 0,01$ ). Der höchste Wert mit einem Median von 24 (3-35) lag bei Patienten mit CIDP vor. Es konnten keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen oder zwischen den diagnostischen Subgruppen festgestellt werden. Korrelationen mit der Krankheitsdauer oder dem Patientenalter ergaben sich ebenfalls nicht.

### 3.3.4 Korrelation zwischen ADS und GCPS

Es zeigte sich eine schwache Korrelation zwischen der ADS und jedem einzelnen Item des GCPS-Fragebogens, inklusive des Intensitäts- und Behinderungsscores (siehe Abbildung 3). Die p-Werte und Korrelationskoeffizienten finden sich im Anhang (siehe 6.4.2).



**Abbildung 3: Korrelation des ADS-Summenwertes mit dem GCPS-Intensitätsscore (A) und dem GCPS-Behinderungsscore (B):** Positive Korrelation des ADS-Summenwertes mit dem GCPS-Intensitätsscore ( $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient = 0,264) und dem GCPS-Behinderungsscore ( $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient = 0,270).

Abkürzungen: ADS = Allgemeine Depressionsskala, GCPS = Graded chronic pain scale

### 3.4 Klinische Untersuchungsscores

Der ODSS konnte bei 114 Patienten und der modifizierte TCNS (mTCNS) bei 110 Patienten ausgewertet werden. Für alle 116 Patienten wurde der modifizierte MRC-Score (mMRC) erhoben. Eine Übersicht über die Mediane und Spannweiten der Untersuchungsscores findet sich in Tabelle 11.

Untersuchungsscore		Median (Min.-Max.)
ODSS	Gesamtscore	3 (0-8)
	Untere Extremitäten	2 (0-7)
	Obere Extremitäten	0 (0-5)
mTCNS	Gesamtscore	15,5 (1-31)
mMRC	Gesamtscore	57 (26-60)
	Untere Extremitäten	28 (3-30)

## Ergebnisse

	Obere Extremitäten	30 (17-30)
--	--------------------	------------

**Tabelle 11: Mediane (Min.-Max.) der Untersuchungsscores**

Abkürzungen: mMRC = modifizierter Medical Research Council Score, mTCNS = modifizierter Toronto Clinical Neuropathy Score, ODSS = Overall Disability Sum Score

Im mMRC-Score zeigten sich die unteren Extremitäten stärker betroffen als die oberen Extremitäten ( $p < 0,001$ ). Bei keinem der drei Untersuchungsscores ergab sich ein Unterschied zwischen den diagnostischen Subgruppen.

Im Anhang findet sich eine Tabelle mit weiteren Werten zum TCNS-Score (siehe 6.4.3).

### 3.5 Elektroneurographische Messergebnisse

Bei 18/22 (81,8%) Kontrollen wurde der N. suralis elektroneurographisch untersucht. Bei 15/22 (68,2%) wurde zusätzlich der N. tibialis analysiert. Der N. suralis wurde bei 108/116 (93,1%) Patienten untersucht. Da bei 37 Patienten keine Reizantwort ausgelöst werden konnte, gingen 71 Messungen in die nachfolgende Auswertung ein. Bei 111/116 (95,7%) Patienten wurde der N. tibialis gemessen. Hier zeigte sich bei 17 Patienten keine Reizantwort. Es fand sich erwartungsgemäß eine geringere NLG bei Patienten mit demyelinisierender PNP als bei Patienten mit axonaler PNP für den N. suralis ( $p < 0,05$ ), und für den N. tibialis ( $p < 0,001$ ). Für die Amplituden der Summenaktionspotenziale ergaben sich keine Unterschiede. Die Messwerte des N. suralis und N. tibialis sind im Anhang zu finden (siehe 6.4.4).

Außerdem wurden der N. medianus, N. ulnaris und N. peroneus in der Patientenkohorte untersucht. Auch hier zeigte sich bei Patienten mit demyelinisierender PNP definitionsgemäß eine geringere NLG als bei Patienten mit axonaler PNP für den N. medianus ( $p < 0,01$ ) und für den N. peroneus ( $p < 0,001$ ). Für die Amplituden der Summenaktionspotenziale ergaben sich keine Unterschiede. Im Anhang sind die elektroneurographischen Daten des N. medianus, N. ulnaris und N. peroneus zusammengefasst (siehe 6.4.5).

### 3.6 Liquoranalyse

Eine Lumbalpunktion wurde bei 81 Patienten durchgeführt. Die Zellzahl betrug im Median 1 (0-23) und das Liquoreiweiß 44,8 mg/dl (17,8-741,3 mg/dl). Sowohl

für Zellzahl als auch für Liquoreiweiß zeigten sich höhere Werte in der Gruppe der Patienten mit entzündlicher PNP als bei Patienten mit nicht-entzündlicher PNP ( $p < 0,05$ ). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den diagnostischen Subgruppen.

Tabelle 12 fasst die Daten der Liquoranalyse zusammen:

		<b>Gesamt</b>	<b>Nicht-entzündliche PNP</b>	<b>Entzündliche PNP</b>
<b>Zellzahl</b>	Median (Min.-Max.)	1 (0-23)	1 (0-4)	2 (0-23)
	Anteil der Fälle mit Pleozytose (>3 Zellen)	11/81 (13,6%)	1/39 (2,6%)	10/42 (23,8%)
<b>Protein (mg/dl)</b>	Median (Min.-Max.)	44,8 (17,8-741,3)	40,3 (21,0-113,0)	48,3 (17,8-741,3)
	Anteil der Fälle mit Schrankenstörung (>40 mg/dl)	49/81 (60,5%)	20/39 (51,3%)	29/42 (69,0%)

**Tabelle 12: Zellzahl und Protein im Liquor von Patienten**

Abkürzungen: PNP = Polyneuropathie

### 3.7 Therapie der PNP

47/116 (40,5%) Patienten erhielten im Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Studieneinschluss eine immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie. Zur Zeit des Studieneinschlusses wurden 34/116 (27,6%) Patienten immunsuppressiv bzw. immunmodulatorisch und 48/116 (41,4%) Patienten symptomatisch behandelt. Die eingesetzten Medikamente sind den folgenden Tabellen (Tabelle 13 und Tabelle 14) zu entnehmen:

	<b>Gesamte Patientenkohorte</b>	<b>Entzündliche PNP</b>
Glukokortikoide	13/116 (11,2%)	12/64 (18,8%)

## Ergebnisse

Plasmapherese	5/116 (4,3%)	5/64 (7,8%)
IVIG	5/116 (4,3%)	4/64 (6,3%)
Azathioprin	4/116 (3,4%)	4/64 (6,3%)
Cyclophosphamid	3/116 (2,6%)	3/64 (4,7%)
Rituximab	2/116 (1,7%)	2/64 (3,1%)
IVIG + Plasmapherese	1/116 (0,9%)	1/64 (1,6%)
IVIG + Plasmapherese + Azathioprin	1/116 (0,9%)	1/64 (1,6%)
Glukokortikoide zusätzlich (bei verschiedenen Monotherapien)	9/116 (7,8%)	9/64 (14,1%)

**Tabelle 13: Immunsuppressive Therapie zur Zeit des Studieneinschlusses in der Gesamtkohorte und bei Patienten mit entzündlicher PNP**

Abkürzungen: IVIG = intravenöse Immunglobuline, NSAR = nicht-steroidale Antirheumatika

	<b>Gesamte Patientenkohorte</b>	<b>Schmerzhafte PNP</b>
Pregabalin	23/116 (19,8%)	18/64 (28,1%)
Gabapentin	4/116 (3,4%)	2/64 (3,1%)
NSAR	2/116 (1,7%)	2/64 (3,1%)
Opiat	1/116 (0,9%)	1/64 (1,6%)
Capsaicinpflaster	1/116 (0,9%)	1/64 (1,6%)
Bedarfsmedikation	6/116 (4,5%)	2/64 (3,1%)
Pregabalin/Gabapentin + Opiat	6/116 (4,5%)	6/64 (9,4%)
Pregabalin/Gabapentin + NSAR	3/116 (2,6%)	3/64 (4,7%)
NSAR + Opiat	1/116 (0,9%)	1/64 (1,6%)
NSAR + Pregabalin + Fentanylpflaster	1/116 (0,9%)	1/64 (1,6%)

**Tabelle 14: Schmerztherapie zur Zeit des Studieneinschlusses in der Gesamtkohorte und bei Patienten mit schmerzhafter PNP**

Abkürzungen: IVIG = intravenöse Immunglobuline, NSAR = nicht-steroidale Antirheumatika

### 3.8 Nervenfaserdichte in den Hautbiopsaten

Es wurden 83 distale Biopsate und 75 proximale Biopsate von Patienten und jeweils 10 distale und proximale Biopsate von Kontrollprobanden hinsichtlich der IENFD untersucht. Der laborinterne Normwert für die IENFD am Unterschenkel lag bei  $9 \pm 3$  Fasern/mm und am Oberschenkel bei  $12 \pm 4$  Fasern/mm. Kontrollprobanden mit nicht-normwertiger IENFD in der Haut vom Unterschenkel wurden aus der Studie ausgeschlossen. Dieses betraf fünf Probanden.

Eine Zusammenfassung der IENFD-Daten findet sich in Tabelle 15:

		Median (Min.-Max.)	
		Kontrollen	Patienten
<b>IENFD distal (Fasern/mm)</b>	Gesamt	9,3 (6,0-17,6)	3,0 (0-11,8)
	Frauen	12,0 (6,3-17,6)	3,9 (0-11,0)
	Männer	7,0 (6,0-7,6)	2,4 (0-11,8)
<b>IENFD proximal (Fasern/mm)</b>	Gesamt	12,2 (7,3-18,5)	7,8 (0-22,8)
	Frauen	13,3 (7,4-18,5)	9,8 (2,3-22,8)
	Männer	11,0 (7,3-13,9)	6,9 (0-19,6)

**Tabelle 15: IENFD in distalen und proximalen Hautbiopsaten von Patienten und Kontrollen**

Abkürzungen: IENFD = intraepidermale Nervenfaserdichte

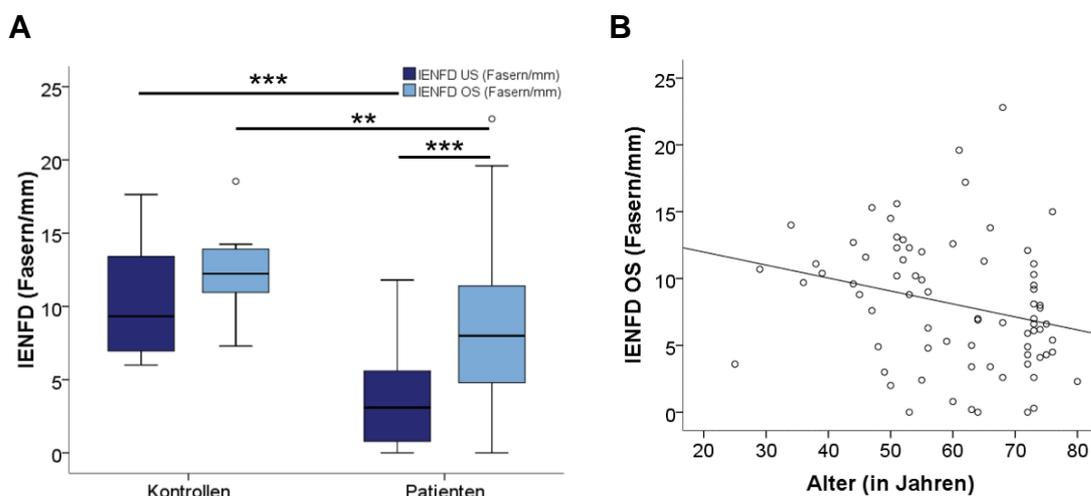
In der Biopsie vom distalen Unterschenkel fand sich bei 64/83 (77,1%) Patienten eine reduzierte IENFD. 23/75 (30,7%) Patienten wiesen in der Biopsie vom proximalen Oberschenkel eine reduzierte IENFD auf. Bei allen Kontrollprobanden zeigte sich eine normwertige IENFD. Weiterhin fand sich sowohl in der Biopsie vom Unterschenkel ( $p < 0,001$ ) als auch in der vom Oberschenkel ( $p < 0,01$ ) eine geringere IENFD bei Patienten als bei Kontrollen (siehe Abbildung 4). Die Patientengruppe wies mit 3,0 (0-11,8) Fasern/mm gegenüber 7,8 (0-22,8) Fasern/mm eine deutlich geringere distale als proximale IENFD auf ( $p < 0,001$ , siehe Abbildung 4).

In der Patientenkohorte ergab sich eine positive Korrelation zwischen der distalen und der proximalen IENFD ( $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient: 0,401,

## Ergebnisse

Daten nicht gezeigt). Die proximale IENFD korrelierte negativ mit dem Alter von Patienten ( $p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient:  $-0,312$ , siehe Abbildung 4).

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen schmerzhafter und schmerzloser PNP, zwischen entzündlicher oder nicht-entzündlicher PNP, zwischen axonaler und demyelinisierender PNP und zwischen den diagnostischen Subgruppen (Daten nicht gezeigt). Es ergaben sich auch keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen und keine Korrelation der IENFD mit der Krankheitsdauer (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4: (A) IENFD im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen und (B) Korrelation zwischen Alter und IENFD in der proximalen Biopsie:** (A) Geringere IENFD bei Patienten als bei Kontrollen in der distalen ( $***p < 0,001$ ) und in der proximalen Biopsie ( $**p < 0,01$ ). Geringere IENFD in der distalen als in der proximalen Biopsie innerhalb der Patientenkohorte ( $***p < 0,001$ ). (B) Negative Korrelation der proximalen IENFD mit dem Alter innerhalb der Patientenkohorte ( $**p < 0,01$ , Korrelationskoeffizient:  $-0,312$ ). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer.

