

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung zellfreier DNA auf epigenetische Biomarker bei Small Fiber
Neuropathie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Susanne Kristin Messer
aus Bad Kreuznach

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Prawitt

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F. Birklein

Tag der Promotion: 18. März 2024

Für meine Mutter.

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis:.....	I
Abbildungsverzeichnis:.....	XII
Tabellenverzeichnis:.....	XIV
1 Einleitung/ Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Epigenetik.....	2
2.2 DNA-Methylierung	2
2.3 Neuropsychologische Grundlagen	7
2.4 Neuropathie	14
2.5 Small Fiber Neuropathie.....	18
2.6 Zellfreie DNA als epigenetischer Biomarker.....	37
2.7 Zielsetzung.....	42
3 Methoden.....	44
3.1 Übersicht über die untersuchten Proben.....	44
3.2 Isolation von zellfreier DNA aus Plasma.....	45
3.3 Messung der DNA-Konzentration mittels <i>NanoDrop</i>	47
3.4 Bisulfit-Konversion der DNA.....	48
3.5 PCR (Polymerase Ketten Reaktion)	49
3.5.1 PCR-Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA.....	51
3.5.2 PCR zur Amplifikation der Klone.....	55
3.6 Agarose- Gelelektrophorese	56
3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese der <i>Inner</i> -PCR	57
3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese der M13-PCR	58
3.7 Klonierung	58
3.7.1 Ansetzen der Medien und des Agars.....	58
3.7.2 Ligation der PCR-Produkte	59
3.7.3 Transformation von Escherichia Coli (XL 10-Gold Bakterien)	60
3.7.4 Blau-Weiß-Selektion.....	60
3.8 SAP-Aufreinigung der Klone	62
3.9 Sequenzierung:.....	62
3.9.1 Sequenzierreaktion:	62
3.9.2 DNA-Fällung:.....	62
3.9.3 Sequenzierung:.....	63

3.10	Isolation und <i>Purification</i> der Hautstanz-Biopsie-Proben	64
3.10.1	DNA-Isolation aus Hautstanzbiopsien	64
3.10.2	<i>Purification</i> der Proteinase-K-Gewebeproben	65
4	Material:	66
4.1	Chemikalien und Reagenzien	66
4.2	Lösungen und Puffer	67
4.3	Molekulargewichtstandards.....	67
4.4	Primer	68
4.5	Geräte.....	68
4.6	Verbrauchsmaterial	70
5	Ergebnisse	72
5.2	PCR zur Amplifikation der Klone der Blutplasma-Proben	76
5.3	Bestimmung der Effizienz der Bisulfit-Konversion	79
5.4	PCR zur Amplifikation der Klone der Biopsie-Proben.....	81
5.6	Methylierungs- <i>content</i>	85
5.7	Methylierungslevel und Profil der Methylierungslevel.....	88
5.8	Methylierungsmuster und Profil der Methylierungsmuster	101
6	Diskussion.....	119
6.1	Methodische Aspekte.....	120
6.2	Analyse der individuellen Patienten-Informationen	130
6.3	Analyse der DNA-Methylierungsunterschiede.....	131
6.3.1	Methylierungs- <i>content</i>	131
6.3.2	Methylierungslevel.....	134
6.3.3	Methylierungsmuster	146
6.4	Validität der Biopsie-Proben	152
6.5	Hautstanzbiopsie vs. Sanger Sequenzierung der cfDNA aus Blutplasma-Proben.....	153
6.6	Ausblick	157
7	Zusammenfassung.....	159
	Literaturverzeichnis:.....	161
	Danksagung:	166
	Tabellarischer Lebenslauf.....	167

Abkürzungsverzeichnis:

%	Prozent
&	und
<	kleiner
>	größer
≤	kleiner gleich
≥	größer gleich
x	Multiplikationszeichen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5cac	5-Carboxycytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
Ach	Acetylcholin
AG	Arbeitsgemeinschaft
ANNA -1	antinukleäre neuronale Antikörper
AP	Aktionspotenzial
AP	<i>apurinic/ apyrimidinic</i>
ATP	Adenosintriphosphat

ATPase	Adenosintriphosphatasen
bp	Basenpaare
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BTX	Botulinum Toxin
C	Cytosin
ca.	zirka
Ca	Calcium
CA	Carcinom
ccfNA	zirkulierende zellfreie Nukleinsäure
CCM	korneale konfokale Mikroskopie
CD4+	<i>Cluster of Differentiation 4+</i>
CDT	<i>Cold Detection Threshold</i>
cf	zellfrei
cfBisDNA	zellfreie bisulfitbehandelte DNA
cfDNA	zellfreie DNA
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CHEP	kontakthitzeevozierte Potenziale/ <i>contact</i> <i>heat evoked potentials</i>
chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CNA	zirkulierende Nukleinsäure (QIAgen Kit)
CNBD	Anzahl der Verästelungspunkte kornealer Nerven/ <i>corneal nerve branch density</i>

CNFD	korneale Nervenfaserdichte
CNFL	korneale Nervenfaserlänge
CNFT	korneale Nervenfaser-Tortuosität
CNS	central nervous system
CpG	5'-C-Phosphat-G-3
CPT	<i>Cold Pain Threshold</i>
ctDNA	zirkulierende Tumor Desoxyribonukleinsäure
d	<i>day</i>
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i>
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat
ddATP	Didesoxy-Adenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxy-Cytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxy-Guanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxy-Thymidintriphosphat
DFNS	Deutscher Forschungsverbund Neuropathischer Schmerzen
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMA	<i>Dynamic Mechanical Allodynia</i>
DMR	differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>

Dr. med.	Doktor der Medizin
Dr. rer. Nat.	Doktor der Naturwissenschaft
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EPSP	erregendes postsynaptisches Potenzial
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
e.V.	eingetragener Verein
F	Forward
Fe	Ferrum
FSAP	Faktor VII aktivierende Proteine
g	Gramm
G	Guanin
GAP43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HbA1c	Hämoglobin A1c
HCL	Salzsäure

HCP	<i>High CpG Content Promoters</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HNO	Hals-Nasen-Ohren (Arzt)
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HPT	<i>Heat Pain Threshold</i>
HWZ	Halbwertszeit
ICP	<i>intermediate CpG content promoters</i>
i.d.R.	in der Regel
IENFD	intraepidermale Nervenfasern Dichte
iF	<i>inner Forward (Primer)</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Inc.	<i>Incorporation</i>
insg.	insgesamt
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
iR	<i>inner Reverse (Primer)</i>
K, K ⁺	Kalium
K	Kontrolle
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LDI	<i>Laser Doppler Imaging</i>
LEP	laserevozierte Potenziale

LCP	<i>low CpG content promoters</i>
m	Meter
m/s	Meter/ Sekunde
M	Mol
M.	Morbus
mA	Milliampere
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDT	<i>Mechanical Detection Threshold</i>
Me	Methylierung
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	Micro Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimol
MPO	Myeloperoxidase
MPS	<i>Mechanical Pain Detection</i>
MPT	<i>Mechanical Pain Threshold</i>
MRI	<i>Magnet Resonance Imaging</i>
ms	Millisekunde
MS	Methylierungsstelle
MSP	Methylierungsspezifische PCR

mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
N.	Nervus
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na _v	spannungsgesteuerter Natriumkanal
n.d.	<i>no date</i>
NEB	<i>New England Biolabs GmbH</i>
NET	<i>Neutrophil Extrazellular Trap</i>
NeuPSIG	<i>Neuropathic Pain Special Interest Group</i>
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
nm	Nanometer
NPSI	<i>Neuropathic Pain Symptom Inevntory</i>
NRS	Numerische Ratingskala
NS	Nervensystem
NSCLC	nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom/ <i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
oF	<i>outer Forward (Primer)</i>
o.g.	oben genannt
oGTT	oraler Glucosetoleranztest
OH	Hydroxid
oR	<i>outer Reverse (Primer)</i>
p	kurzer Arm eines Chromosoms

P	Patient
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGP 9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
pH	Potenzial des Wasserstoffs: potentia hydrogenii
PHS	<i>Paradoxical Heat Sensation</i>
PNP	Polyneuropathie
PNS	Peripheres Nervensystem
Pol	Polymerase
PPT	<i>Pressure Pain Threshold</i>
PREP	schmerzevozierte Potenziale/ <i>pain-related evoked potentials</i>
Prof.	Professor
Q	langer Arm eines Chromosoms
QSART	Quantitativer sudomotorischer Axonreflex
QST	Quantitative sensorische Testung
R	<i>Reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Segment
SAP	<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase
SCN-A	<i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha</i>

	<i>Subunit</i>
SEP	somatosensorisch evozierte Potenziale
SFN	<i>Small Fiber Neuropathie</i>
siRNA	<i>small interfering</i> Ribonukleinsäure
SO ₃	Schwefeltrioxid
SOB	Super Optimal Broth
S.O.C.	Super Optimal Broth: SOB-Medium mit 20 mM Glucose
SSNRI	selektive Serotonin und Noradrenalin <i>Reuptake Inhibitoren</i>
SSR	sympathische Hautantwort/ <i>sympathic skin response</i>
St.	Sankt
s.u.	siehe untern
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TATA	DNA-Sequenz in der Promotor-Region mit der Konsensus-Sequenz 5'-TATAAA-3'
TaqPol	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA (-Puffer)
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TDG	Thymin-DNA-Glycosylase
TET-Enzym	ten eleven translocation Enzym
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrose Faktor α

TpG	5'-Thymin-Phosphat-G-3'
TrisHCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV1-Rezeptor	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1</i>
TSH	Thyeroidea stimulierendes Hormon
TSL	<i>Thermal Sensory Limen</i>
TST	thermoregulatorische Schweißtestung
U	unmethylierte
u.a.	unter anderem
UHRF1-Protein	<i>ubiquitin-like containing P H D and ring finger Domains</i>
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
U.S.	<i>United States</i>
u.U.	unter Umständen
UV	ultra violett
ÜN	Über Nacht
V	Volt
v	spannungsabhängig/ <i>voltage</i>
v. a.	vor allem
VDT	<i>Vibration Detection Threshold</i>
WDT	<i>Warm Detection Threshold</i>
WUR	<i>Wind up ratio</i>
X	unklarer Methylierungsstatus
x g	Zentrifugalbeschleunigung
X-Gal /BCIG	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-

galactopyranoside

z. B.

zum Beispiel

ZNS

Zentrales Nervensystem

z. T.

zum Teil

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Die Modifizierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin durch die DNA-Methyltransferasen sowie dessen verschiedene oxidative Derivate, entstehend durch die TET-Enzyme (Walter 2018).....	3
Abbildung 2: Bisulfitumwandlung; Sulfonierung des Cytosins zu Cytosin-Sulfonat mittels Natriumbisulfit, die Desaminierung zu Uracil-Sulfonat und dessen Desulfonierung zu Uracil sowie die Darstellung, dass 5mC und 5hmC nicht mit dem Natriumbisulfit reagieren (Williams et al., 2019).	6
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Neurons (Hoth and Rettig 2021)	7
Abbildung 4: Übersicht über den Ablauf eines Aktionspotenzials (Draguhn 2019).....	8
Abbildung 5: Aufbau und Struktur von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen (Draguhn 2019).....	9
Abbildung 6: Blockade des spannungsabhängigen Natriumkanals durch die intrazelluläre Domäne (Draguhn 2019).....	9
Abbildung 7: Kontinuierliche Weiterleitung eines Aktionspotenzials in einer nicht myelinisierten Nervenfasern (Draguhn 2019).	11
Abbildung 8: Saltatorische Erregungsweiterleitung von Schnürring zu Schnürring, an welchem jeweils ein Aktionspotenzial entsteht (Draguhn 2019).....	12
Abbildung 9: Vorgehen und Algorithmus bei der Diagnose der SFN (Themistocleous, Ramirez et al. 2014)	27
Abbildung 10: Skizzenhafter Überblick über die Innervation der Haut (Tavee 2018).....	28
Abbildung 11: Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Hautstanzbiopsie einer gesunden Kontrollperson A und eines Patienten mit SFN B.	29
Abbildung 12: Vergleich der CFND bei einer gesunden Kontrollperson A mit einer an SFN erkrankten Person B in der CCM (Tavee 2018).....	33
Abbildung 13: Aufbau des pGEM T-Vektors von Promega (Promega Corporation, 2021)	61
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung für die Auswahl der <i>Primer</i> anhand der in dieser Arbeit SCN9A2 genannten Sequenz des Gens SCN9A nach der Bisulfit-Konversion.....	74
Abbildung 15: Bild der Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten und Bisulfit-konvertierten Plasma-DNA-Proben.	75
Abbildung 16: Bild der Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten und Bisulfit-konvertierten Plasma-DNA-Proben mit uneindeutigem Ergebnis für die Probe 11A3.....	76
Abbildung 17: Exemplarischer Bildausschnitt einer Gelelektrophorese von SCN9A2 der Kontrolle K1.....	77
Abbildung 18: Effizienz der Bisulfit-Konversion der drei Blutplasma-Kontroll-Proben.....	80
Abbildung 19: Effizienz der Bisulfit-Konversion der Blutplasma-Patientenproben.	81

Abbildung 20: Bild der Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten und Bisulfit-konvertierten Biopsie-Proben der Loci 9A1 P2 Biopsie, 9A2 P2 Biopsie, 9A1 P3 Biopsie, 9A2 P3 Biopsie, 11A1 P1 Biopsie und 10A2 P1 Biopsie.....	82
Abbildung 21: Schematische Darstellung der Analysemöglichkeiten der DNA-Methylierung (Siegmund and Laird, 2002).	85
Abbildung 22: Übersicht über das Methylierungslevel des 1. CpG-Dinukleotids von SCN9A1 der Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie.....	89
Abbildung 23: Übersicht über das Methylierungslevel des 2. CpG-Dinukleotids von SCN9A1 der Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie.....	90
Abbildung 24: Übersicht über das Methylierungslevel des 3. CpG-Dinukleotids von SCN9A1 der Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie.....	91
Abbildung 25: Übersicht über das Methylierungslevel des 1. CpG-Dinukleotids von SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie.	92
Abbildung 26: Übersicht über das Methylierungslevel des 2. CpG-Dinukleotids von SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie.	93
Abbildung 27: Übersicht über das Methylierungslevel des 3. CpG-Dinukleotids von SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie.	94
Abbildung 28: Übersicht über das Methylierungslevel des 1. CpG-Dinukleotids von SCN10A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie.....	95
Abbildung 29: Übersicht über das Methylierungslevel des 2. CpG-Dinukleotids von SCN10A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie.....	96
Abbildung 30: Übersicht über das Methylierungslevel des 3. CpG-Dinukleotids von SCN10A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie.....	97
Abbildung 31: Übersicht über das Methylierungslevel des CpG-Dinukleotids von SCN11A1 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie.....	99
Abbildung 32: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Kontroll-Proben und der Biopsie-Probe des Locus SCN9A2.	107
Abbildung 33: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Patienten-Proben des Locus SCN9A2.....	109
Abbildung 34: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Kontroll-Proben des Locus SCN10A2.....	113
Abbildung 35: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Biopsie-Proben des Locus SCN10A2.....	115
Abbildung 36: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Patienten-Proben des Locus SCN10A2.....	116

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser sowie nach Lloyd und Hunt (Draguhn 2019).....	13
Tabelle 2: Übersicht über die neuropathischen Symptome, deren Definition, Untersuchungsmethode und der erwarteten <i>Response</i> auf die Untersuchung (Schlereth T. et al., 2019).	17
Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Ursachen für Small Fiber Neuropathie (Themistocleous, Ramirez et al. 2014)	22
Tabelle 4: Übersicht über die Nervenfasertypen, die mittels der QST erhoben werden, zugeordnet zu den entsprechenden Fasertypen (Papagianni 2018).....	32
Tabelle 5: Übersicht über die mittels <i>NanoDrop</i> gemessenen DNA-Konzentrationen in den Blutplasma-Proben der Kontrollen	47
Tabelle 6: Übersicht über die mittels <i>NanoDrop</i> gemessenen DNA-Konzentrationen in den Blutplasma-Proben der Patienten	48
Tabelle 7: Programm des <i>Thermocyclers</i> für die Bisulfitkonversion	49
Tabelle 8: Master-Mix der <i>outer</i> -PCR	52
Tabelle 9: Übersicht über die <i>Annealing</i> -Temperaturen der <i>outer</i> -PCR.....	52
Tabelle 10: Programm des <i>Thermocyclers</i> zur PCR-Amplifikation der cfBisDNA im Rahmen der <i>outer</i> -PCR.	53
Tabelle 11: Master-Mix der <i>inner</i> -PCR	54
Tabelle 12: Übersicht über die <i>Annealing</i> -Temperaturen der inner-PCR	54
Tabelle 13: Programm des <i>Thermocyclers</i> zur PCR-Amplifikation der inner-PCR.	55
Tabelle 14: Master-Mix für die PCR der Einzelklone.....	56
Tabelle 15: Programm des <i>Thermocyclers</i> zur PCR-Amplifikation der Einzelklone.....	56
Tabelle 16: Programm des <i>Thermocyclers</i> für die Sequenzierreaktion.	62
Tabelle 17: Master-Mix von Zymo <i>Research</i> zur DNA-Isolation und die dafür verwendete Probenmenge.....	64
Tabelle 18: Überblick über die Sequenz, die Anzahl der Basen, die Anzahl der C/G sowie A/T und die Temperatur der Primer für die untersuchten DNA-Abschnitte.....	68
Tabelle 19: Übersicht über die Sequenz und Temperatur der M13- <i>Vektorrandprimer</i> (pGEM-T- <i>Insert</i> -Kontrolle).	68
Tabelle 20: Übersicht über die untersuchten Genloci und deren jeweiligen Anzahl an CpG-Stellen sowie deren Sequenzgröße.	73
Tabelle 21: Übersicht über die Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion selektierten und daraufhin in der M13-PCR amplifizierten Klone, die Anzahl sequenzierter M13-PCR-Amplifikate und ausgewerteter Sequenzen für die Kontrollen K1, K2 und K3.	78