Abkürzungen: IENFD = intraepidermale Nervenfaserdichte, OS = Oberschenkel, US = Unterschenkel

### 3.9 Genexpressionsanalyse

Bei der Genexpressionsanalyse wurden die beiden miRNAs miR-103a und miR-let-7d sowie Cacna1c, ein Zielgen der miR-103a, das für die Kalziumkanal-Untereinheit Cav1,2- $\alpha 1$  kodiert, untersucht. Die Expression der drei Kandidatengene wurde jeweils in WBC, in distalen und proximalen Hautproben und in Nervenproben gemessen. Cacna1c war in WBC kaum exprimiert, daher wurde seine Expression nicht in allen Proben untersucht.

Die Anzahl an Proben, die für die Genexpressionsanalyse verwertet wurden, sind in Tabelle 16 aufgelistet. Da für die TaqMan-PCR mehr Material benötigt wurde, konnte die Cacna1c-Expression nicht in jeder Probe gemessen werden.

	Gewebe	Kontrollen	Patienten
<b>Exiqon-PCR (miR-103a &amp; miR-let-7d)</b>	WBC	22	111
	US Haut	11	72
	OS Haut	11	61
	Nerv	-	49
<b>TaqMan-PCR (Cacna1c)</b>	WBC	15	17
	US Haut	9	66
	OS Haut	11	58
	Nerv	-	45

**Tabelle 16: Anzahl der verwerteten Proben für die Genexpressionsanalyse**

Abkürzungen: OS = Oberschenkel, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, US = Unterschenkel, WBC = White blood cells

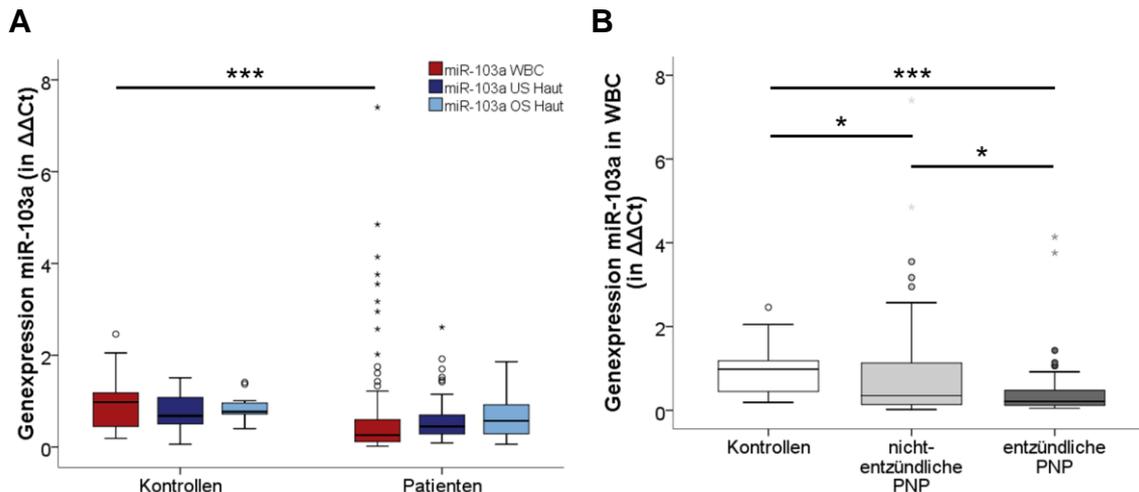
Bei keinem der Kandidatengene fanden sich Unterschiede in der Genexpression zwischen Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP, zwischen Patienten mit axonaler und demyelinisierender PNP oder zwischen Patienten unterschiedlicher diagnostischer Subgruppen (Daten nicht gezeigt).

Außerdem zeigten sich keine Unterschiede zwischen bereits immunsuppressiv behandelten und nicht-behandelten Patienten. In der Gruppe der Patienten, die noch nie immunsuppressiv behandelt wurden, ergaben sich keine von der Gesamtkohorte abweichenden Ergebnisse bei der Subgruppenanalyse (Daten nicht gezeigt).

### 3.9.1 Genexpressionsanalyse der miRNA-103a und Cacna1c

Im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen fand sich in WBC eine niedrigere Expression der miR-103a bei PNP Patienten als bei gesunden Kontrollen ( $p < 0,001$ , siehe Abbildung 5). Weiterhin wurde in WBC eine niedrigere Expression in entzündlichen als in nicht-entzündlichen PNP festgestellt ( $p < 0,001$ , siehe Abbildung 5).

## Ergebnisse

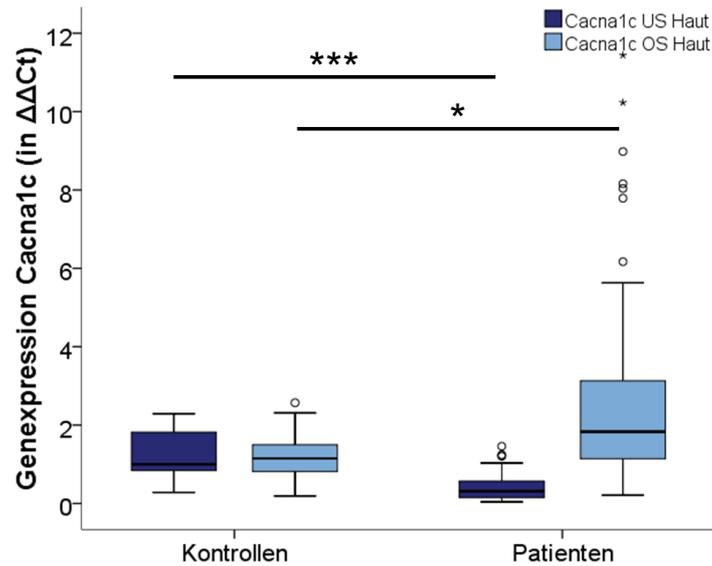


**Abbildung 5: (A) miR-103a-Genexpression im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen und (B) miR-103a-Genexpression im Vergleich zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNP:**

(A) Niedrigere miR-103a-Genexpression bei Patienten als bei Kontrollen (\*\* $p < 0,001$ ). (B) Niedrigere miR-103a-Genexpression bei entzündlichen als bei nicht-entzündlichen PNP (\* $p < 0,05$ ). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer.

Abkürzungen: OS = Oberschenkel, PNP = Polyneuropathie, US = Unterschenkel, WBC = White Blood Cells

Für den Kalziumkanal Cav1,2 konnten keine statistischen Untersuchungen durchgeführt werden, da das für Cav1,2 kodierende Gen Cacna1c in WBC kaum exprimiert war. Für die Hautproben ergaben sich Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Distal zeigte sich bei Patienten eine niedrigere ( $p < 0,001$ ) und proximal eine höhere ( $p < 0,05$ ) Cacna1c-Expression als bei Kontrollen (siehe Abbildung 6).

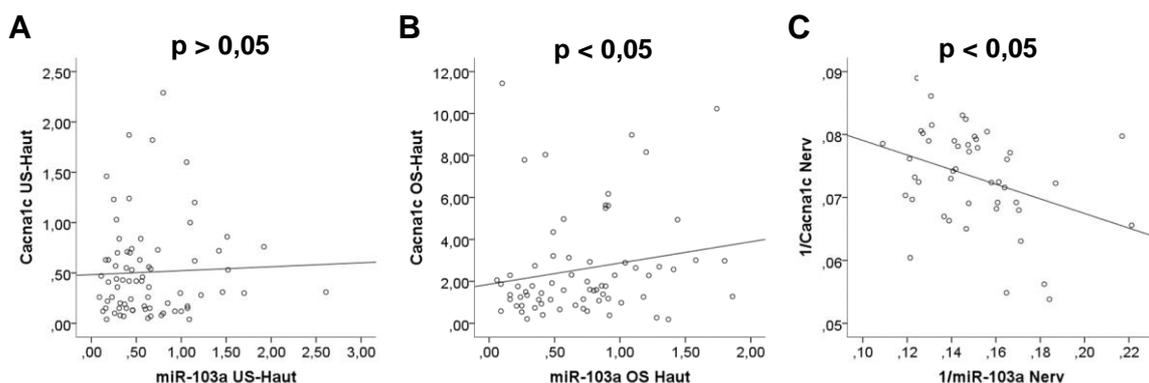


**Abbildung 6: Cacna1c-Genexpression in Hautproben vom distalen Unterschenkel und proximalen Oberschenkel im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen:** In US-Haut niedrigere Cacna1c-Expression bei Patienten als bei Kontrollen (\*\* $p < 0,001$ ). In OS-Haut höhere Cacna1c-Expression bei Patienten als bei Kontrollen ( $p < 0,05$ ). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer.

Abkürzungen: OS = Oberschenkel, PNP = Polyneuropathie, US = Unterschenkel

Weder für die miR-103a- noch für die Cacna1c-Expression konnten Unterschiede bei den Nervenproben nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen der miR-103a- und der Cacna1c-Expression in der Haut vom Oberschenkel und eine negative Korrelation in Nerv (siehe Abbildung 7). In der Haut vom Unterschenkel zeigte sich keine Korrelation.



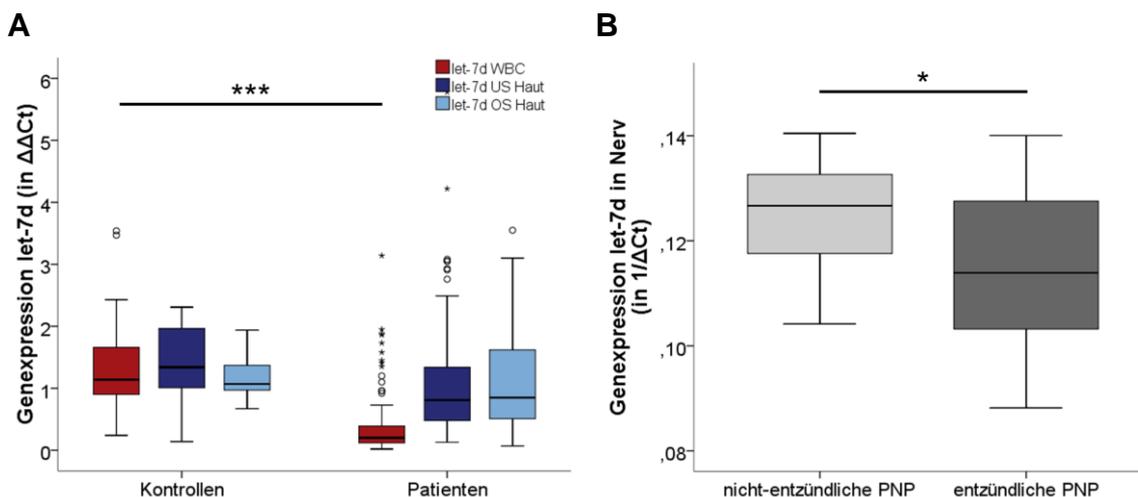
**Abbildung 7: Korrelation zwischen miR-103a- und Cacna1c-Expression:** (A) Keine Korrelation zwischen miR-103a- und Cacna1c-Expression in US-Haut. (B) Positive Korrelation der Cacna1c- mit der miR-103a-Expression in OS-Haut ( $p < 0,05$ , Korrelationskoeffizient: 0,242). (C) Negative Korrelation der Cacna1c- mit der miR-103a-Expression in Nerv ( $p < 0,05$ , Korrelationskoeffizient: -0,344).

Abkürzungen: OS = Oberschenkel, US = Unterschenkel

## Ergebnisse

### 3.9.2 Genexpressionsanalyse der miR-let-7d

Für die miR-let-7d wurde in WBC eine niedrigere Expression bei PNP Patienten als bei Kontrollen festgestellt ( $p < 0,001$ , siehe Abbildung 8). Bei den Hautproben ergaben sich keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Bei den Nervenproben fand sich eine niedrigere Expression in der Gruppe der Patienten mit entzündlicher PNP als bei Patienten mit nicht-entzündlicher PNP ( $p < 0,05$ , siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: (A) miR-let-7d-Genexpression im Vergleich zwischen Patienten und Kontrollen und (B) miR-let-7d-Genexpression im Vergleich zwischen entzündlicher und nicht-entzündlicher PNP:** (A) In WBC niedrigere miR-let-7d Genexpression bei Patienten als bei Kontrollen (\*\*\* $p < 0,001$ ). (B) In Nerv niedrigere Genexpression in entzündlicher als in nicht-entzündlicher PNP (\* $p < 0,05$ ). ° = Ausreißer, \* = extreme Ausreißer.

Abkürzungen: OS = Oberschenkel, PNP = Polyneuropathie, US = Unterschenkel, WBC = White Blood Cells

### 3.10 Korrelation der Genexpression mit den klinischen Daten

Es zeigte sich eine positive Korrelation der Cacna1c-Expression in der Haut vom Unterschenkel mit der Krankheitsdauer ( $p < 0,05$ , Korrelationskoeffizient: 0,300). Keines der Kandidatengene korrelierte bezüglich seiner Expression mit dem Alter oder der IENFD der Patienten (Daten nicht gezeigt).

Bei den Fragebogendaten zeigte sich eine negative Korrelation der Cacna1c-Expression in der Haut vom Oberschenkel mit dem durchschnittlichen Schmerz in den letzten vier Wochen ( $p < 0,05$ , Korrelationskoeffizient: -0,261, Daten nicht gezeigt) und dem NPSI-Summenwert ( $p < 0,05$ , Korrelationskoeffizient: -0,276, Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde die Expression der miR-103a und eines ihrer Zielgene *Cacna1c* sowie die Expression der miR-let-7d bei PNP-Patienten untersucht und mit der Expression bei gesunden Kontrollprobanden verglichen. Für beide miRNAs fand sich in WBC von Patienten eine geringere Expression als bei Kontrollprobanden. Bei Patienten mit entzündlicher PNP war die miR-103a in WBC und die miR-let-7d in Nervenbiopsaten niedriger exprimiert als bei Patienten mit nicht-entzündlicher PNP. Die *Cacna1c*-Expression zeigte eine inverse Korrelation mit der miR-103a in den Nerven-, aber nicht in den Hautbiopsaten. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den diagnostischen Subgruppen oder zwischen schmerzhaften und schmerzlosen PNP.