Tabelle 22: Übersicht über die Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion selektierten und daraufhin in der M13-PCR amplifizierten Klone, die Anzahl sequenzierter M13-PCR-Amplifikate und ausgewerteter Sequenzen für die Patientenproben P1 und P2.	79
Tabelle 23: Übersicht über die Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion gepickten und daraufhin in der M13-PCR amplifizierten Klone, die Anzahl sequenzierter M13-PCR-Amplifikate und ausgewerteter Sequenzen für die Biopsieproben P1, P2 und P3.....	83
Tabelle 24: Übersicht über den Methylierungs- <i>content</i> aller Loci bei allen Proben, den Kontrollen, den Plasma-Patienten-Proben und den Biopsie-Proben sowie deren jeweiligen potenziellen Methylierungsstellen (MS).	87
Tabelle 25: Übersicht über die Methylierungsmuster des Genlocus SCN9A1 der Proben K1, K2, K3, P1 Biopsie und P2 Biopsie.....	102
Tabelle 26: Übersicht über die Methylierungsmuster des Genlocus SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie und P2 Biopsie.	104
Tabelle 27: Übersicht über die Methylierungsmuster des Genlocus SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie.	110
Tabelle 28: Übersicht über den Anteil sequenzierter Klone an der Anzahl der selektierten Einzelklone sowie über den Anteil der ausgewerteten Sequenzen an den sequenzierten Einzelklonen bei allen Loci aller Proben.	128

Eine Small-Fiber-Neuropathie ist eine meist langsam progredient verlaufende Erkrankung, die ihre Ursache vor allem in der Nervenschädigung von kleinen unmyelinisierten peripheren Nervenfasern, den sogenannten A δ - und C-Fasern, hat. Diese finden sich z.B. in der Haut, welche sie innervieren sowie in peripheren Nerven und diversen Organen (Themistocleous et al., 2014). Bei einer Small Fiber Neuropathie gehen diese Nervenfasern unter.

Betroffene zeigen meist brennende Schmerzen akral und in den unteren Extremitäten (Sommer and Üçeyler, 2018).

Primäre sensorische Neuronen, das erste Bindeglied in der somatosensorischen Leitung, codieren ihre Nachrichten in Form von Aktionspotenzialen, deren depolarisierender Aufstrich von spannungsabhängigen Natrium Kanälen bewirkt wird (Draguhn, 2019, Mense, 2020). Diese primären sensorischen Neuronen werden hypererregt und können unprovizierte Aktionspotenziale auslösen, welche vermutlich chronischen neuropathischen Schmerz auslösen (Draguhn, 2019, Sopacua et al., 2019). Es gibt diverse Natrium-Kanal-Subtypen, die regional und zeitlich in spezifischen Mustern exprimiert werden (Draguhn, 2019). Als Nervenfasern spezifisch gelten v. a. die Na_v-Kanäle Na_v1.7 und Na_v1.8 (Sopacua et al., 2019). Aktive Gene sind in der Regel unmethyliert, wohingegen eine Methylierung in der Promotorregion eines Gens dazu führen kann, dass es transkriptionell stillgelegt wird (Walter, 2018).

Daher richtet die vorliegende Arbeit den Blick auf die Promotorregionen dieser möglichst gewebespezifisch exprimierten Genen und untersucht deren Methylierungsmuster. So bei den C-Fasern u. a. die Gene SCN9A, SCN10A und SCN11A, die für Untereinheiten der Na_v-Kanäle Na_v1.7, 1.8 und 1.9 codieren (Sopacua et al., 2019). Dazu wurde eine Bisulfitbehandlung der entsprechenden Proben von Patienten und Kontrollgruppen durchgeführt. Dieser schloss sich eine PCR der Promotorregionen an, deren Produkte in einen Vektor einligiert wurden, um anschließend in Bakterienkolonien vereinzelt vermehrt werden zu können. Danach wurden die DNA-Fragmente sequenziert und so die DNA-Methylierung sichtbar gemacht.

Während die Promotorregionen in den meisten Geweben aufgrund des inaktiven Status der untersuchten Gene methyliert vorliegen, könnte eine verstärkte Detektion unmethylierter Regionen in zellfreier DNA auf niedergegangenes C-Faser-Gewebe hinweisen. Bestätigt sich diese Hypothese, könnten diese Promotorregionen als epigenetischer Biomarker für eine Small Fiber Neuropathie dienen.

2.1 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ heißt übersetzt so viel wie „oberhalb der Genetik“ und beschreibt Prozesse, die die Nukleotidsequenz selbst unverändert lassen, aber die Chromatinstruktur und -aktivität verändern und vererbt werden können (Walter, 2018). Es handelt sich hierbei also um eine Ebene, die dem Genom übergeordnet ist und in welcher die Informationen, welche Gene einer Zelle genutzt und welche stillgelegt werden, enthalten sind. Diese epigenetischen Informationen werden bei jeder Mitose von der Mutter- auf die Tochterzelle übertragen und können von der Umwelt beeinflusst werden (Koolman and Röhm, 2019). Erstmals geprägt wurde der Begriff schon in den frühen 1940er Jahren durch den britischen Entwicklungsgenetiker Conrad Hal Waddington (Walter, 2018). Dieser erklärte die Epigenetik als Interaktion von Genen mit ihrer Umwelt, die so den Phänotyp bedingen (Chatterjee and Vinson, 2012).

Wichtige epigenetische Mechanismen sind vor allem die DNA-Methylierung, aber auch Histonmodifikation, Aktivitäten von Chromatin-Remodeling-Komplexen und anderen kleinen nicht-kodierenden RNAs, wie miRNA und siRNA (Chatterjee and Vinson, 2012). Diese Mechanismen, führen dazu, dass Gene zellspezifisch exprimiert werden, obwohl Zellen i.d.R. alle das gleiche genetische Material enthalten (Chatterjee and Vinson, 2012).

2.2 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine epigenetische Modifikation, bei der Basen der doppelsträngigen DNA methyliert werden, aber keine Veränderung der Nukleotidsequenz selbst oder der Basenpaarung stattfindet. Sie geschieht postreplikativ, ist vererbbar und man findet sie sowohl beim Pro- als auch beim Eukaryoten (Walter, 2018). Beim Menschen findet sie häufig an sogenannten CpG-Inseln statt, dies sind ca. 200 bis 4000 bp lange Strecken der DNA, mit einer höheren Dichte an CpGs, als im Rest des Genoms (Moore et al., 2013, Chatterjee and Vinson, 2012). In menschlichen Zellen werden ausschließlich Cytosin-Nukleotide, auf welche ein Guanin-Nukleotid folgt, methyliert, da es an dieser Basenfolge möglich ist, die Methylierung zu vererben (Horn, 2018). Generell kommen CpGs eher selten im Genom vor, da wegen der höheren Mutationsrate der methylierten CpGs, diese desaminiert und zu TpGs umgewandelt werden können (Chatterjee and Vinson 2012).

Die Enzyme, welche die DNA-Methylierung katalysieren, werden als DNA-Methyltransferasen (DNMTs) bezeichnet, sie nutzen als Cosubstrat S-Adenosyl-Methionin, indem sie die Methylgruppe von diesem auf das 5. Kohlenstoffatom des Cytosins übertragen

(Abbildung 1) (Horn, 2018, Moore et al., 2013). Beim Menschen gibt es 5 bekannte DNMTs, auf die im Folgenden noch weiter eingegangen wird. Durch die DNA-Methyltransferasen erfolgt also die Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin, die Reaktion zu dessen oxidativen Derivaten wird durch sogenannte TET-Enzyme bewirkt (Walter, 2018). TET steht dabei für „*ten eleven translocation*“, da sie erstmals bei einer Translokation zwischen Chromosom 10 und 11 bei Leukämie entdeckt wurden (Walter, 2018).

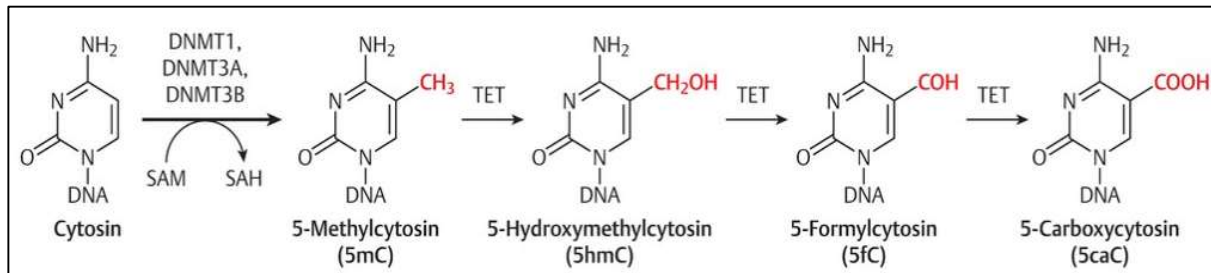


Abbildung 1: Die Modifizierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin durch die DNA-Methyltransferasen sowie dessen verschiedene oxidative Derivate, entstehend durch die TET-Enzyme (Walter 2018)

Chatterjee and Vinson (2012) beschreiben, dass die meisten CG-Dinukleotide methyliert sind und nur ca. 15 % aller CpGs des humanen Genoms in nicht-methylierter und somit transkriptionell aktiver Form vorliegen. Die CpG-Inseln machen dabei ca. 5% der CpGs aus, sind allgemein unmethyliert und in mehr als der Hälfte der Fälle mit sogenannten Haushaltsgenen assoziiert. Im Gegensatz zu diesen, enthält der *gene body* Bereiche, in welchen die CG-Dinukleotide hauptsächlich methyliert vorliegen. Die Methylierung der *gene bodies* ist beispielsweise beim aktivierten X-Chromosom und seinem inaktivierten Gegenpart zu finden. Es hat sich dabei gezeigt, dass Exons häufiger als Introns methyliert sind und die Transkriptionsstart- und Endpunkte eher unmethyliert vorliegen. Dies könnte bedeuten, dass die DNA-Methylierung eine Rolle in der Elongation, der Termination und eventuell dem alternativen Spleißen spielt (Chatterjee and Vinson, 2012).

CpG-Inseln können sich auch im Bereich von Promotoren von Genen befinden. Dies ist mit ca. 70 % bei einem Großteil der Promotoren der Fall (Moore et al., 2013). Ein Promotor ist eine Region der DNA, der in der Regel *upstream* des entsprechenden Gens auf dem kodierenden Strang zu finden ist und an der Regulation der Expression des Gens beteiligt ist. An ihn können u.a. Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen binden. Durch eine Methylierung in diesem Bereich kann es zur Stilllegung des entsprechenden Gens kommen. Obwohl ca. 50 % der CpG-Inseln bekannte Transskriptionsstartpunkte enthalten, finden sich hier dennoch häufig keine üblichen Promotor-Elemente wie die TATA-Boxen, sondern sie fungieren als sogenannte Enhancer, die die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren fördern (Moore et al., 2013).

Nach Chatterjee and Vinson (2012) besteht die Möglichkeit, Promotoren anhand ihrer CpG-Dichte in drei Klassen einzuteilen: die LCP (*low CpG content promoters*), welche eine geringe Dichte an CpGs aufweisen, die ICP (*intermediate CpG content promoters*), welche eine intermediäre Dichte an CpGs zeigen und in die HCP (*high CpG content promoters*) mit einer hohen Dichte an CpGs. Die Promotoren mit einer hohen CpG-Dichte (HCP) sind mehrheitlich unmethyliert, die mit einer geringen CpG-Dichte eher methyliert. Mit den HCPs ist vor allem die Expression von Haushaltsgenen assoziiert. Dennoch können hypomethylierte HCPs transkriptionell inaktiv sein, auch wenn die RNA-Polymerase II an sie binden kann und die Histone stark demethyliert sind. Sie zeigen dann eine gewisse transkriptionelle Flexibilität; ihre transkriptionelle Aktivität kann durch die Rekrutierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren ausgelöst und gesteigert werden. Die HCPs liegen also in allen Geweben, unabhängig von der Expression der mit ihnen assoziierten Gene, vor allem unmethyliert vor. Sollten diese allerdings methyliert werden, so wird die Expression dieser Gene stark unterdrückt.

Die hypermethylierten LCPs, welche häufig mit gewebespezifischen Genen assoziiert sind, sind häufig, aber nicht zwingend transkriptionell. Die Methylierung der CpGs kann hier auch zur Entstehung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen führen, wodurch die assoziierten Gene exprimiert werden, auch wenn die Methylierung des Promotors bestehen bleibt. Es gibt verschiedene Thesen, wie dies zustande kommen könnte. Eine besagt, dass die LCP Promotoren mit einem distalen Enhancer, der CpG-reiche Regionen enthält, assoziiert sein könnte, sodass eine differenzielle Methylierung dieser Enhancer-Region als Regulator für die Aktivität dieser Gene verantwortlich sein könnte. Eine andere Möglichkeit ist, dass eine Alteration der Histon-Modifikation die Aktivierung der Gene bedingt. Auch eine Art der posttranslationalen Modifikation bezüglich der Bindung von Transkriptionsfaktoren, oder ein Zusammenspiel von mehreren dieser Mechanismen kommen als Erklärung in Frage.

Es lässt sich zwar sagen, dass CpG-dichte Promotoren allgemein hypomethyliert und Promotoren mit einer geringeren CpG-Dichte allgemein hypermethyliert sind. Dennoch kann ihr Methylierungsstatus nicht zwingend eine transkriptionelle Aktivität ausschließen oder voraussagen. Allerdings ist die Methylierung in manchen Fällen für die Aktivierung der Transkription erforderlich (Chatterjee and Vinson, 2012).

Da die DNA-Methylierung postreplikativ stattfindet, bedeutet dies, dass nach der Replikation das entsprechende Methylierungsmuster auf den neu synthetisierten Strang übertragen wird (Walter, 2018, Horn, 2018). Dies wird, wie durch Walter (2018) beschrieben, durch die DNMT1 katalysiert, welche als Erhaltungsmethyltransferase bezeichnet wird (*maintenance methyltransferase*). Es findet hierbei eine Zusammenarbeit mit dem UHRF1-Protein (*ubiquitin-like containing P H D and ring finger domains*) statt. Es ist an den Replikationskomplex gekoppelt und erkennt CpGs, bei denen der neue Strang noch nicht methyliert wurde und alarmiert daraufhin die DNMT1 (Walter, 2018). Außerdem kann die DNMT1 DNA-Methylierungen reparieren (Moore et al., 2013).

Neben DNMT2, welche vor allem tRNA methyliert, sind laut Walter (2018) noch die DNA-Methyltransferasen 3a und 3b (DNMT3A, DNMT3B) bekannt. Sie werden als sogenannte de novo Methyltransferasen bezeichnet, da sie nicht für die Methylierung an bereits bekannten, am alten Strang bereits methylierten CpG-Regionen verantwortlich sind, sondern sporadisch Methylierungen an zuvor nicht modifizierter DNA vornehmen. Ihre Aktivität wird dabei von der DNMT3L beeinflusst, welche zwar selbst keine Methyltransferaseaktivität hat, aber für die Prägung in der Keimbahn und bei der Regulation der DNA-Methylierung im Embryonalstadium essenziell ist. Sie dient außerdem als Schlüsselement für die Kopplung von DNA-Methylierung und Histon-modifikation (Walter, 2018).

Sowohl die DNMT1 als auch die DNMT3b binden ferner an Histon-Deacetylase, welche die Acetylierung der Histone entfernen und so dafür sorgen, dass die DNA dichter gepackt und der Zugang für die Transkription erschwert wird. Zudem binden die DNMT1 und die DNMT3a beide an eine Histon Methyltransferase, welche die Genexpression durch Methylierung einschränkt (Moore et al., 2013).

Wie Chatterjee and Vinson (2012) ausführten, hat sich gezeigt, dass es durch die CG-Methylierung zu einer Repositionierung der Nukleosomen kommen kann. Umgekehrt hat aber auch die Positionierung von Nukleosomen einen Effekt auf die DNA-Methylierung, da die Methyltransferasen bevorzugt Nukleosomen-gebundene DNA anvisieren. Eine Depletion der *Linker* Histone H1 hat so z.B. eine Hypomethylierung von manchen CpGs gezeigt. Die vorige Aussage, dass Exons allgemein stärker hypermethyliert werden, unterstützend, hat sich außerdem gezeigt, dass Exon-reiche Regionen eine höhere Dichte mit Nukleosomen aufzeigen als Introns oder Promotoren. Die allgemein meist hypomethyliert vorliegenden HCP Promotoren, zeigten ebenfalls eine geringere Bestückung mit Nukleosomen, anders als die hypermethylierten LCP Promotoren, für deren Induktion ein *Remodeling* des Nukleosomen-Komplexes notwendig ist (Chatterjee and Vinson, 2012).

Alle DNMTs sind für die Entwicklung des Embryos hochgradig wichtig. Hat die Zelldifferenzierung stattgefunden, wird die Expression von DNA-Methyltransferasen reduziert (Moore et al., 2013). Es erfolgt direkt nach der Befruchtung eine genomweite Demethylierung des väterlichen Genoms sowie nach dem ersten Zellzyklus auch eine des mütterlichen, ausgenommen die Gene, die der genomischen Prägung unterliegen. Diese genomweite Demethylierung bleibt bis zum Blastozysten-Stadium bestehen, während diesem werden die Methylierungslevel in den pluripotenten Stammzellen durch die de novo Methyltransferasen wiederhergestellt (Chatterjee and Vinson, 2012). Der Verlust von DNMTs führt somit, wie sich bei Knockout-Mäusen zeigte, wahrscheinlich auch beim Menschen zu letalen Entwicklungsstörungen (Walter, 2018).