### 4.2 Score- und Fragebogendaten

Bei der ADS, die dazu dient, klinisch relevante abklärungsbedürftige depressive Symptome zu erfassen, zeigten sich höhere Werte bei Patienten mit schmerzhafter PNP als bei Patienten mit schmerzloser PNP. Hiermit übereinstimmend fand sich eine Korrelation des ADS-Summenwerts mit der aktuellen, maximalen und durchschnittlichen Schmerzstärke und der durch Schmerzen bedingten Einschränkungen im Alltag, bei der Arbeit und bei Freizeitaktivitäten im GCPS-Fragebogen. Diese Ergebnisse finden Bestätigung durch viele Studien, in denen eine Assoziation zwischen neuropathischen Schmerzen und psychischen Erkrankungen wie z.B. Depression beschrieben wurde (Cohen & Mao, 2014; Lees et al., 2015; Radat et al., 2013).

Beim mMRC-Score zeigten sich die unteren Extremitäten stärker betroffen als die oberen. Dies ist charakteristisch für viele PNP und damit ein erwarteter Befund.

### 4.3 Nervenfaserdichte in den Hautbiopsaten

Die Bestimmung der IENFD ist ein wichtiges Instrument, um die Diagnose einer small fiber Neuropathie (SFN) zu stellen (Lauria et al., 2010). Eine Reduktion der IENFD ist allerdings nicht spezifisch für die SFN und wurde bereits bei

## Diskussion

vielen verschiedenen Neuropathien, z.B. CIDP, diabetische PNP, GBS und vaskulitische PNP, beschrieben (Chiang et al., 2002; Lee et al., 2005; Pan et al., 2003; Umapathi et al., 2006). Daher wird eine reduzierte IENFD in der Hautbiopsie auch bei large fiber Neuropathien als ergänzendes Diagnosekriterium hinzugezogen (Sommer, 2018). Passend hierzu fand sich in unserer Patientenkohorte sowohl am Unterschenkel als auch am Oberschenkel eine geringere IENFD als in der Kontrollgruppe.

Die IENFD von PNP-Patienten am Unterschenkel korrelierte positiv mit derjenigen am Oberschenkel. Gleichwohl zeigte sich ein längenabhängiger Faserverlust mit geringerer IENFD am Unterschenkel als am Oberschenkel. Dieser Befund steht im Einklang mit vielen Studien, die eine nach distal abnehmende Faserdichte bei Patienten mit PNP beschreiben (Chien et al., 2001; Lauria et al., 2005; McArthur et al., 1998), und ist kennzeichnend für das Phänomen der Waller'schen Degeneration, das darin besteht, dass bei einer Nervenschädigung zunächst die distal gelegenen Anteile des Nerven zugrunde gehen (Tricaud & Park, 2017).

Außerdem ergab sich eine negative Korrelation der IENFD am Oberschenkel mit dem Alter der PNP-Patienten, am Unterschenkel jedoch nicht. Eine altersabhängige Reduktion der IENFD wurde bisher vor allem am Unterschenkel beschrieben (Bakkers et al., 2009; Goransson et al., 2004; Umapathi et al., 2006). Es ist allerdings anzunehmen, dass dieser Effekt in unserer Patientenkohorte dadurch verschleiert wird, dass bei Patienten aller Altersstufen eine starke Reduktion der IENFD am Unterschenkel vorlag. Die wenigen Studien, in denen die IENFD am Oberschenkel untersucht wurde, konnten keine Korrelation von IENFD und Alter belegen. Die Studien lassen sich jedoch nicht direkt mit unserer vergleichen. Umapathi et al. (2006) bestimmten die IENFD nur bei gesunden Kontrollen und die Studien von Lauria et al. (1999) und McArthur et al. (1998) wurden an wesentlich kleineren Kohorten durchgeführt, die sich zudem aus anderen PNP-Subtypen zusammensetzten.

#### 4.4 Genexpressionsanalyse

##### 4.4.1 miR-103a und Cacna1c

Die Reduktion der miR-103a in WBC von PNP-Patienten stimmt überein mit den Ergebnissen von Favereaux et al. (2011), die nach SNL bei Ratten eine reduzierte Expression der miR-103a fanden.

Eine veränderte miR-103-Expression bei entzündlichen PNP wurde hingegen bisher nicht beschrieben. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die miR-103 bei der Regulation von entzündlichen Prozessen eine Rolle spielt, sowohl als pro- als auch als anti-inflammatorischer Parameter. Ein pro-inflammatorisches Potential der miR-103 wurde z.B. im Rahmen vaskulärer Entzündung und Atherosklerose sowie Angiotensin-II-vermittelter renaler Entzündung und Fibrose gefunden (Hartmann et al., 2016; Jiang et al., 2019; Lu et al., 2019). In einer Studie von Zhang, Deng, et al. (2019) verstärkte ein miR-103-Imitator eine durch LPS hervorgerufene Entzündungsreaktion. Li et al. (2019) fanden hingegen eine durch miR-103-Imitatoren bedingte Herunterregulierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie eine Hemmung des NF- $\kappa$ B Signalwegs bei LPS-induzierter Entzündung. Da in derselben Studie eine Reduktion der miR-103-Expression bei Pneumonien im Kindesalter auftrat, legten die Autoren nahe, dass der Einsatz von miR-103-Imitatoren ein Potential bei der Behandlung der dysregulierten Immunantwort bei Pneumonien im Kindesalter hat.

Es bleibt zu klären, inwieweit die miR-103a bei der Pathogenese von entzündlichen PNP eine Rolle spielt. Ein therapeutisches Potential erscheint angesichts der vielschichtigen Rolle der miR-103 bei entzündlichen Prozessen nicht wahrscheinlich.

Favereaux et al. (2011) stellten die Hypothese auf, dass eine reduzierte Expression der miR-103a zu einer verstärkten Expression des spannungsabhängigen Kalziumkanals Cav1,2 führt, was wiederum neuropathische Schmerzen auslöst bzw. verstärkt. Entsprechend wäre eine erhöhte Cacna1c-Expression bei Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden zu erwarten, die sich in unserer Studie in der Haut vom Oberschenkel von PNP-Patienten fand.

## Diskussion

Im Unterschenkel hingegen zeigte sich eine Reduktion der *Cacna1c*-Expression. Eine mögliche Erklärung wäre, dass man mit der Hautbiopsie nur eine lokal begrenzte Stelle und damit unter Umständen nicht den Ort der aktiven Erkrankung erfasst, da bei einer PNP oft ein diskontinuierlicher Befall der Nerven vorliegt. Weiterhin zeigten sich in unserer Patientenkohorte keine Unterschiede bezüglich der miR-103a- oder *Cacna1c*-Expression zwischen Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP. Eine inverse Korrelation der miR-103a und *Cacna1c* zeigte sich nur bei den Nervenbiopsien; es fand sich sogar eine positive Korrelation in der Haut vom Unterschenkel.

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir die Ergebnisse von Favereaux et al. (2011) nicht bestätigen konnten. Die Übertragung von miRNA-Veränderungen bei Tiermodellen auf den Menschen ist grundsätzlich nicht ohne weiteres möglich. Lopez-Gonzalez et al. (2017) präsentiert in einem Review mehrere miRNAs, die in Tiermodellen und beim Menschen untersucht wurden. In den meisten Fällen stimmen die Ergebnisse nicht überein. Als mögliche Erklärung geben die Autoren die Verwendung von unterschiedlichen Biomaterialien bei der Genexpressionsanalyse an. In Tiermodellen wird meist Nervengewebe untersucht, z.B. Spinalganglien, Rückenmark, Gehirngewebe oder Nerven, während im Menschen Blut, Liquor oder Haut untersucht werden. Nervenbiopsien werden zwar im Rahmen der histologischen Diagnostik bei Patienten entnommen, aber der Vergleich mit gesunden Kontrollen ist aufgrund der Invasivität der Methode nicht vertretbar.

### 4.4.2 miR-let-7d

Verglichen mit gesunden Kontrollprobanden zeigte sich in WBC von PNP-Patienten eine reduzierte Expression der miR-let-7d. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Beobachtungen von Li et al. (2015), die in einem neuropathischen Rattenmodell eine Dysregulation der let-7-miRNAs feststellten. Hingegen zeigte sich in einer anderen Studie, in der mittels Microarray-Technik eine große Anzahl von miRNAs nach CCI bei Ratten untersucht wurde, keine Veränderung der miR-let-7-Expression (Brandenburger et al., 2012). Hier wurde jedoch die Expression im Rückenmark, in der Studie von Li et al. (2015) die

Expression im N. ischiadicus untersucht. Bei letzterer kam es in den ersten 14 Tagen nach CCI zu einem Anstieg, einer anschließenden Reduktion und einem wiederholten Anstieg der let-7-miRNAs. Beim Vergleich mit unserer Studie ist jedoch zu beachten, dass Li et al. (2015) keine langfristigen Auswirkungen der CCI auf die miRNA-Expression untersuchten. Da in unserer Patientenkohorte im Median eine Krankheitsdauer von vier Jahren vorliegt, ist es nicht zielführend die Richtung der miRNA-Dysregulation zu vergleichen.

Beim Menschen wurde bislang keine PNP-assoziierte Dysregulation der let-7-miRNAs festgestellt. Orlova et al. (2011) fanden allerdings eine verringerte miR-let-7-Expression in Vollblut von Patienten mit komplexem regionalem Schmerzsyndrom, das oft auf eine Nervenverletzung folgt.

Als weiteres Ergebnis unserer Studie zeigte sich eine reduzierte Expression der miR-let-7d bei entzündlichen im Vergleich zu nicht-entzündlichen PNP. Let-7-miRNAs wurden bereits in vielen Studien mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht. Sie scheinen eine immunmodulatorische Wirkung und somit sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen zu haben (Gaudet et al., 2017). Beispiele für anti-inflammatorische Funktionen sind die Reduktion der Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6, des Toll-like-Rezeptors (TLR-) 4 und des Transkriptionsfaktors C/EBP- $\delta$ , der eine wichtige Rolle in der entzündlichen Immunantwort spielt (Gaudet et al., 2017). Außerdem stellten Ni et al. (2015) fest, dass eine Überexpression der miR-let-7 nach ischämischem Schlaganfall in einem Mausmodell zu einer Hemmung mikroglialer Aktivierung sowie zu einer reduzierten Expression pro-inflammatorischer Zytokine führte. Dies hatte ein kleineres Infarktareal sowie ein besseres neurologisches Outcome zur Folge.

Zu den pro-inflammatorischen Funktionen der miR-let-7 zählt die Suppression des anti-inflammatorischen Proteins SOCS1 (Kim et al., 2013; Zhang et al., 2011). Zudem ist die miR-let-7 in eine positive Rückkopplungsschleife involviert, die zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt. Hierbei kommt es zu einer Herunterregulation der miR-let-7 durch NF- $\kappa$ B, einem pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor. Dies führt zu einer verstärkten Expression von IL-6, da die Suppression durch miR-let-7 abgeschwächt ist, was wiederum fördernd auf die

## Diskussion

NF- $\kappa$ B-Transkription wirkt (Gaudet et al., 2017). Außerdem kann die miR-let-7 als Ligand des TLR-7 fungieren. Die Aktivierung des Immunrezeptors durch miR-let-7 führte in einer Studie von Lehmann et al. (2012) zu einem Verlust an Nervenzellen und Anzeichen von Neurodegeneration in einem Mausmodell.

Zusammenfassend erfüllt die miR-let-7 vielfältige Funktionen bei Entzündungsreaktionen. Ob und inwieweit die miR-let-7 eine Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen PNP spielt, bleibt zu klären. Die Evaluierung von Zielmolekülen, wie z.B. C/EBP- $\delta$ , TLR-4, IL-6 und SOCS1, bei Patienten mit verschiedenen entzündlichen PNP könnte hierbei Aufschluss geben.

### 4.4.3 Fehlende Unterschiede zwischen den diagnostischen Subgruppen

Weder für die miR-103a und Cacna1c noch für die miR-let-7d zeigten sich Expressionsunterschiede zwischen den PNP-Subgruppen in WBC, Haut- oder Nervenbiopsien. Eine mögliche Erklärung hierfür besteht in der insgesamt großen Gesamtkohorte doch relativ kleinen Gruppenstärke bei der Einteilung nach Ätiologie (siehe 3.2). Anhand unserer Ergebnisse erscheint ein Einsatz der untersuchten miRNAs als diagnostische Biomarker letztlich nicht erfolgversprechend.

## 4.5 Limitationen der Studie

Da jede miRNA die Expression mehrerer Zielgene reguliert, sind die nicht-kodierenden RNA-Moleküle in viele verschiedene Prozesse im menschlichen Körper involviert. Außerdem kann ihre Expression durch etliche endogene und exogene Faktoren beeinflusst werden. Daher müssen bei der Bewertung der Ergebnisse einige Punkte berücksichtigt werden, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### 4.5.1 Studiendesign

Eine wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit besteht in der großen Heterogenität der Patientenkohorte. Ein Einfluss der unterschiedlichen Krankheitsdauer, der in der Vergangenheit erfolgten oder aktuellen Schmerz- und Immuntherapie sowie der verschiedenen Begleiterkrankungen der Patienten auf die miRNA-Expression kann nicht ausgeschlossen werden. Zudem ergaben

sich trotz großer Gesamtkohorte von  $n = 116$  für die PNP-Subgruppen relativ geringe Patientenzahlen, was die Aussagekraft der Subgruppenvergleiche deutlich einschränkt. Auch die Anzahl an Kontrollprobanden war im Vergleich zu der Größe der Patientenkohorte zu gering und das mediane Alter sowie die Geschlechterverteilung waren nicht adaptiert. Dies ist bedingt durch die strengen Einschlusskriterien für Kontrollprobanden. Eine reduzierte IENFD, ein Diabetes mellitus oder Auffälligkeiten in der Elektroneurographie führten in vielen Fällen zum Ausschluss aus der Kontrollgruppe. Ein weiterer Nachteil der Studie ist, dass aufgrund der Invasivität der Nervenbiopsie bei Kontrollprobanden keine Nerven untersucht werden konnten.