Die korrekten epigenetischen Zustände sind unabdinglich für die Regulation von normalen Zellen. Laut Chatterjee and Vinson (2012), kann es bei einer Dysregulation, zu einer Verän-

derung von biologischen Prozessen und somit zur Entstehung von Krankheiten wie Krebs kommen. In den 1980er Jahren wurde erstmals eine Reduktion von DNA-Methylierung in Tumorgewebe, verglichen mit tumorfreiem gesundem Gewebe, beobachtet. Es hat sich gezeigt, dass die Hypomethylierung vor allem im Bereich der *gene body*s, DNA-Transposons und repetitiven Sequenzen auftritt. Im Bereich von Promotoren hingegen ist eine Hypermethylierung zu finden, was zu einer veränderten Initiation der Transkription und zu einer genomischen Instabilität führt. Durch die Hypomethylierung und Aktivierung von DNA-Transposons kann es außerdem zu einer chromosomalen Instabilität und dem Verlust von genomischem *Imprinting* kommen. Diese Elemente können schließlich auch zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (Chatterjee and Vinson, 2012).

Die Goldstandardmethode, um die DNA-Methylierung zu untersuchen, ist die Bisulfitkonversion (Leti et al., 2018). Bei dieser werden, wie von Walter (2018) beschrieben, die nicht-methylierten Cytosinreste der Basen modifiziert und schließlich zu Uracil desaminiert. 5mC und 5hmC hingegen reagieren nicht mit dem Bisulfit Salz, sodass die methylierten Cytosine als solche erhalten bleiben. Anders als 5-Formylcytosin und 5-Carboxycytosin, welche wie das nicht-methylierte Cytosin mit dem Bisulfit Salz reagieren und zu Uracil desaminiert werden. Im Anschluss kann eine PCR-Amplifikation stattfinden, bei welcher die entstandenen Uracil-Basen in Amplifikationsprodukte, die Thymin enthalten, kopiert und exponentiell vervielfältigt werden (Walter, 2018). Mittels einer Reihe verschiedener Sequenzierungstechniken lässt sich anschließend die DNA-Sequenz analysieren und der Methylierungsstatus der ausgewählten CG-Dinukleotide ermitteln.

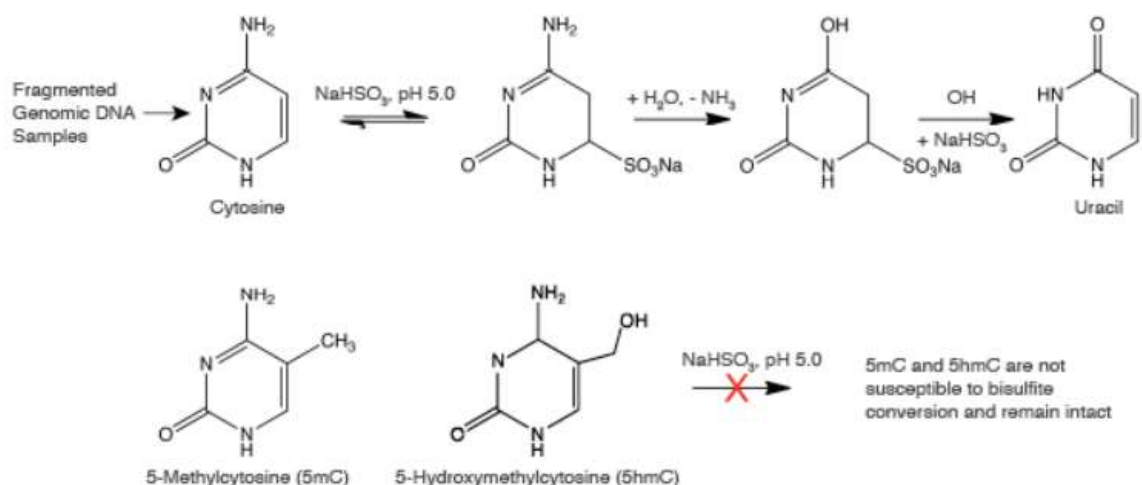


Abbildung 2: Bisulfitumwandlung; Sulfonierung des Cytosins zu Cytosin-Sulfonat mittels Natriumbisulfit, die Desaminierung zu Uracil-Sulfonat und dessen Desulfonierung zu Uracil sowie die Darstellung, dass 5mC und 5hmC nicht mit dem Natriumbisulfit reagieren (Williams et al., 2019).

2.3 Neurophysiologische Grundlagen

Wie bei Mense (2020) ausgeführt, hat das Nervensystem die Aufgabe der Aufnahme, Verarbeitung von Informationen aus der Umwelt sowie des eigenen Körpers und dessen Reaktion auf selbige. Es kann morphologisch unterteilt werden in das zentrale Nervensystem (ZNS), aus Gehirn und Rückenmark bestehend sowie in das periphere Nervensystem (PNS), welches alle Anteile des Nervensystems umfasst, die sich außerhalb des ZNS befinden. Funktionell kann es in das somatische NS, welches für die Steuerung der Motorik und die Kommunikation mit der Umwelt verantwortlich ist, und in das autonome NS, welches die Funktion der inneren Organe steuert und die Homöostase aufrechterhält, gegliedert werden. Um Informationen aus den inneren Organen oder der Umwelt aufnehmen zu können, wandeln die Rezeptorzellen, nach Aufnahme des Reizes diesen in elektrische Signale um, welche über Synapsen an nachgeschaltete Neurone des ZNS weitergeleitet werden (Mense, 2020). Der schematische Aufbau eines Neurons sieht wie folgt aus: es besteht aus dem sogenannten Zellkörper (Soma) mit Dendriten, an welchen Synapsen anderer Neurone befindlich sind, dem Axonhügel und dem Axon, welches myelinisiert sein kann.

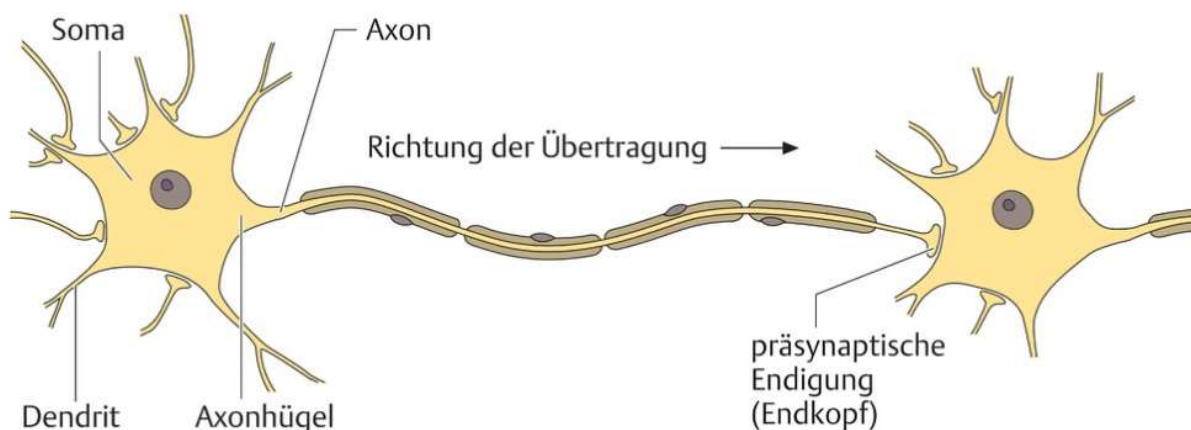


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Neurons (Hoth and Rettig 2021)

Die Weiterleitung der elektrischen Signale findet durch die Entstehung und Fortleitung von Aktionspotenzialen (APs) statt (Mense, 2020). Bei Aktionspotenzialen handelt es sich um schnelle stereotyp ablaufende Änderungen des Membranpotenzials einer erregbaren Zelle (Draguhn, 2019). Sie setzen sich grob aus der Depolarisation, bei welcher das innen negative Membranpotenzial in eine positivere Richtung verschoben wird, und der Repolarisation, zusammen (Mense, 2020). Wie durch Draguhn (2019) beschrieben, findet sich bei dem typischen Aktionspotenzial einer Nervenzelle folgender Ablauf: anfangs findet sich ein Ruhepotenzial (siehe Abbildung 4), durch bspw. die Aktivierung durch erregende Synapsen kommt es dann zu einer Depolarisation und das Membranpotenzial verschiebt sich in eine positivere

Richtung, bis es ein Schwellenpotenzial erreicht, bei welchem es zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Natrium-Kanäle und einem Natrium-Einstrom kommt, welcher den steilen Aufstrich des APs erzeugt. Erreicht das Aktionspotenzial seine Spitze, erfolgt eine Schließung der Natriumkanäle und Aktivierung von Kaliumkanälen sowie einem Kalium-Ausstrom, was zur Repolarisation führt. Da am Ende des AP noch eine erhöhte Leitfähigkeit für Kalium-Ionen vorliegt, entsteht ein hyperpolarisierendes Nachpotenzial. Anschließend erreicht die Nervenzelle wieder ihr Ruhepotenzial (Draguhn, 2019).