#### 4.5.2 Herausforderungen bei der Analyse von miRNAs

Es wird viel Hoffnung auf miRNAs als zukünftige Biomarker bei diversen Erkrankungen gesetzt. Ihrer Validierung stehen allerdings zahlreiche technische Herausforderungen im Wege (Faraldi et al., 2020).

Das Potential der miRNAs als Biomarker besteht vor allem in ihrer großen Stabilität. Dies ist unter anderem durch die Verpackung der miRNAs in Exosomen, Mikropartikeln, Ago Proteinen und HDL-Cholesterol bedingt (Gevaert et al., 2018). Ein weiterer Stabilitätsfaktor ist vermutlich, dass sie aufgrund ihrer Kürze weniger Angriffspunkte für Nukleasen bieten (Becker et al., 2010). Die akkurate Quantifizierung der miRNAs wird jedoch dadurch erschwert, dass sie oft in geringen Mengen vorliegen und sich in ihren Sequenzen nur wenig von anderen miRNAs unterscheiden (Blondal et al., 2013; Dellett & Simpson, 2016).

Eine weitere Schwierigkeit ist, dass viele Faktoren einen Einfluss auf die miRNA-Expression haben. So kann die Expression der in unserer Studie untersuchten miR-103a und miR-let-7d durch Entzündung, Hypoxie und Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Adipositas und die koronare Herzkrankheit (KHK) beeinflusst werden. Eine repräsentative Verteilung dieser Faktoren in unserer Patientenkohorte ist nicht sicher gewährleistet. Auch Alter, Geschlecht, Ernährung, sportliche Betätigung, Medikamenteneinnahme und Rauchgewohnheiten der Patienten können sich auf die miRNA-Expression auswirken (Singh et al., 2016).

## Diskussion

Zudem stellt die Wahl des geeigneten Untersuchungsmaterials eine Herausforderung dar. Die Expressionsbestimmung in Haut- und Nervenbiopsien bietet als Vorteil einen Einblick in das lokale Geschehen im Milieu um die kutanen Nervenendigungen und im Nerven selbst. Ihr Nachteil besteht darin, dass die Biopsie nicht zwangsläufig eine Stelle der aktiven Erkrankung erfasst und daher keinen Einblick in das dynamische Gefüge der miRNA-Expression gibt (Rupaimoole & Slack, 2017). Dagegen erlaubt die miRNA-Messung in Blut eine Beurteilung der systemischen miRNA-Expression und ist weniger invasiv als eine Biopsie. Hier kommt jedoch wiederum der Einfluss des gesamten Organismus zum Tragen. Es wäre z.B. vorstellbar, dass die miRNA-Dysregulation aufgrund einer Atherosklerose im Blut die PNP-bedingte Dysregulation überlagert.

Da es schwierig ist, die exakte Menge an miRNA in einer Probe zu bestimmen (Becker et al., 2010), wird bei der Herstellung der Verdünnung für die cDNA jeweils die gleiche Menge RNA eingesetzt. Da das Verhältnis von miRNA und RNA nicht in jedem Organismus und in jedem Untersuchungsmaterial übereinstimmt, kann allerdings nicht sichergestellt werden, dass tatsächlich immer die gleiche Menge an miRNA eingesetzt wird (Schwarzenbach et al., 2015).

Um Fehler auszugleichen, die durch diese Schwankungen zustande kommen, ist die Normalisierung durch ein Haushaltsgen notwendig. Für die Wahl eines geeigneten Haushaltsgens gibt es in der wissenschaftlichen Gemeinschaft kein einheitliches Vorgehen, was Vergleiche zwischen Studien erschwert und zu missverständlicher Dateninterpretation führt (Vashisht & Gahlay, 2020). Ein geeignetes Haushaltsgen sollte stark und gleichmäßig exprimiert sein (Peltier & Latham, 2008). Diese Kriterien sind allerdings häufig nicht erfüllt. Es werden regelmäßig miRNAs als Haushaltsgene verwendet, für die in anderen Studien eine Dysregulation nachgewiesen wurde (Ma et al., 2018; Singh et al., 2016). Beispielsweise wurde die miRNA-103a, für die in vielen Studien inklusive unserer eine Dysregulation gezeigt wurde, in anderen Studien bereits als Haushaltsgen eingesetzt (Liu et al., 2019).

Auch in unserer Studie zeigten sich Schwankungen der 5S-RNA-Expression, die als Haushaltsgen diente. Im Durchschnitt zeigte sich in der Kontrollgruppe

außerdem eine geringere Expression der 5S-RNA als in der Patientenkohorte. Daher können Pipettier- und Messfehler sowie eine Beeinflussung der 5S-Expression durch eine PNP-Erkrankung nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Schwierigkeiten bei der Suche nach einem geeigneten Haushaltsgen sind in der Literatur vielfach beschrieben. Becker et al. (2010) fanden trotz der Normalisierung durch ein Haushaltsgen bei mehreren miRNAs in verschiedenen Untersuchungsmaterialien fast immer eine Korrelation zwischen den Ct-Werten und der RNA integrity number (RIN), die einen Marker für die Qualität der RNA bzw. den Grad der RNA-Degradierung darstellt. Bei mRNA-qPCR hingegen zeigte sich nach der Normalisierung nur in Einzelfällen eine Korrelation zwischen den Ct-Werten und der RIN. Das bedeutet, dass der Einfluss der RNA-Qualität auf die gemessene miRNA-Menge durch den Einsatz eines Haushaltsgens nicht vollständig ausgeglichen werden kann. Die Normalisierung scheint also für miRNAs weniger gut zu funktionieren als für mRNA.

Ein möglicher Lösungsansatz besteht darin, mehrere Haushaltsgene zu kombinieren. Chugh and Dittmer (2012) halten ein Minimum von drei verschiedenen Haushaltsgenen für zielführend, Schwarzenbach et al. (2015) schlagen eine Kombination aus exogenen, also vor der Analyse zugeführten, und endogenen Haushaltsgenen vor. Außerdem ist die Anwendbarkeit eines Haushaltsgens nicht automatisch von einer Studie auf die andere übertragbar, daher ist eine Validierung des Haushaltsgens bei jeder Studie von neuem erforderlich (Schwarzenbach et al., 2015).

#### 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Frage, ob miRNAs als diagnostische Biomarker bei PNP geeignet sind, kann anhand unserer Studie nicht abschließend beantwortet werden. In der Literatur besteht Einigkeit darüber, dass Marker, die in Blut oder Blutbestandteilen, wie Serum, Plasma oder WBC, gemessen werden können, aufgrund der geringen Invasivität und der guten Zugänglichkeit als Biomarker am besten geeignet sind (Grasso et al., 2014; Larrea et al., 2016; Pathak et al., 2006). In unserer Studie zeigen sich die deutlichsten Unterschiede der miRNA-

## Diskussion

Expression in WBC. Allerdings wird die Suche nach einem einzelnen spezifischen Biomarker dadurch erschwert, dass die systemische Expression viele pathologische Prozesse im Körper widerspiegelt und miRNAs selten nur bei einer Erkrankung involviert sind. Eine mögliche Lösung ist die Verwendung mehrerer miRNAs, also spezifischer miRNA-Muster, die bei bestimmten Erkrankungen auftreten (Chen et al., 2008; Shin & Chu, 2014). Um diese Möglichkeit zu erörtern, ist es erforderlich, weitere miRNAs bei PNP-Patienten zu untersuchen, idealerweise bei einer größeren Subgruppenstärke sowie einer höheren Anzahl an Kontrollprobanden.

Unabhängig von der Frage, ob die miR-103a und die miR-let-7d als Biomarker bei PNP geeignet sind, ist es von Interesse, genauere Erkenntnisse zu der Rolle der beiden miRNAs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von PNP zu erlangen, um ihr therapeutisches Potential zu ergründen. Ein Ansatz wäre z.B., Zielgene der miR-let-7d zu untersuchen. SOCS1, IL-6 und C/EBP- $\delta$  sind Zielgene und -moleküle der miR-let-7d, die bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielen (Gaudet et al., 2017). Ob sie auch bei der Pathophysiologie von entzündlichen PNP mitwirken, wurde bislang nicht untersucht. Weitere interessante Zielgene und -moleküle sind Krox20, Notch und NGF, die bei Myelinisierungsprozessen involviert sind (Gokbuget et al., 2015; Li et al., 2015). NGF ist ein Neurotrophin, das die Differenzierung und Funktion von peripheren Nervenzellen fördert. Eine mögliche therapeutische Anwendung bei peripheren Neuropathien wurde bereits in klinischen Studien getestet (Aloe et al., 2012; Manni et al., 2013). Der klinische Nutzen von NGF wird allerdings limitiert durch dosisabhängige unerwünschte Wirkungen wie Myalgien und Hyperalgesie an der Einstichstelle, sowie eine kurze Halbwertszeit und die Unfähigkeit, die Blut-Nerven-Schranke zu überwinden. Daher stellt sich die Frage, ob die Beeinflussung des endogenen NGF-Spiegels durch den Einsatz von miR-let-7d-Inhibitoren hier eine Alternative darstellen könnte (Li et al., 2015).

Wichtig ist außerdem, die Methoden für die miRNA-Expressions-Bestimmung zu verbessern und zu standardisieren. Der Mangel an übergreifenden, standardisierten Protokollen für Blutaufreinigung, RNA-Isolation und Normalisierung in der qRT-PCR stellt ein Problem für die Entwicklung klinischer

Anwendungsmöglichkeiten von miRNAs dar (Ma et al., 2018). Einheitliche Protokolle wären dringend notwendig, um zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

## Diskussion

## 5 Zusammenfassung

Die Polyneuropathie (PNP) ist die häufigste Störung des peripheren Nervensystems bei Erwachsenen. Die Suche nach der Ursache bleibt in vielen Fällen erfolglos, ist aber unverzichtbar, da die Therapiewahl von der Ätiologie der Erkrankung abhängt. Geeignete Biomarker könnten die Differentialdiagnose unter Umständen erleichtern. miRNAs sind in dieser Hinsicht vielversprechend, da in vielen Studien bei Nervende- und -regenerationsprozessen sowie in neuropathischen Schmerzmodellen eine Dysregulation beschrieben wurde.

In dieser Studie wurde die Expression zweier miRNAs, miR-103a und miR-let-7d, sowie eines Zielmoleküls der miR-103a, des Kalziumkanals Cav1,2, in einer großen Kohorte von PNP-Patienten unterschiedlicher Ätiologie in Blut, Haut- und Nervenbiopsien untersucht. Insgesamt wurden 116 Patienten und 22 Kontrollprobanden in die Studie eingeschlossen. Nach der Isolation von RNA aus WBC, Haut- und Nervenbiopsien folgte die Expressionsbestimmung mittels qRT-PCR.

Während sich jeweils Unterschiede zwischen PNP-Patienten und Kontrollen und zwischen Patienten mit entzündlicher und solchen mit nicht-entzündlicher PNP zeigten, wurden keine Unterschiede in der Expression zwischen den ätiologischen Subgruppen oder zwischen Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP festgestellt. In den Nervenbiopsien der Patientenkohorte ergab sich eine inverse Korrelation der miR-103a und ihrem Zielgen *Cacna1c*, die darauf hinweisen könnte, dass *Cacna1c* von der miR-103a negativ reguliert wird.

Da in unserer Patientenkohorte keine Unterschiede zwischen den PNP-Subgruppen auftraten, scheint der Einsatz der miR-103a und miR-let-7d als diagnostische Biomarker zur ätiologischen Einordnung einer PNP nicht gerechtfertigt. Dennoch deuten unsere Ergebnisse auf eine mögliche Rolle der untersuchten miRNAs bei Entstehung und Verlauf von PNP hin. Für ein tieferes pathophysiologisches Verständnis der miRNAs vor allem bei entzündlichen Neuropathien, könnte die Untersuchung von weiteren miRNAs und Zielgenen Aufschluss geben.



## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADS	Allgemeine Depressionsskala
AIDP	Akute inflammatorische demyelinisierende PNP
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
ANCA	Anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCI	Chronic constriction injury
cDNA	Komplementäre DNA
CIAP	Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie
CIDP	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
Ct	Cycle threshold
dmL	Distal motorische Latenz
DRG	Dorsal root ganglion
ENG	Elektroneurographie
Fa.	Firma
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GCPS	Graded chronic pain scale
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
INCAT	Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
KHK	Koronare Herzkrankheit
let-7-miRNA	let-7-miRNA
M.	Morbus
miRNA	Micro-RNA
mMRC-Score	Modifizierter Medical Research Council Score
MOR	$\mu$ -Opioid-Rezeptor
mTCNS	Modifizierter Toronto Clinical Neuropathy Score
N.	Nervus
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit

## Anhang

NPSI	Neuropathic Pain System Inventory
NRS	Numerische Ratingskala
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
NSVN	Nicht-systemische vaskulitische Neuropathie
ODSS	Overall disability sum score
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
PIAN	Progressive idiopathische axonale Neuropathie
PNP	Polyneuropathie
PNS	Peripheres Nervensystem
qRT-PCR	Quantitative real-time-PCR
QST	Quantitative sensorische Testung
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
SNL	Spinal nerve ligation
TLR	Toll-like Rezeptor
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
WBC	White blood cells

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über Studien, die die Rolle von Ionenkanälen und deren Regulierung durch miRNAs bei der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen untersuchen.....	16
Tabelle 2: Cycler-Einstellung für reverse Transkription-PCR (miRNA-Genexpressionsanalyse) .....	29
Tabelle 3: Reagenzien für die reverse Transkriptions-PCR (Cacna1c-Genexpressionsanalyse) .....	30
Tabelle 4: Cycler-Einstellung für die reverse Transkriptions-PCR (Cacna1c-Genexpressionsanalyse).....	30
Tabelle 5: Cycler-Einstellung für die qRT-PCR (miRNA-Genexpressionsanalyse) .....	32
Tabelle 6: Reagenzien für die Reaktionsansätze für Zielgen und 18sRNA ....	32
Tabelle 7: Cycler-Einstellung für qRT-PCR (Cacna1c-Genexpressionsanalyse) .....	33
Tabelle 8: Angaben zur Schmerzqualität im NPSI.....	37
Tabelle 9: Übersicht der GCPS-Fragebogendaten – Einzelne GCPS-Items in der gesamten Patientenkohorte und bei Patienten mit schmerzhafter PNP.....	38
Tabelle 10: Übersicht der GCPS-Fragebogendaten – Intensitäts- und Behinderungsscore im Vergleich zwischen den ätiologischen Subgruppen .....	38
Tabelle 11: Mediane (Min.-Max.) der Untersuchungsscores .....	40
Tabelle 12: Zellzahl und Protein im Liquor von Patienten.....	41
Tabelle 13: Immunsuppressive Therapie zur Zeit des Studieneinschlusses in der Gesamtkohorte und bei Patienten mit entzündlicher PNP ...	42
Tabelle 14: Schmerztherapie zur Zeit des Studieneinschlusses in der Gesamtkohorte und bei Patienten mit schmerzhafter PNP .....	42
Tabelle 15: IENFD in distalen und proximalen Hautbiopsaten von Patienten und Kontrollen.....	43
Tabelle 16: Anzahl der verwerteten Proben für die Genexpressionsanalyse ...	45
Tabelle 17: Einteilung der Patientenkohorte nach Ätiologie .....	67

## Anhang

Tabelle 18: Übersicht der Summenwerte der Fragebögen und Scores .....	68
Tabelle 19: Korrelation der GCPS-Items mit dem ADS-Summenwert: p- Werte und Korrelationskoeffizienten .....	69
Tabelle 20: Übersicht der TCNS-Daten: Einzelne TCNS-Items in der gesamten Patientenkohorte und bei Patienten mit schmerzhafter PNP .....	70
Tabelle 21: Elektroneurographische Messergebnisse bei Kontrollen und Patienten: N. suralis und N. tibialis .....	71
Tabelle 22: Elektroneurographische Messergebnisse bei Patienten: N. medianus, N. ulnaris und N. peroneus .....	72

## 6.3 Einteilung der Patientenkohorte nach Ätiologie

Diagnostische Subgruppe	Anteil an der Patientenkohorte
Unklar	38/116 (32,8%)
Nicht-systemische vaskulitische PNP	14/116 (12,1%)
PIAN	11/116 (9,5%)
Hereditäre PNP	10/116 (8,6%)
Diabetische PNP	8/116 (6,9%)
CIDP	9/116 (7,8%)
Sonstige	7/116 (6,0%)
-PNP bei Vitaminmangel	2/116 (1,7%)
-PNP bei Sarkoidose	1/116 (0,9%)
-PNP bei Sjögren-Syndrom	1/116 (0,9%)
-MMN	1/116 (0,9%)
-POEMS	1/116 (0,9%)
-MADSAM	1/116 (0,9%)
Systemische Vaskulitis	6/116 (4,3%)
Paraproteinämische PNP	6/116 (4,3%)
Toxische PNP	3/116 (2,6%)
CIAP	3/116 (2,6%)
GBS	3/116 (2,6%)

**Tabelle 17: Einteilung der Patientenkohorte nach Ätiologie**

Abkürzungen: CIAP = Chronische idiopathische axonale Polyneuropathie; CIDP = Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie; GBS = Guillain-Barré-Syndrom; MADSAM = Multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie; MMN = Multifokale motorische Neuropathie; NSVN = Nicht-systemische vaskulitische Neuropathie; PIAN = Progressive idiopathische axonale Neuropathie; PNP = Polyneuropathie; POEMS = Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie, monoklonale Gammopathie, Hautveränderungen

## Anhang

### 6.4 Patienten- und Fragebogendaten

#### 6.4.1 Übersicht der Summenwerte der Fragebögen und Scores

	<b>Median (Min.-Max.) der Summenwerte</b>				
	NPSI	ADS	ODSS	mTCNS	mMRC
Gesamt	0,12 (0-1,65)	13,0 (0-53)	3 (0-8)	15,5 (1-31)	57 (26-60)
Schmerzhafte PNP	0,26 (0-1,65)	16,0 (3-53)	3 (0-8)	17,0 (3-31)	57,0 (26-60)
Schmerzlose PNP	0,03 (0-0,14)	9,5 (0-30)	2 (0-8)	13,0 (1-29)	57,5 (30-60)
Entzündliche PNP	0,10 (0-0,63)	13,0 (0-37)	3 (0-8)	17,0 (3-30)	56,0 (26-60)
Nicht- entzündliche PNP	0,13 (0-0,65)	13,0 (3-53)	2 (0-7)	14,0 (1-31)	58,0 (36-60)
Frauen	0,14 (0-0,61)	13,0 (0-37)	3 (0-8)	16,5 (4-31)	57 (26-60)
Männer	0,10 (0-0,65)	13,0 (1-53)	2 (0-8)	15,0 (1-31)	57 (30-60)

**Tabelle 18: Übersicht der Summenwerte der Fragebögen und Scores**

Abkürzungen: ADS = Allgemeine Depressionsskala, mMRC = modifizierter Medical Research Council Score, mTCNS = modifizierter Toronto Clinical Neuropathy Score, ODSS = Overall Disability Sum Score, PNP = Polyneuropathie

## 6.4.2 Korrelation der GCPS-Items mit dem ADS-Summenwert

GCPS-Item		Signifikanz (p-Wert)	Korrelations- koeffizient
GCPS- Frage	Aktueller Schmerz	< 0,05	0,251
	Maximaler Schmerz	< 0,01	0,267
	Durchschnittlicher Schmerz	< 0,05	0,250
	Tage ohne übliche Aktivität	< 0,01	0,266
	Beeinträchtigung der Alltagsaktivitäten	< 0,05	0,234
	Beeinträchtigung der Freizeitaktivitäten	< 0,01	0,269
	Beeinträchtigung der Arbeitsfähigkeit	< 0,01	0,318
Intensitätsscore		< 0,01	0,264
Behinderungsscore		< 0,01	0,270

**Tabelle 19: Korrelation der GCPS-Items mit dem ADS-Summenwert: p-Werte und Korrelationskoeffizienten**

Abkürzungen: ADS = Allgemeine Depressionsskala, GCPS = Graded chronic pain scale

## 6.4.3 Übersicht der TCNS-Daten

<b>TCNS-Item</b>	<b>Alle Patienten</b>	<b>Schmerzhafte PNP</b>
Schmerz	1 (0-3)	3 (0-3)
Taubheitsgefühl	2 (0-3)	2 (0-3)
Kribbelparästhesien	1 (0-3)	2 (0-3)
Muskelschwäche	2 (0-3)	3 (0-3)
Ataxie	3 (0-3)	3 (0-3)
Symptome an den Armen	1 (0-3)	1 (0-3)
Spitz-/Stumpfdiskrimination	0 (0-3)	0 (0-3)
Temperaturempfinden	0 (0-3)	0 (0-3)
Oberflächensensibilität	2 (0-3)	2 (0-3)
Vibrationsempfinden	3 (0-3)	3 (0-3)
Lagesinn	0 (0-3)	0 (0-3)

**Tabelle 20: Übersicht der TCNS-Daten: Einzelne TCNS-Items in der gesamten Patientenkohorte und bei Patienten mit schmerzhafter PNP**

Abkürzungen: PNP = Polyneuropathie, TCNS = Toronto Clinical Neuropathy Score

## 6.4.4 Elektroneurographische Messergebnisse: N. suralis und N. tibialis

		Kontrollgruppe			
Nerv	Untersuchte Parameter	Median (Min.-Max.)	Untersucht	Keine Reizantwort	Verwertbar
N. suralis	Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	18,4 (5,5-56,9)	18	0	18
	NLG (m/s)	47,4 (41,3-55,2)	18	0	18
N. tibialis	Amplitude proximal (mV)	14,3 (5,9-25,3)	15	0	15
	Amplitude distal (mV)	19,2 (8,7-33,0)	15	0	15
	dmL (ms)	3,6 (2,5-5,4)	15	0	15
	NLG (m/s)	44,8 (42,4-54,5)	15	0	15
	F-Wellen-Latenz (ms)	52,4 (43,8-59,4)	13	0	13
		Patientengruppe			
Nerv	Untersuchte Parameter	Median (Min.-Max.)	Untersucht	Keine Reizantwort	Verwertbar
N. suralis	Amplitude ( $\mu\text{V}$ )	4,0 (0,2-27,5)	108	37	71
	NLG (m/s)	39,7 (24,3-54,9)	108	37	71
N. tibialis	Amplitude proximal (mV)	1,5 (0,1-17,4)	111	17	94
	Amplitude distal (mV)	2,1 (0,01-17,6)	111	15	96
	dmL (ms)	4,6 (3,0-18,8)	111	15	96
	NLG (m/s)	37,6 (15,0-59,2)	111	17	94
	F-Wellen-Latenz (ms)	60,7 (29,2-85,2)	98	42	56

Tabelle 21: Elektroneurographische Messergebnisse bei Kontrollen und Patienten: N. suralis und N. tibialis

Abkürzungen: dmL = distal motorische Latenz, N. = Nervus, NLG = Nervenleitgeschwindigkeit

6.4.5 Elektroneurographische Messergebnisse: N. medianus, N. ulnaris und N. peronaeus

Nerv	Untersuchte Parameter	Median (Min.-Max.)	Untersucht (N)	Nicht ableitbar	Verwertbar
N. medianus	Amplitude proximal (mV)	7,1 (0,04-18,3)	103	1	102
	Amplitude distal (mV)	8,5 (0,1-19,4)	103	1	102
	dmL (ms)	4,5 (2,8-20,3)	102	1	101
	NLG (m/s)	46,4 (15,6-64,7)	103	1	102
	F-Wellen-Latenz (ms)	31,2 (15,6-86,1)	89	9	80
N. ulnaris	Amplitude proximal (mV)	9,9 (0,6-18,2)	63	2	61
	Amplitude distal 1 (mV)	10,4 (0,7-19,4)	63	2	61
	Amplitude distal 2 (mV)	12,2 (0,6-20,1)	63	2	61
	dmL (ms)	3,3 (2,2-6,3)	63	2	61
	NLG (m/s)	45,5 (20,2-66,4)	63	2	61
	F-Wellen-Latenz (ms)	31,2 (24,8-49,2)	11	7	4
N. peronaeus	Amplitude proximal (mV)	0,85 (0,02-6,7)	61	10	51
	Amplitude distal 1 (mV)	0,9 (0,1-8,7)	61	10	51
	Amplitude distal 2 (mV)	1,2 (0,01-9,1)	61	10	51
	dmL (ms)	5,1 (3,5-38,4)	61	10	51
	NLG (m/s)	37,9 (12,8-66,7)	61	10	51

Tabelle 22: Elektroneurographische Messergebnisse bei Patienten: N. medianus, N. ulnaris und N. peronaeus

Abkürzungen: dmL = distal motorische Latenz, N. = Nervus, NLG = Nervenleitgeschwindigkeit

## 6.5 Materialtabellen

## 6.5.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Caps	0,2mL Soft Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	1,5mL Safe-Lock Tubes	
	2mL Mikroschraubröhre PP	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Einmal-Biopsiestanze	Biopsy Punch 5mm, 3mm	Fa. Stiefel, Offenbach am Main, Deutschland
Einmal-Skalpellklinge		B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanülen	Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pflaster	Leukomed®	BNS Medical, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen für Multipipette	Combitips advanced® 0,1mL, 0,5mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen normal	Biosphere® Filter Tip 10µL, 100µL, 1000µL	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Real-time-PCR Platte	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
RNaseZap® Solution		Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Sterile Einmalhandschuhe	Sempermed® supreme	Semperit Technische Produkte GmbH Segment Sempermed, Wien, Deutschland
Sterile Heftpflaster	Leukostrip	Smith&Nephew, London, England

## Anhang

Sterile Kompresse	Gazin® Mullkompresse steril	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland
Verschlussfolie für real-time-PCR	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

### 6.5.2 Geräte und Laborhilfen

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Cycler für real-time-PCR	StepOnePlus, real-time-PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Cycler für Reverse Transkription	Peqlab, primus 96 advanced	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Dispergierstab für RNA-Extraktion	MICCRA D-9 Homogenisierer – Dispergierer	MICCRA GmbH, Müllheim, Deutschland
Mikroskop	Olympus CKX41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Multipipette für real-time-PCR	Multipipette® stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	10µL, 100µL, 1000µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RNA-Messgerät	NanoDrop™ One Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer	GLW- L46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg, Deutschland
Zentrifuge für Blutasservierung	ROTINA 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge für PCR-Platten	Heraeus Megafuge 1,0R	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

Zentrifuge für RNA-Extraktion	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellzählkammer	Zählkammer Neubauer improved	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

### 6.5.3 Reagenzien für Blutasservierung

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Erythrozytenlysepuffer	Buffer EL	Qiagen, Hilden, Deutschland
Lymphoprep Puffer	Lymphoprep TM	Fresenius SE & Co. KgaA, Bad Homburg, Deutschland
RNAprotect Cell Reagent		Qiagen, Hilden, Deutschland
Trypanblau	Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

### 6.5.4 Medikamente

Art	Bezeichnung	Hersteller
Lokalanästhetikum	Scandicain 1%	AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland