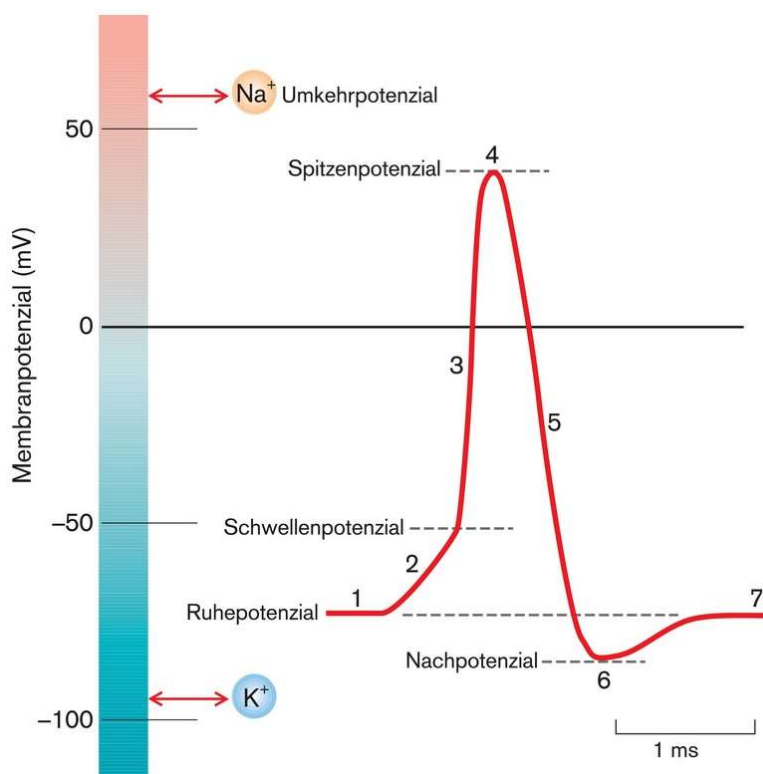


Abbildung 4: Übersicht über den Ablauf eines Aktionspotenzials (Draguhn 2019)

Die an der Depolarisation beteiligten spannungsabhängigen Natriumkanäle zeigen einen einheitlichen Aufbau, insgesamt gibt es 9 bekannte Isoformen (Draguhn, 2019). Bei diesen handelt es sich um die Na_v1.1 bis 1.9, welche durch die Gene SCN1A bis SCN9A codiert werden (Goral Dr. rer. nat., 2015). Diese sind transmembrane Proteinkomplexe (Draguhn, 2019). Sie bestehen jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit (Baker and Nassar, 2020). Die α -Untereinheit bildet, wie bei Draguhn (2019) aufgeführt, vier Domänen (I-IV), die wiederum jeweils aus sechs hydrophoben α -helikalen Segmenten (S1-S6) bestehen. Diese Proteinkomplexe bilden in ihrem Inneren eine hydrophile Pore, welche selektiv durchlässig für Natrium-Ionen und im Ruhezustand geschlossen ist. Das Segment 4 trägt jeweils eine positi-

ve Ladung und fungiert als Spannungssensor, der durch eine Änderung des Membranpotenzials verschoben wird und die Pore öffnen kann. Es ist zudem für die Entstehung der Refraktärzeit mitverantwortlich, welche eine erneute sofortige Öffnung des Kanals nach abgelaufener Erregung verhindert, somit die Frequenz der Aktionspotenziale auf ein bestimmtes Maximum begrenzt und eine präzise Signalverarbeitung ermöglicht.

Die P-Regionen (Pore) zwischen den Segmenten 5 und 6 befindlich, hat Anteil an der Porenbildung und dient als Selektivitätsfilter (Draguhn, 2019). Während die α -Untereinheit für die Porenbildung zuständig ist, hat die β -Untereinheit die Modifikation des Kanalverhaltens zur Aufgabe und unterstützt die α -Untereinheit (Goral Dr. rer. nat., 2015, Baker and Nassar, 2020).

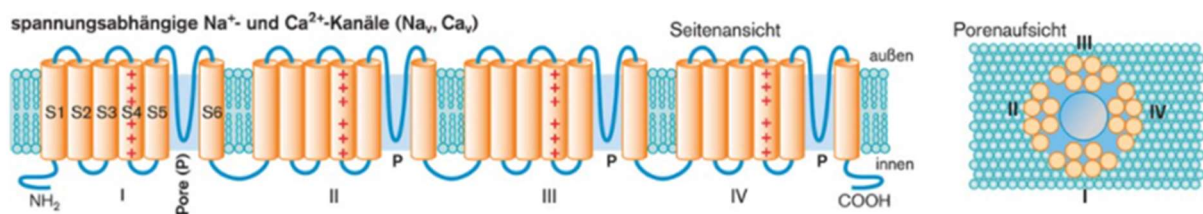


Abbildung 5: Aufbau und Struktur von spannungsabhängigen Natrium- und Calciumkanälen (Draguhn 2019)

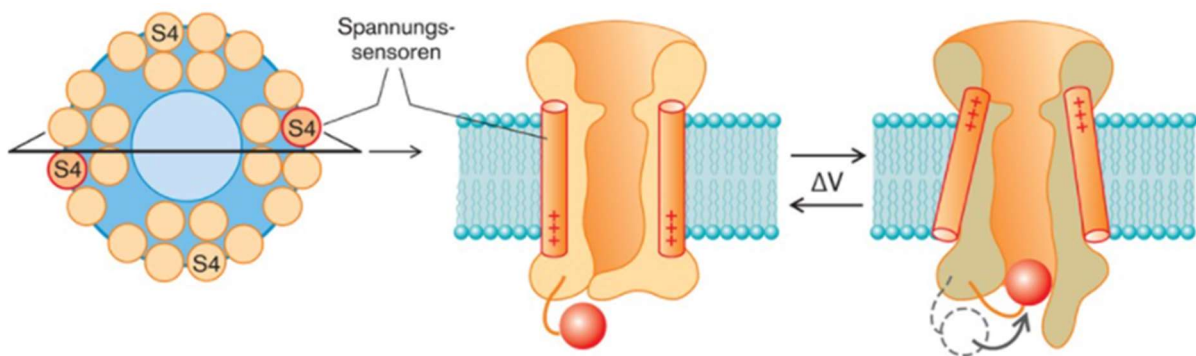


Abbildung 6: Blockade des spannungsabhängigen Natriumkanals durch die intrazelluläre Domäne (Draguhn 2019)

Die Öffnung des Kanals durch das Segment 4 findet statt, indem bei einer Depolarisation des Zellinneren das Segment 4, welches eine große Zahl positiv geladener Aminosäuren besitzt, Richtung Extrazellulärraum gestoßen wird. Dies bewirkt schließlich eine Umlagerung der anderen transmembranen Segmente und somit eine Öffnung der Pore. Die Selektivität des Kanals entsteht in der Porenregion, dort werden Anionen durch negativ geladene dort befindliche Aminosäuren abgestoßen. So werden nur Kationen passieren gelassen, welche anschließend im Kanal anhand ihrer Größe selektiert werden. An den engsten Stellen innerhalb

des Kanals verlieren sie dabei ihre Hydrathülle, dieser Prozess wird *stripping* genannt. Durch die dafür aufgewandte Zeit ist die Leitfähigkeit des Kanals für Ionen pro Zeiteinheit limitiert (Draguhn, 2019).

Wie bei Draguhn (2019) beschrieben, exprimieren sowohl Nerven- als auch Muskelzellen die genannten spannungsabhängigen Kanaltypen. Um diese zu aktivieren, muss die Zelle zunächst bis zur Öffnung einiger Na_v -Kanäle depolarisiert werden. Dies geschieht über erregende synaptische Potenziale, *Gap Junctions* oder die Signaltransduktion von Sinneszellen. Durch die Öffnung dieser Natrium-Kanäle kommt es zu einer weiteren Depolarisation, bis hin zum Schwellenpotenzial (meist bei ca. -50 mV) und das Aktionspotenzial läuft ab. Da das Aktionspotenzial dem „Alles oder Nichts“ Prinzip unterliegt, ist dessen Ablauf nach Erreichen des Schwellenpotenzials stets sehr einheitlich. Bei dem steilen Aufstrich findet eine Depolarisation bis hin in den positiven Bereich (meist bei ca. + 30 mV) statt, dies wird *overshoot* genannt. Durch die rasche Inaktivierung der Natrium-Kanäle durch die intrazelluläre Domäne wird allerdings nicht das Gleichgewichtspotenzial für Natrium-Ionen (+ 60 mV) erreicht. Im Anschluss folgt, wie zuvor beschrieben, die Repolarisation sowie das hyperpolarisierende Nachpotenzial durch Öffnung der Kalium-Kanäle. Die Dauer eines Aktionspotenzials beträgt meist ca. 1-2 ms, dabei zeigt sich typischerweise eine Amplitude von ca. 100 mV. Die sich dem AP anschließende Refraktärzeit kann in die absolute und die relative Refraktärzeit eingeteilt werden. Während der absoluten Refraktärzeit kann der Natrium-Kanal auch durch einen stark überschwelligen depolarisierenden Reiz nicht geöffnet werden, wohingegen bei der relativen Refraktärzeit ein Teil der Natrium-Kanäle wieder erregbar ist, sodass die Schwelle zwar erhöht ist und die Amplitude des Aktionspotenzials geringer ausfällt, aber dennoch ein Aktionspotenzial ausgelöst werden kann, wenn es sich um einen starken Reiz handelt. Die Refraktärzeit begrenzt somit einerseits die Frequenz der APs und bewirkt andererseits, dass die Aktionspotenziale nur in eine Richtung weitergeleitet werden können. Durch die Na^+/K^+ -ATPase findet eine Wiederherstellung der ursprünglichen Ionenverhältnisse zwischen Intra- und Extrazellulärraum statt (Draguhn, 2019).

Die Reizstärke in afferenten Fasern zeigt eine Korrelation zur Frequenz der Aktionspotenziale. Aber bei komplexeren Verarbeitungsprozessen kann es auch zu rhythmischen Potentialschwankungen vieler Zellen gemeinsam kommen, die so komplexe zeitliche AP-Muster weiterleiten und im EEG messbar sind (Draguhn, 2019).

Normalerweise werden Aktionspotenziale orthodrom (in eine Richtung) weitergegeben, allerdings können sie auch mitten in geschädigten Axonen entstehen und von dort aus sowohl orthodrom als auch antidrom (in die Gegenrichtung der normalen Ausbreitung) weitergeleitet werden. Dieser Prozess wird auch bei peripheren Neuropathien vermutet und als mögliche Ursache der schmerzhaften Dysästhesien mancher Patienten diskutiert (Draguhn, 2019).

Da es viele verschiedene Isoformen und Untereinheiten gibt, aus denen die genannten Kanäle aufgebaut sein können, kann es zu Abweichungen bezüglich der zuvor beschriebenen Standardform des Aktionspotenzials und der Kanal-Wirkungsweise sowie der beteiligten Kanäle, kommen. So entsteht eine Vielfalt der Aktionspotenziale und eine an Zelltypen oder Funktionszustände angepasste Spezifität der Signalverarbeitung. Auch Calcium-Kanäle sind hier zu nennen, die u.a. für die Muskelkontraktion, die Exozytose von Transmittern oder Hormonen zuständig sind, aber auch bei der Genexpression und der Zellproliferation eine Rolle spielen und von denen es ebenfalls verschiedene Typen gibt (Draguhn 2019).

Die Weiterleitung eines Aktionspotenzials kann nach verschiedenen Prinzipien ablaufen. Einmal gibt es die elektrotonische Reizweiterleitung, bei welcher sich die Spannungsänderungen passiv entlang der Zellmembran ausbreiten. Dies benötigt viel Zeit. Zudem kommt es im Laufe der Weiterleitung zu einer Abschwächung der Amplitude aufgrund von Ladungsverlusten durch den elektrischen Widerstand. Dies eignet sich daher nicht, um große Strecken zu überwinden, deshalb kommen die Natrium- und Kalium-Kanäle entlang der Membranen von Nerven-/ Muskelzellen in einer hohen Dichte vor. So muss die elektrotonische Weiterleitung des APs nur so weit geschehen, bis die benachbart gelegene Stelle bis hin zur Öffnung der Natrium-Kanäle depolarisiert ist und das Schwellenpotenzial schließlich erreicht wird. Diese sogenannte regenerative Erregungsweiterleitung, bei der es zu einer kontinuierlichen Ausbreitung des Aktionspotenzials kommt, macht die Reizweiterleitung über größere Strecken möglich und findet sich in unmyelinisierten Nervenfasern (Draguhn, 2019).

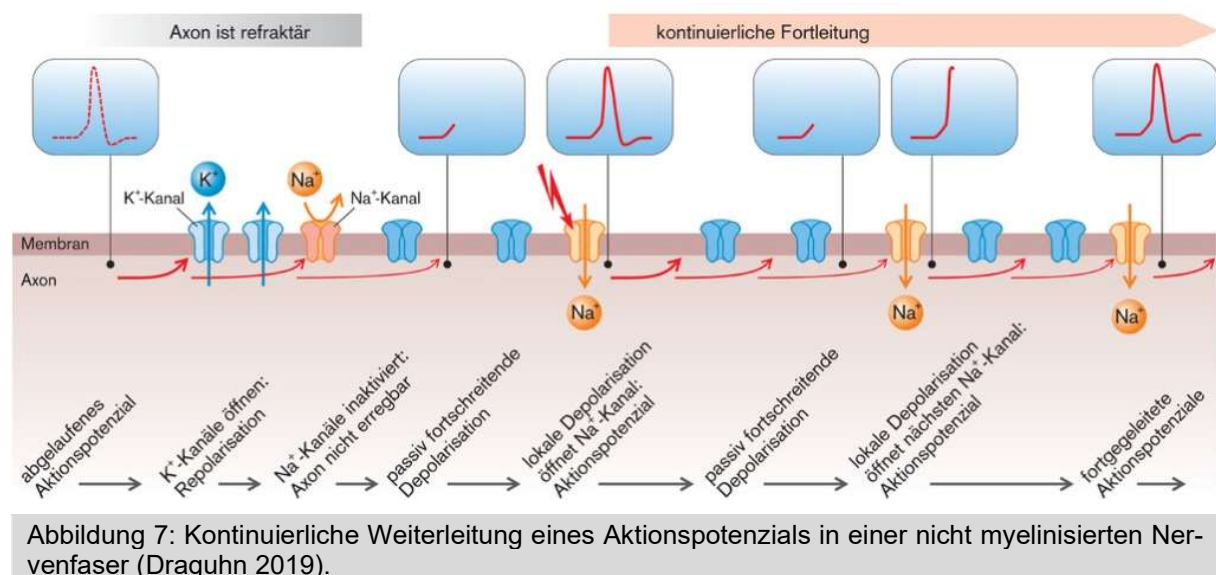


Abbildung 7: Kontinuierliche Weiterleitung eines Aktionspotenzials in einer nicht myelinisierten Nervenfasern (Draguhn 2019).

Sind Nervenfasern myelinisiert kommt es hingegen zu einer sogenannten saltatorischen Erregungsweiterleitung. Die Myelinscheide besteht aus dichtgepackten mehrschichtigen

Abbildung 8: Saltatorische Erregungsweiterleitung von Schnürring zu Schnürring, an welchem jeweils ein Aktionspotenzial entsteht (Draguhn 2019).

Anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit, welche durch ihren Durchmesser sowie ihre Myelinisierung bedingt ist, werden Nervenfasern in Klassen unterteilt. Es gibt die Klassifizierung nach Erlanger und Gasser sowie die nach Lloyd und Hunt (Draguhn, 2019).

Tabelle 1: Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser sowie nach Lloyd und Hunt (Draguhn 2019)

	Fasergruppe	Durchmesser (µm)	NLG (m/s)	Efferent	Afferent	Fasergruppe	Durchmesser (µm)	NLG (m/s)
myelinisiert	A α	10–20	60–120	motorisch zur Skelettmuskulatur (motorische Einheiten)	primäre Muskelspindelafferenzen Afferenzen von Sehnenorganen	Ia Ib	12–20	70–120
	β	7–5	40–90		sekundäre Muskelspindelafferenzen Mechanoafferenzen der Haut	II	7–12	40–70
	γ	4–8	30–50	statische und dynamische Efferenzen zur intrafusalen Spindelmuskulatur				
	δ	2–5	10–30		dünne myelinisierte Mechanoafferenzen, Thermoafferenzen, nozizeptive Afferenzen aus Haut, Tiefensensibilität	III	2–7	10–40
	B	1–3	5–20	präganglionäre vegetative Fasern				
nicht myelinisiert	C	0,5–1,5	0,5–2	postganglionäre vegetative Fasern: efferente Fasern zu Herzgefäßen usw.	viszerale Afferenzen nicht myelinisierte nozizeptive, mechano-, thermo-, und chemosensible Afferenzen aus Haut und tiefer gelegenen Strukturen	IV	0,5–1,5	0,5–2
Einteilung nach Erlanger u. Gasser					Einteilung nach Lloyd u. Hunt			