### 6.5.5 Reagenzien für Aufarbeitung von Haut und Nerv

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
RNA Later	RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Paraformaldehyd	4% PFA	Laboreigene Herstellung
Phosphatpuffer	0,1M	Laboreigene Herstellung
Saccharose	10%	Laboreigene Herstellung

## Anhang

### 6.5.6 Reagenzien für RNA-Extraktion

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Chloroform		Laboreigene Herstellung
DEPC-Wasser	Diethyldicarbonat-behandeltes Wasser	Laboreigene Herstellung
Ethanol 80% mit DEPC-Wasser		Laboreigene Herstellung
Kit für RNA-Extraktion	miRNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-freies Wasser	RNase-free water	
Quiazol Lysis Reagent		

### 6.5.7 Reagenzien für real-time-PCR (Exiqon)

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Farbstoff	ROX Reference Dye	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Kit für die cDNA-Synthese	Universal cDNA Synthesis Kit II	Exiqon A/S, Vedbaek, Dänemark
Mastermix	ExiLENT SYBR® Green master mix	
Primer	hsa-let-7d-5p	
	hsa-miR-103a-3p	
	5S rRNA (hsa,mmu) PCR primer set, UniRT	

### 6.5.8 Reagenzien für quantitative real-time-PCR (TaqMan)

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Puffer	10x RT Buffer	TaqMan™ Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
	MgCl <sup>2</sup> 25mM	
Nukleotide	dNTP 10mM	
Primer	Random Hexamers	
	Oligo d(T)	
RNase Inhibitor		

Reverse Transkriptase	MultiScribe	
Destilliertes Wasser	Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Nuclease-free water	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Mastermix für die real-time-PCR	TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Cacna1c Primer	Hs00167681_m1	
18sRNA Primer	Hs99999901_s1	

## 6.5.9 Software

<b>Software</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Literaturverwaltungsprogramm	Endnote X7	Thomson Reuters, New York City, USA
Real-time-PCR Cycler Software	StepOnePlus™ Software v2.3	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
RNA-Messgerät Software	NanoDrop One/ OneC software	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Statistikprogramm	IBM SPSS Statistics 24	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland
Textverarbeitung & Tabellenkalkulation	Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA



## 7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, *4*. doi:10.7554/eLife.05005
- Ali, Z. P. M., Taheri, M., Sangsefidi, S., Arsang-Jang, S., Mazdeh, M., Zamani, A., Ghafouri-Fard, S., & Eftekharian, M. M. (2020). Evaluation of Expression of STAT Genes in Immune-Mediated Polyneuropathies. *J Mol Neurosci*. doi:10.1007/s12031-020-01494-y
- Allen, J. A., & Lewis, R. A. (2015). CIDP diagnostic pitfalls and perception of treatment benefit. *Neurology*, *85*(6), 498-504. doi:10.1212/wnl.0000000000001833
- Aloe, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., & Manni, L. (2012). Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med*, *10*, 239. doi:10.1186/1479-5876-10-239
- Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, *9*(1). doi:10.3390/cells9010137
- Bakkers, M., Merckies, I. S., Lauria, G., Devigili, G., Penza, P., Lombardi, R., Hermans, M. C., van Nes, S. I., De Baets, M., et al. (2009). Intraepidermal nerve fiber density and its application in sarcoidosis. *Neurology*, *73*(14), 1142-1148. doi:10.1212/WNL.0b013e3181bacf05
- Bali, K. K., & Kuner, R. (2014). Noncoding RNAs: key molecules in understanding and treating pain. *Trends Mol Med*, *20*(8), 437-448. doi:10.1016/j.molmed.2014.05.006
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, *50*(4), 237-243. doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.010
- Beppu, M., Sawai, S., Misawa, S., Sogawa, K., Mori, M., Ishige, T., Satoh, M., Nomura, F., & Kuwabara, S. (2015). Serum cytokine and chemokine profiles in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neuroimmunol*, *279*, 7-10. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.12.017
- Bernardo, B. C., Charchar, F. J., Lin, R. C., & McMullen, J. R. (2012). A microRNA guide for clinicians and basic scientists: background and experimental techniques. *Heart Lung Circ*, *21*(3), 131-142. doi:10.1016/j.hlc.2011.11.002
- Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilum, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, *59*(1), S1-6. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015
- Bouhassira, D., Attal, N., Fermanian, J., Alchaar, H., Gautron, M., Masquelier, E., Rostaing, S., Lanteri-Minet, M., Collin, E., et al. (2004). Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain*, *108*(3), 248-257. doi:10.1016/j.pain.2003.12.024

- Brandenburger, T., Castoldi, M., Brendel, M., Grievink, H., Schlosser, L., Werdehausen, R., Bauer, I., & Hermanns, H. (2012). Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain. *Neurosci Lett*, *506*(2), 281-286. doi:10.1016/j.neulet.2011.11.023
- Bremer, J., O'Connor, T., Tiberi, C., Rehrauer, H., Weis, J., & Aguzzi, A. (2010). Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination. *PLoS One*, *5*(8), e12450. doi:10.1371/journal.pone.0012450
- Bril, V., & Perkins, B. A. (2002). Validation of the Toronto Clinical Scoring System for diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care*, *25*(11), 2048-2052.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H., & Lyko, F. (2007). The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, *67*(4), 1419-1423. doi:10.1158/0008-5472.can-06-4074
- Cai, W., Zhao, Q., Shao, J., Zhang, J., Li, L., Ren, X., Su, S., Bai, Q., Li, M., et al. (2018). MicroRNA-182 Alleviates Neuropathic Pain by Regulating Nav1.7 Following Spared Nerve Injury in Rats. *Sci Rep*, *8*(1), 16750. doi:10.1038/s41598-018-34755-3
- Cao, S., Yuan, J., Zhang, D., Wen, S., Wang, J., Li, Y., & Deng, W. (2019). Transcriptome Changes In Dorsal Spinal Cord Of Rats With Neuropathic Pain. *J Pain Res*, *12*, 3013-3023. doi:10.2147/jpr.s219084
- Chang, H. L., Wang, H. C., Chunag, Y. T., Chou, C. W., Lin, I. L., Lai, C. S., Chang, L. L., & Cheng, K. I. (2017). miRNA Expression Change in Dorsal Root Ganglia After Peripheral Nerve Injury. *J Mol Neurosci*, *61*(2), 169-177. doi:10.1007/s12031-016-0876-7
- Chen, H. P., Zhou, W., Kang, L. M., Yan, H., Zhang, L., Xu, B. H., & Cai, W. H. (2014). Intrathecal miR-96 inhibits Nav1.3 expression and alleviates neuropathic pain in rat following chronic constriction injury. *Neurochem Res*, *39*(1), 76-83. doi:10.1007/s11064-013-1192-z
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, *18*(10), 997-1006. doi:10.1038/cr.2008.282
- Chiang, M. C., Lin, Y. H., Pan, C. L., Tseng, T. J., Lin, W. M., & Hsieh, S. T. (2002). Cutaneous innervation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*, *59*(7), 1094-1098.
- Chien, H. F., Tseng, T. J., Lin, W. M., Yang, C. C., Chang, Y. C., Chen, R. C., & Hsieh, S. T. (2001). Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathol*, *102*(5), 455-461.
- Chugh, P., & Dittmer, D. P. (2012). Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *3*(5), 601-616. doi:10.1002/wrna.1120
- Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *Bmj*, *348*, f7656. doi:10.1136/bmj.f7656

- Collins, M. P., Dyck, P. J., Gronseth, G. S., Guillevin, L., Hadden, R. D., Heuss, D., Leger, J. M., Notermans, N. C., Pollard, J. D., et al. (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*(3), 176-184. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00281.x
- Collins, M. P., & Hadden, R. D. (2017). The nonsystemic vasculitic neuropathies. *Nat Rev Neurol*, *13*(5), 302-316. doi:10.1038/nrneurol.2017.42
- D'Amato, C., Morganti, R., Greco, C., Di Gennaro, F., Cacciotti, L., Longo, S., Mataluni, G., Lauro, D., Marfia, G. A., et al. (2016). Diabetic peripheral neuropathic pain is a stronger predictor of depression than other diabetic complications and comorbidities. *Diab Vasc Dis Res*, *13*(6), 418-428. doi:10.1177/1479164116653240
- Dancey, J. E., Dobbin, K. K., Groshen, S., Jessup, J. M., Hruszkewycz, A. H., Koehler, M., Parchment, R., Ratain, M. J., Shankar, L. K., et al. (2010). Guidelines for the development and incorporation of biomarker studies in early clinical trials of novel agents. *Clin Cancer Res*, *16*(6), 1745-1755. doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-2167
- Davies, M., Brophy, S., Williams, R., & Taylor, A. (2006). The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *29*(7), 1518-1522. doi:10.2337/dc05-2228
- Deb, B., Uddin, A., & Chakraborty, S. (2018). miRNAs and ovarian cancer: An overview. *J Cell Physiol*, *233*(5), 3846-3854. doi:10.1002/jcp.26095
- Dellett, M., & Simpson, D. A. (2016). Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*, *16*(4), 407-414. doi:10.1586/14737159.2016.1152184
- Dyck, P. J., Oviatt, K. F., & Lambert, E. H. (1981). Intensive evaluation of referred unclassified neuropathies yields improved diagnosis. *Ann Neurol*, *10*(3), 222-226. doi:10.1002/ana.410100304
- Espinosa-Parrilla, Y., Gonzalez-Billault, C., Fuentes, E., Palomo, I., & Alarcon, M. (2019). Decoding the Role of Platelets and Related MicroRNAs in Aging and Neurodegenerative Disorders. *Front Aging Neurosci*, *11*, 151. doi:10.3389/fnagi.2019.00151
- Fairchild, C. L. A., Cheema, S. K., Wong, J., Hino, K., Simo, S., & La Torre, A. (2019). Let-7 regulates cell cycle dynamics in the developing cerebral cortex and retina. *Sci Rep*, *9*(1), 15336. doi:10.1038/s41598-019-51703-x
- Faraldi, M., Sansoni, V., Perego, S., Gomasasca, M., Kortas, J., Ziemann, E., Banfi, G., & Lombardi, G. (2020). Study of the preanalytical variables affecting the measurement of clinically relevant free-circulating microRNAs: focus on sample matrix, platelet depletion, and storage conditions. *Biochem Med (Zagreb)*, *30*(1), 010703. doi:10.11613/bm.2020.010703

- Favereaux, A., Thoumine, O., Bouali-Benazzouz, R., Roques, V., Papon, M. A., Salam, S. A., Drutel, G., Leger, C., Calas, A., et al. (2011). Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *EMBO J*, 30(18), 3830-3841. doi:10.1038/emboj.2011.249
- Fossat, P., Dobremez, E., Bouali-Benazzouz, R., Favereaux, A., Bertrand, S. S., Kilk, K., Leger, C., Cazalets, J. R., Langel, U., et al. (2010). Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain. *J Neurosci*, 30(3), 1073-1085. doi:10.1523/jneurosci.3145-09.2010
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1), 92-105. doi:10.1101/gr.082701.108
- Fu, X., Zhang, W., Su, Y., Lu, L., Wang, D., & Wang, H. (2016). MicroRNA-103 suppresses tumor cell proliferation by targeting PDCD10 in prostate cancer. *Prostate*, 76(6), 543-551. doi:10.1002/pros.23143
- Gaudet, A. D., Fonken, L. K., Watkins, L. R., Nelson, R. J., & Popovich, P. G. (2017). MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *Neuroscientist*, 1073858417721150. doi:10.1177/1073858417721150
- Genda, Y., Arai, M., Ishikawa, M., Tanaka, S., Okabe, T., & Sakamoto, A. (2013). microRNA changes in the dorsal horn of the spinal cord of rats with chronic constriction injury: A TaqMan(R) Low Density Array study. *Int J Mol Med*, 31(1), 129-137. doi:10.3892/ijmm.2012.1163
- Geng, L., Sun, B., Gao, B., Wang, Z., Quan, C., Wei, F., & Fang, X. D. (2014). MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN. *Int J Mol Sci*, 15(5), 8458-8472. doi:10.3390/ijms15058458
- Gevaert, A. B., Witvrouwen, I., Vrints, C. J., Heidbuchel, H., Van Craenenbroeck, E. M., Van Laere, S. J., & Van Craenenbroeck, A. H. (2018). MicroRNA profiling in plasma samples using qPCR arrays: Recommendations for correct analysis and interpretation. *PLoS One*, 13(2), e0193173. doi:10.1371/journal.pone.0193173
- Gokbuget, D., Pereira, J. A., Bachofner, S., Marchais, A., Ciaudo, C., Stoffel, M., Schulte, J. H., & Suter, U. (2015). The Lin28/let-7 axis is critical for myelination in the peripheral nervous system. *Nat Commun*, 6, 8584. doi:10.1038/ncomms9584
- Gokbuget, D., Pereira, J. A., Opitz, L., Christe, D., Kessler, T., Marchais, A., & Suter, U. (2018). The miRNA biogenesis pathway prevents inappropriate expression of injury response genes in developing and adult Schwann cells. *Glia*, 66(12), 2632-2644. doi:10.1002/glia.23516
- Goransson, L. G., Mellgren, S. I., Lindal, S., & Omdal, R. (2004). The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology*, 62(5), 774-777.
- Grasso, M., Piscopo, P., Confaloni, A., & Denti, M. A. (2014). Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules*, 19(5), 6891-6910. doi:10.3390/molecules19056891

- Han, L. L., Yin, X. R., & Zhang, S. Q. (2018). miR-103 promotes the metastasis and EMT of hepatocellular carcinoma by directly inhibiting LATS2. *Int J Oncol*, 53(6), 2433-2444. doi:10.3892/ijo.2018.4580
- Hanewinkel, R., Drenthen, J., van Oijen, M., Hofman, A., van Doorn, P. A., & Ikram, M. A. (2016). Prevalence of polyneuropathy in the general middle-aged and elderly population. *Neurology*, 87(18), 1892-1898. doi:10.1212/wnl.0000000000003293
- Hartmann, P., Zhou, Z., Natarelli, L., Wei, Y., Nazari-Jahantigh, M., Zhu, M., Grommes, J., Steffens, S., Weber, C., et al. (2016). Endothelial Dicer promotes atherosclerosis and vascular inflammation by miRNA-103-mediated suppression of KLF4. *Nat Commun*, 7, 10521. doi:10.1038/ncomms10521
- Hautzinger, M., Bailer, M., Hofmeister, D., & Keller, F. (2012). *Allgemeine Depressionsskala (ADS)* (Vol. 2). Göttingen: Hogrefe.
- He, Y., Yang, C., Kirkmire, C. M., & Wang, Z. J. (2010). Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid receptor. *J Neurosci*, 30(30), 10251-10258. doi:10.1523/jneurosci.2419-10.2010
- Heuß, D., Haupt, W., Kuntzer, T., Löscher, W., Neundörfer, B., Rautenstrauß, B., Renaud, S., & Sommer, C. (2012). *Diagnostik bei Polyneuropathien* (T. Verlag Ed.). Stuttgart.
- Imai, S., Saeki, M., Yanase, M., Horiuchi, H., Abe, M., Narita, M., Kuzumaki, N., Suzuki, T., & Narita, M. (2011). Change in microRNAs associated with neuronal adaptive responses in the nucleus accumbens under neuropathic pain. *J Neurosci*, 31(43), 15294-15299. doi:10.1523/jneurosci.0921-11.2011
- Jiang, L., Qiao, Y., Wang, Z., Ma, X., Wang, H., & Li, J. (2019). Inhibition of microRNA - 103 attenuates inflammation and endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis through disrupting the PTEN - mediated MAPK signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 235(1), 380-393. doi:10.1002/jcp.28979
- Jin, H. Y., & Park, T. S. (2018). Role of inflammatory biomarkers in diabetic peripheral neuropathy. *J Diabetes Investig*, 9(5), 1016-1018. doi:10.1111/jdi.12794
- Joint Task Force, o. t. E. a. t. P. (2010a). 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. *J Peripher Nerv Syst*, 15(1), 1-9. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00245.x
- Joint Task Force, o. t. E. a. t. P. (2010b). 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(3), 185-195. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00278.x

- Juneja, M., Burns, J., Saporta, M. A., & Timmerman, V. (2019). Challenges in modelling the Charcot-Marie-Tooth neuropathies for therapy development. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *90*(1), 58-67. doi:10.1136/jnnp-2018-318834
- Karki, D. B., Yadava, S. K., Pant, S., Thusa, N., Dangol, E., & Ghimire, S. (2016). Prevalence of Sensory Neuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus and Its Correlation with Duration of Disease. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*, *14*(54), 120-124.
- Katz, M. G., Fagnoli, A. S., Kendle, A. P., Hajjar, R. J., & Bridges, C. R. (2016). The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *310*(5), H528-541. doi:10.1152/ajpheart.00181.2015
- Kim, S. J., Gregersen, P. K., & Diamond, B. (2013). Regulation of dendritic cell activation by microRNA let-7c and BLIMP1. *J Clin Invest*, *123*(2), 823-833. doi:10.1172/jci64712
- Kinter, J., Broglio, L., Steck, A. J., Tolnay, M., Fuhr, P., Latov, N., Kalbermatten, D., Sinnreich, M., Schaeren-Wiemers, N., et al. (2010). Gene expression profiling in nerve biopsy of vasculitic neuropathy. *J Neuroimmunol*, *225*(1-2), 184-189. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.023
- Klimczak, D., Paczek, L., Jazdzewski, K., & Kuch, M. (2015). MicroRNAs: powerful regulators and potential diagnostic tools in cardiovascular disease. *Kardiol Pol*, *73*(1), 1-6. doi:10.5603/KP.a2014.0210
- Koskinen, M., Hietaharju, A., Kylaniemi, M., Peltola, J., Rantala, I., Udd, B., & Haapasalo, H. (2005). A quantitative method for the assessment of intraepidermal nerve fibers in small-fiber neuropathy. *J Neurol*, *252*(7), 789-794. doi:10.1007/s00415-005-0743-x
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, *47*(D1), D155-d162. doi:10.1093/nar/gky1141
- Kusuda, R., Cadetti, F., Ravanelli, M. I., Sousa, T. A., Zanon, S., De Lucca, F. L., & Lucas, G. (2011). Differential expression of microRNAs in mouse pain models. *Mol Pain*, *7*, 17. doi:10.1186/1744-8069-7-17
- Langjahr, M., Schubert, A. L., Sommer, C., & Uceyler, N. (2018). Increased pro-inflammatory cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with polyneuropathies. *J Neurol*. doi:10.1007/s00415-018-8748-4
- Larrea, E., Sole, C., Manterola, L., Goicoechea, I., Armesto, M., Arestin, M., Caffarel, M. M., Araujo, A. M., Araiz, M., et al. (2016). New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci*, *17*(5). doi:10.3390/ijms17050627
- Lauria, G., Cornblath, D. R., Johansson, O., McArthur, J. C., Mellgren, S. I., Nolano, M., Rosenberg, N., & Sommer, C. (2005). EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol*, *12*(10), 747-758. doi:10.1111/j.1468-1331.2005.01260.x

- Lauria, G., Holland, N., Hauer, P., Cornblath, D. R., Griffin, J. W., & McArthur, J. C. (1999). Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *J Neurol Sci*, *164*(2), 172-178.
- Lauria, G., Hsieh, S. T., Johansson, O., Kennedy, W. R., Leger, J. M., Mellgren, S. I., Nolano, M., Merkies, I. S., Polydefkis, M., et al. (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*(7), 903-912, e944-909. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03023.x
- Lee, G., Xiang, Z., Brannagan, T. H., 3rd, Chin, R. L., & Latov, N. (2010). Differential gene expression in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) skin biopsies. *J Neurol Sci*, *290*(1-2), 115-122. doi:10.1016/j.jns.2009.10.006
- Lee, J. E., Shun, C. T., Hsieh, S. C., & Hsieh, S. T. (2005). Skin denervation in vasculitic neuropathy. *Arch Neurol*, *62*(10), 1570-1573. doi:10.1001/archneur.62.10.1570
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Lees, J. G., Fivelman, B., Duffy, S. S., Makker, P. G., Perera, C. J., & Moalem-Taylor, G. (2015). Cytokines in Neuropathic Pain and Associated Depression. *Mod Trends Pharmacopsychiatry*, *30*, 51-66. doi:10.1159/000435932
- Lehmann, S. M., Kruger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., et al. (2012). An unconventional role for miRNA: *let-7* activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*, *15*(6), 827-835. doi:10.1038/nn.3113
- Leinders, M., Uceyler, N., Thomann, A., & Sommer, C. (2017). Aberrant microRNA expression in patients with painful peripheral neuropathies. *J Neurol Sci*, *380*, 242-249. doi:10.1016/j.jns.2017.07.041
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
- Lewis, R. A. (2017). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Curr Opin Neurol*, *30*(5), 508-512. doi:10.1097/WCO.0000000000000481
- Li, H., Shen, L., Ma, C., & Huang, Y. (2013). Differential expression of miRNAs in the nervous system of a rat model of bilateral sciatic nerve chronic constriction injury. *Int J Mol Med*, *32*(1), 219-226. doi:10.3892/ijmm.2013.1381
- Li, R., Liang, P., Yuan, J., & He, F. (2019). Exosomal miR-103a-3p ameliorates LPS-induced immune response in BEAS-2B cells via NF-kappaB pathway by targeting TBL1XR1. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. doi:10.1111/1440-1681.13241

## Literaturverzeichnis

- Li, S., Wang, X., Gu, Y., Chen, C., Wang, Y., Liu, J., Hu, W., Yu, B., Wang, Y., et al. (2015). Let-7 microRNAs regenerate peripheral nerve regeneration by targeting nerve growth factor. *Mol Ther*, 23(3), 423-433. doi:10.1038/mt.2014.220
- Li, Z., & Rana, T. M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 13(8), 622-638. doi:10.1038/nrd4359
- Lichtenstein, T., Sprenger, A., Weiss, K., Slebocki, K., Cervantes, B., Karampinos, D., Maintz, D., Fink, G. R., Henning, T. D., et al. (2018). MRI biomarkers of proximal nerve injury in CIDP. *Ann Clin Transl Neurol*, 5(1), 19-28. doi:10.1002/acn3.502
- Lin, C. R., Chen, K. H., Yang, C. H., Huang, H. W., & Sheen-Chen, S. M. (2014). Intrathecal miR-183 delivery suppresses mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *Eur J Neurosci*, 39(10), 1682-1689. doi:10.1111/ejn.12522
- Liu, J., Jia, E., Shi, H., Li, X., Jiang, G., Chi, C., Liu, W., & Zhang, D. (2019). Selection of reference genes for miRNA quantitative PCR and its application in miR-34a/Sirtuin-1 mediated energy metabolism in *Megalobrama amblycephala*. *Fish Physiol Biochem*, 45(5), 1663-1681. doi:10.1007/s10695-019-00658-x
- Lopez-Gonzalez, M. J., Landry, M., & Favereaux, A. (2017). MicroRNA and chronic pain: From mechanisms to therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, 180, 1-15. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.06.001
- Lorenzen, J., Kumarswamy, R., Dangwal, S., & Thum, T. (2012). MicroRNAs in diabetes and diabetes-associated complications. *RNA Biol*, 9(6), 820-827. doi:10.4161/rna.20162
- Lu, Q., Ma, Z., Ding, Y., Bedarida, T., Chen, L., Xie, Z., Song, P., & Zou, M. H. (2019). Circulating miR-103a-3p contributes to angiotensin II-induced renal inflammation and fibrosis via a SNRK/NF-kappaB/p65 regulatory axis. *Nat Commun*, 10(1), 2145. doi:10.1038/s41467-019-10116-0
- Luna, J. M., Scheel, T. K., Danino, T., Shaw, K. S., Mele, A., Fak, J. J., Nishiuchi, E., Takacs, C. N., Catanese, M. T., et al. (2015). Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell*, 160(6), 1099-1110. doi:10.1016/j.cell.2015.02.025
- Luo, M., Xu, C., Luo, Y., Wang, G., Wu, J., & Wan, Q. (2019). Circulating miR-103 family as potential biomarkers for type 2 diabetes through targeting CAV-1 and SFRP4. *Acta Diabetol*. doi:10.1007/s00592-019-01430-6
- Lutz, B. M., Bekker, A., & Tao, Y. X. (2014). Noncoding RNAs: new players in chronic pain. *Anesthesiology*, 121(2), 409-417. doi:10.1097/aln.0000000000000265
- Ma, C., Nguyen, H. P. T., Luwor, R. B., Stylli, S. S., Gogos, A., Paradiso, L., Kaye, A. H., & Morokoff, A. P. (2018). A comprehensive meta-analysis of circulation miRNAs in glioma as potential diagnostic biomarker. *PLoS One*, 13(2), e0189452. doi:10.1371/journal.pone.0189452

- Manni, L., Rocco, M. L., Bianchi, P., Soligo, M., Guaragna, M., Barbaro, S. P., & Aloe, L. (2013). Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*, 31(4), 115-122. doi:10.3109/08977194.2013.804073
- Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, 383(6603), 819-823. doi:10.1038/383819a0
- McArthur, J. C., Stocks, E. A., Hauer, P., Cornblath, D. R., & Griffin, J. W. (1998). Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol*, 55(12), 1513-1520.
- Merkies, I. S., & Kieseier, B. C. (2016). Fatigue, Pain, Anxiety and Depression in Guillain-Barre Syndrome and Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *Eur Neurol*, 75(3-4), 199-206. doi:10.1159/000445347
- Merkies, I. S., Schmitz, P. I., van der Meche, F. G., Samijn, J. P., & van Doorn, P. A. (2002). Clinimetric evaluation of a new overall disability scale in immune mediated polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72(5), 596-601.
- Merkies, I. S., Schmitz, P. I., Van Der Meche, F. G., & Van Doorn, P. A. (2003). Comparison between impairment and disability scales in immune-mediated polyneuropathies. *Muscle Nerve*, 28(1), 93-100. doi:10.1002/mus.10410
- Nair, V. S., Maeda, L. S., & Ioannidis, J. P. (2012). Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *J Natl Cancer Inst*, 104(7), 528-540. doi:10.1093/jnci/djs027
- Ni, J., Wang, X., Chen, S., Liu, H., Wang, Y., Xu, X., Cheng, J., Jia, J., & Zhen, X. (2015). MicroRNA let-7c-5p protects against cerebral ischemia injury via mechanisms involving the inhibition of microglia activation. *Brain Behav Immun*, 49, 75-85. doi:10.1016/j.bbi.2015.04.014
- Niederberger, E., Kynast, K., Lotsch, J., & Geisslinger, G. (2011). MicroRNAs as new players in the pain game. *Pain*, 152(7), 1455-1458. doi:10.1016/j.pain.2011.01.042
- Orlova, I. A., Alexander, G. M., Qureshi, R. A., Sacan, A., Graziano, A., Barrett, J. E., Schwartzman, R. J., & Ajit, S. K. (2011). MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome. *J Transl Med*, 9, 195. doi:10.1186/1479-5876-9-195
- Pan, C. L., Tseng, T. J., Lin, Y. H., Chiang, M. C., Lin, W. M., & Hsieh, S. T. (2003). Cutaneous innervation in Guillain-Barre syndrome: pathology and clinical correlations. *Brain*, 126(Pt 2), 386-397.
- Pathak, A. K., Bhutani, M., Kumar, S., Mohan, A., & Guleria, R. (2006). Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem*, 52(10), 1833-1842. doi:10.1373/clinchem.2005.062893

- Peltier, H. J., & Latham, G. J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *Rna*, *14*(5), 844-852. doi:10.1261/rna.939908
- Pereira, J. A., Baumann, R., Norrmen, C., Somandin, C., Mieke, M., Jacob, C., Luhmann, T., Hall-Bozic, H., Mantei, N., et al. (2010). Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J Neurosci*, *30*(19), 6763-6775. doi:10.1523/JNEUROSCI.0801-10.2010
- Picon, A. P., Ortega, N. R., Watari, R., Sartor, C., & Sacco, I. C. (2012). Classification of the severity of diabetic neuropathy: a new approach taking uncertainties into account using fuzzy logic. *Clinics (Sao Paulo)*, *67*(2), 151-156.
- Podnar, S. (2018). Contribution of ultrasonography to the evaluation of peripheral nerve disorders. *Neurophysiol Clin*. doi:10.1016/j.neucli.2018.01.001
- Puttini, S., Panaite, P. A., Mermod, N., Renaud, S., Steck, A. J., & Kuntzer, T. (2014). Gene expression changes in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy skin biopsies. *J Neuroimmunol*, *270*(1-2), 61-66. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.03.002
- Qiu, Y., Zhang, T. J., Meng, L. B., Cheng, X. T., & Hua, Z. (2020). Bioinformatics analysis of gene and microRNA targets for fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol*.
- Radat, F., Margot-Duclot, A., & Attal, N. (2013). Psychiatric co-morbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicentre cohort study. *Eur J Pain*, *17*(10), 1547-1557. doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00334.x
- Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, *18*(10), 505-516. doi:10.1016/j.tcb.2008.07.007
- Rudolph, T., & Farbu, E. (2007). Hospital-referred polyneuropathies--causes, prevalences, clinical- and neurophysiological findings. *Eur J Neurol*, *14*(6), 603-608. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01758.x
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*, *16*(3), 203-222. doi:10.1038/nrd.2016.246
- Sakai, A., Saitow, F., Miyake, N., Miyake, K., Shimada, T., & Suzuki, H. (2013). miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, *136*(Pt 9), 2738-2750. doi:10.1093/brain/awt191
- Schaefer, A., O'Carroll, D., Tan, C. L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., & Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med*, *204*(7), 1553-1558. doi:10.1084/jem.20070823
- Schubert, A. L., Held, M., Sommer, C., & Uceyler, N. (2019). Reduced gene expression of netrin family members in skin and sural nerve specimens of patients with painful peripheral neuropathies. *J Neurol*, *266*(11), 2812-2820. doi:10.1007/s00415-019-09496-6

- Schwarzenbach, H., da Silva, A. M., Calin, G., & Pantel, K. (2015). Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem*, 61(11), 1333-1342. doi:10.1373/clinchem.2015.239459
- Shin, V. Y., & Chu, K. M. (2014). MiRNA as potential biomarkers and therapeutic targets for gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 20(30), 10432-10439. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10432
- Singh, R., Ramasubramanian, B., Kanji, S., Chakraborty, A. R., Haque, S. J., & Chakravarti, A. (2016). Circulating microRNAs in cancer: Hope or hype? *Cancer Lett*, 381(1), 113-121. doi:10.1016/j.canlet.2016.07.002
- Sommer, C. (2018). Nerve and skin biopsy in neuropathies. *Curr Opin Neurol*, 31(5), 534-540. doi:10.1097/wco.0000000000000601
- Sommer, C., Gold, R., Heuss, D., Kiefer, R., Koeppen, S., Meyer zu Hörste, G., Schlotter-Weigel, B., Stoll, G., Tackenberg, B., et al. (2018). *Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden*.
- Sommer, C., Richter, H., Rogausch, J. P., 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. doi:10.1186/1471-2377-11-104
- Sommer, C., & Toyka, K. (2011). Nerve biopsy in chronic inflammatory neuropathies: in situ biomarkers. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1, 24-29. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00301.x
- Stahlhut, C., & Slack, F. J. (2015). Combinatorial Action of MicroRNAs let-7 and miR-34 Effectively Synergizes with Erlotinib to Suppress Non-small Cell Lung Cancer Cell Proliferation. *Cell Cycle*, 14(13), 2171-2180. doi:10.1080/15384101.2014.1003008
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2003). Identification of Drosophila MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 1(3), E60. doi:10.1371/journal.pbio.0000060
- Stavast, C. J., & Erkeland, S. J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, 8(11). doi:10.3390/cells8111465
- Steck, A. J., Kinter, J., & Renaud, S. (2011). Differential gene expression in nerve biopsies of inflammatory neuropathies. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1, 30-33. doi:10.1111/j.1529-8027.2011.00302.x
- Sun, L., Yao, Y., Liu, B., Lin, Z., Lin, L., Yang, M., Zhang, W., Chen, W., Pan, C., et al. (2012). MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1. *Oncogene*, 31(4), 432-445. doi:10.1038/onc.2011.263
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res*, 76(13), 3666-3670. doi:10.1158/0008-5472.can-16-0359
- Thomas, M., Lieberman, J., & Lal, A. (2010). Desperately seeking microRNA targets. *Nat Struct Mol Biol*, 17(10), 1169-1174. doi:10.1038/nsmb.1921

- Titze-de-Almeida, R., David, C., & Titze-de-Almeida, S. S. (2017). The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharmaceutical Research*, *34*(7), 1339-1363. doi:10.1007/s11095-017-2134-2
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, M. H., & Stoffel, M. (2011). MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, *474*(7353), 649-653. doi:10.1038/nature10112
- Tricaud, N., & Park, H. T. (2017). Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. *Cell Mol Life Sci*, *74*(22), 4049-4057. doi:10.1007/s00018-017-2565-2
- Üçeyler, N., Riediger, N., Kafke, W., & Sommer, C. (2015). Differential gene expression of cytokines and neurotrophic factors in nerve and skin of patients with peripheral neuropathies. *J Neurol*, *262*(1), 203-212. doi:10.1007/s00415-014-7556-8
- Üçeyler, N., Rogausch, J. P., Toyka, K. V., & Sommer, C. (2007). Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*, *69*(1), 42-49. doi:10.1212/01.wnl.0000265062.92340.a5
- Umapathi, T., Tan, W. L., Tan, N. C., & Chan, Y. H. (2006). Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve*, *33*(6), 742-746. doi:10.1002/mus.20528
- van den Berg, M. M. J., Krauskopf, J., Ramaekers, J. G., Kleinjans, J. C. S., Prickaerts, J., & Briede, J. J. (2020). Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, *185*, 101732. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101732
- Vashisht, A., & Gahlay, G. K. (2020). Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility - opportunities and challenges. *Molecular Human Reproduction*. doi:10.1093/molehr/gaaa016/5743508
- Viader, A., Chang, L. W., Fahrner, T., Nagarajan, R., & Milbrandt, J. (2011). MicroRNAs modulate Schwann cell response to nerve injury by reinforcing transcriptional silencing of dedifferentiation-related genes. *J Neurosci*, *31*(48), 17358-17369. doi:10.1523/JNEUROSCI.3931-11.2011
- Visser, N. A., Notermans, N. C., Linssen, R. S., van den Berg, L. H., & Vrancken, A. F. (2015). Incidence of polyneuropathy in Utrecht, the Netherlands. *Neurology*, *84*(3), 259-264. doi:10.1212/wnl.0000000000001160
- Von Korff, M., Crane, P., Lane, M., Miglioretti, D. L., Simon, G., Saunders, K., Stang, P., Brandenburg, N., & Kessler, R. (2005). Chronic spinal pain and physical-mental comorbidity in the United States: results from the national comorbidity survey replication. *Pain*, *113*(3), 331-339. doi:10.1016/j.pain.2004.11.010
- Vrancken, A. F., Notermans, N. C., Jansen, G. H., Wokke, J. H., & Said, G. (2004). Progressive idiopathic axonal neuropathy--a comparative clinical and histopathological study with vasculitic neuropathy. *J Neurol*, *251*(3), 269-278. doi:10.1007/s00415-004-0275-9

- Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Wang, X., Liu, N., & You, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett*, 3(5), 955-960. doi:10.3892/ol.2012.609
- Wang, X., Chen, Q., Yi, S., Liu, Q., Zhang, R., Wang, P., Qian, T., & Li, S. (2019). The microRNAs let-7 and miR-9 down-regulate the axon-guidance genes Ntn1 and Dcc during peripheral nerve regeneration. *J Biol Chem*, 294(10), 3489-3500. doi:10.1074/jbc.RA119.007389
- Wang, X., Lin, Y., Peng, L., Sun, R., Gong, X., Du, J., & Zhang, X. (2018). MicroRNA-103 promotes proliferation and inhibits apoptosis in spinal osteosarcoma cells by targeting p57. *Oncol Res*. doi:10.3727/096504017x15144741233346
- Wiggins, J. F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Patrawala, L., Brown, D., & Bader, A. G. (2010). Development of a lung cancer therapeutic based on the tumor suppressor microRNA-34. *Cancer Res*, 70(14), 5923-5930. doi:10.1158/0008-5472.can-10-0655
- Wilfred, B. R., Wang, W. X., & Nelson, P. T. (2007). Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab*, 91(3), 209-217. doi:10.1016/j.ymgme.2007.03.011
- Wojciechowska, A., Braniewska, A., & Kozar-Kaminska, K. (2017). MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv Clin Exp Med*, 26(5), 865-874. doi:10.17219/acem/62915
- Woolf, C. J., & Salter, M. W. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288(5472), 1765-1769.
- Wu, D., Raafat, A., Pak, E., Clemens, S., & Murashov, A. K. (2012). Dicer-microRNA pathway is critical for peripheral nerve regeneration and functional recovery in vivo and regenerative axonogenesis in vitro. *Exp Neurol*, 233(1), 555-565. doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.041
- Yang, X., Zhang, Q., Zhang, M., Su, W., Wang, Z., Li, Y., Zhang, J., Beer, D. G., Yang, S., et al. (2019). Serum microRNA Signature Is Capable of Early Diagnosis for Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Biol Sci*, 15(8), 1712-1722. doi:10.7150/ijbs.33986
- Ye, Y., Xu, H., Su, X., & He, X. (2016). Role of MicroRNA in Governing Synaptic Plasticity. *Neural Plast*, 2016, 4959523. doi:10.1155/2016/4959523
- Yi, B., Piazza, G. A., Su, X., & Xi, Y. (2013). MicroRNA and cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)*, 6(5), 401-409. doi:10.1158/1940-6207.capr-13-0032
- Yun, B., Andereg, A., Menichella, D., Wrabetz, L., Feltri, M. L., & Awatramani, R. (2010). MicroRNA-deficient Schwann cells display congenital hypomyelination. *J Neurosci*, 30(22), 7722-7728. doi:10.1523/jneurosci.0876-10.2010
- Zehir, A., Hua, L. L., Maska, E. L., Morikawa, Y., & Cserjesi, P. (2010). Dicer is required for survival of differentiating neural crest cells. *Dev Biol*, 340(2), 459-467. doi:10.1016/j.ydbio.2010.01.039

- Zhang, C., Ward, J., Dauch, J. R., Tanzi, R. E., & Cheng, H. T. (2018). Cytokine-mediated inflammation mediates painful neuropathy from metabolic syndrome. *PLoS One*, *13*(2), e0192333. doi:10.1371/journal.pone.0192333
- Zhang, L., Li, H., Yuan, M., Li, D., Sun, C., & Wang, G. (2020). Serum Exosomal MicroRNAs as Potential Circulating Biomarkers for Endometriosis. *Dis Markers*, *2020*, 2456340. doi:10.1155/2020/2456340
- Zhang, M., Liu, F., Jia, H., Zhang, Q., Yin, L., Liu, W., Li, H., Yu, B., & Wu, J. (2011). Inhibition of microRNA let-7i depresses maturation and functional state of dendritic cells in response to lipopolysaccharide stimulation via targeting suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol*, *187*(4), 1674-1683. doi:10.4049/jimmunol.1001937
- Zhang, T. J., Qiu, Y., & Hua, Z. (2019). The Emerging Perspective of Morphine Tolerance: MicroRNAs. *Pain Res Manag*, *2019*, 9432965. doi:10.1155/2019/9432965
- Zhang, W., Deng, W., & Wang, Y. (2019). microRNA-103 promotes LPS-induced inflammatory injury by targeting c-Myc in HK-2 cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, *47*(1), 2791-2799. doi:10.1080/21691401.2019.1636806
- Zheng, Y. B., Xiao, K., Xiao, G. C., Tong, S. L., Ding, Y., Wang, Q. S., Li, S. B., & Hao, Z. N. (2016). MicroRNA-103 promotes tumor growth and metastasis in colorectal cancer by directly targeting LATS2. *Oncol Lett*, *12*(3), 2194-2200. doi:10.3892/ol.2016.4814
- Zis, P., Sarrigiannis, P. G., Rao, D. G., Hewamadduma, C., & Hadjivassiliou, M. (2016). Chronic idiopathic axonal polyneuropathy: a systematic review. *J Neurol*, *263*(10), 1903-1910. doi:10.1007/s00415-016-8082-7

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

- Frau Prof. Dr. Nurcan Üçeyler für die Vergabe des Dissertationsthemas und die engagierte Betreuung während der Patientenrekrutierung und der laborchemischen Arbeit sowie für das Korrekturlesen der Dissertationsschrift.
- Frau Prof. Dr. Claudia Sommer für alle konstruktiven, hilfreichen Ratschläge und die Unterstützung während der gesamten Dissertation.
- Allen Mitarbeitern des histologischen Labors und den Arbeitsgruppen Üçeyler und Sommer für die gute Einarbeitung, allzeit offene Ohren für Fragen und die herzliche Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Sonja Mildner, Daniela Urlaub und Dr. Franziska Karl.
- Meinem Kollegen Philipp Köberle für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Patienten.
- Meiner Familie und meinen Freunden für die unerschöpfliche Motivation und Unterstützung.