Die verschiedenen Neurone sind durch Synapsen untereinander verbunden, bei diesen handelt es sich einerseits um elektrische, aber deutlich häufiger auch um chemische Synapsen (Mense, 2020). Wie bei Hoth and Rettig (2021) beschrieben, bestehen elektrische Synapsen aus Zellkontakten, an welchen über sogenannte *Gap Junctions*, also Poren in spezifischen Membranproteinen, Konnexone genannt, die Erregungsweiterleitung direkt von Prä- auf Postsynapse erfolgt. So sind die Zellen elektrisch gekoppelt und eine Erregungsweiterleitung ist in beide Richtungen möglich. Chemische Synapsen bestehen aus einer Präsynapse, einem synaptischen Spalt und einer Postsynapse (Hoth and Rettig, 2021). Sie nutzen Neurotransmitter zur Informationsweitergabe. Je nach Ligand entsteht an der Postsynapse entweder ein erregendes postsynaptisches Potenzial (EPSP) oder ein hemmendes postsynaptisches Potenzial (IPSP). Da ein Neuron allerdings viele Synapsen auf seiner Oberfläche verschaltet hat, welche gleichzeitig aktiv sind, kommen verschiedene Signale gleichzeitig an (Mense, 2020). Die postsynaptischen Potenziale breiten sich elektrotonisch Richtung Axonhügel des postsynaptischen Neurons aus, wo eine zeitliche und räumliche Summation erfolgt. Sollte hier die Reizschwelle überschritten werden, wird ein Aktionspotenzial ausgelöst und die Information weitergegeben (Hoth and Rettig, 2021).

2.4 Neuropathie

Wie von Schlereth et al. (2019) ausgeführt, sind die bei einer Neuropathie auftretenden neuropathischen Schmerzen durch die *Neuropathic Pain Special Interest Group* (NeuPSIG) definiert, als Folge einer Läsion oder einer Verletzung des somatosensorischen Systems. Sie entstehen somit anders als nozizeptive Schmerzen, bei welchen das neuronale System intakt ist, nicht durch die Nozizeptor-Aktivierung, sondern durch eine Schädigung eben dieses Systems. Ebenfalls davon abzugrenzen sind die noziplastischen Schmerzen, bei welchen eine Veränderung der Nozizeption ohne eine Gewebsschädigung als Grund der Aktivierung von peripheren Nozizeptoren vorliegt. Neuropathische Schmerzen treten mit einer Prävalenz von 6,9-10% auf. Pathophysiologisch liegt häufig eine abnorme Spontanaktivität zu Grunde, in geschädigten, aber auch unversehrten nozizeptiven Afferenzen. Verursacht wird diese z.B. durch genetische, aber auch biochemische, physiologischen und morphologische Veränderungen, welche die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Mechanismen stören. Die genaue Pathophysiologie ist jedoch von der Grunderkrankung abhängig, welche die Neuropathie verursacht (Schlereth et al., 2019). Insgesamt gibt es eine große Anzahl von Erkrankungen, die einer Neuropathie zugrunde liegen können, diese zeigen jedoch ähnliche Schädigungsmuster und -Mechanismen (Hammi and Yeung, 2021).

In diesem Zusammenhang nennen Hammi and Yeung (2021) drei wichtige Schädigungsmuster: die segmentale Demyelinisierung, die Waller'sche Degeneration, sowie die axonale Degeneration. Bei der segmentalen Demyelinisierung handelt es sich um einen Prozess, bei welchem es zu einer Degeneration der Myelinschicht, welche die Axone der Nerven umgibt, kommt und der u.a. zu einer Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit führt. Dieser Mechanismus zeigt sich in Mononeuropathien, sensomotorischen oder auch prinzipiell motorischen Neuropathien. Es finden sich häufig inflammatorische Ursachen, seltener kann der Auslöser auch immunologisch sein. Etwa 20% der peripheren Neuropathien entstehen durch eine Schädigung des Myelinmantels, beispielsweise die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung und die mit Neuropathie assoziierte monoklonale Gammopathie. Bei einer Waller'sche Degeneration degeneriert das Axon eines Nervs durch eine Läsion, physikalische Kompression, Ischämie, Blutung, Infektion oder durch toxische Einwirkung, sodass der distale Anteil des Axons abstirbt, da er keine weiteren Nährstoffe von dem Zellkörper des Neurons erhält. Dies resultiert in einer fokalen Mononeuropathie, welche sekundär nach einem Trauma oder der Infarzierung eines Nervs entsteht. Immunhistochemisch findet sich hierbei eine charakteristische Ansammlung von Neuropeptid-Y1-Rezeptor-Markern. Die axonale Degeneration manifestiert sich meist als symmetrische Polyneuropathie (PNP) (in ca. 80% der Fälle) und tendiert dazu, eine Schwäche, meist bei der Dorsalflexion des Fußes und durch Muskelatrophie der entsprechenden Region auffallend, zu verursachen. Die Degeneration des Axons beginnt dabei in einem Muster, welches distal startet und nach proximal voranschreitet. Dem ist so,

da man davon ausgeht, dass der distalste Anteil des Axons der vulnerabelste ist, da er die größte Entfernung zum Zellkörper des Neurons aufweist, welcher für die Nährstoffzufuhr verantwortlich ist. Eine Theorie für die zugrundeliegende Ursache ist, dass es zu einem gestörten Transport lokaler axonaler Überlebensfaktoren kommt, was zu einer gesteigerten Calciumkonzentration innerhalb des Axons führt und schließlich zu einem Calcium-abhängigen Zusammenbruch des Zytoskeletts (Hammi and Yeung, 2021).

Generell lassen sich zentrale von peripheren neuropathischen Schmerzen unterscheiden, hierbei sind, wie von Schlereth et al. (2019) ausgeführt, die zentralen schwieriger zu therapieren. Auch gibt es sogenannte gemischte Schmerzsyndrome, z.B. bei Tumorschmerzen und Rückenschmerzsyndromen, bei denen es zu einer Kombination von neuropathischen und nozizeptiven Schmerzen kommt. Primäre Neuropathien sind im Allgemeinen seltener aufzufinden als sekundäre. Wie der Name schon vermuten lässt, sind bei der Polyneuropathie mehrere Nerven, bei der Mononeuropathie, auch Neuralgie genannt, ist hingegen nur ein Nerv von der Schädigung betroffen. Außerdem lassen sich eine Axonopathie, bei der ein Axonuntergang bei anfangs noch erhaltener Myelinscheide erfolgt und das Nervensummenpotenzial verringert ist, eine Neuronopathie, bei welcher der Zellkörper des Neurons geschädigt ist und die zuvor erläuterte Demyelinisierung unterscheiden (Schlereth et al., 2019).

Bei der Diagnostik neuropathischer Schmerzen ist zunächst die genaue Anamneseerhebung, v.a. bezüglich Schmerzcharakter, -dauer, -stärke, -lokalisation und Auslösern der Schmerzen wichtig. Diese dient auch der Abgrenzung gegenüber nozizeptiven und noziplastischen Schmerzen. Wichtig sind außerdem vorausgegangene Therapieversuche, Begleiterkrankungen, funktionelle Beeinträchtigungen durch die Schmerzen sowie der Grad und die Chronifizierung des Schmerzes (Schlereth et al., 2019). Auch eine umfangreiche Ursachenforschung inklusiver einer Serologie sowie die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit und eine klinische neurologische Untersuchung sind wichtige Teile der anschließenden Diagnostik.

Die klinische Symptomatik setzt sich, wie von Schlereth et al. (2019) beschrieben, aus mehreren Komponenten zusammen. So sprechen viele Patienten von einem Taubheitsgefühl, welches als ein sogenanntes „negatives“ Symptom zwar nicht schmerzhaft ist, aber oft zu Beeinträchtigungen führt und medikamentös i.d.R. nicht beeinflussbar ist. Sogenannte „positive“ Symptome sind Schmerzüberempfindlichkeit, Hyperalgesie, oder evozierte Schmerzen, Allodynie, welche typisch bei Neuropathien sind. Bei einer Hyperalgesie wird im Vergleich zu einem Gesunden ein primärer leicht schmerzhafter Reiz als ein, im Vergleich zu einem Gesunden, deutlich stärkerer, reizinadäquater Schmerz empfunden. Bei einer Allodynie, dem sogenannten evozierten Schmerz, wird ein äußerer Reiz, der normalerweise keinen Schmerz auslöst, wie z.B. Berührung, Wärme oder Kälte, als schmerzhaft empfunden. Auch kann ein Deafferenzierungsschmerz auftreten, wenn es zu einer vollständigen Unterbrechung großer

Nervenstämmen oder Bahnen kommt, wie bei einer Amputation oder einem Querschnittssyndrom. Weitere typische Befunde bei Neuropathien sind Kribbelparästhesien und Dysästhesien. Ferner kann es auch zu Pruritus, Muskelkrämpfen oder einer Bewegungsunruhe wie bei einem *Restless-Leg-Syndrom* kommen (Schlereth et al., 2019).

Um diese Symptome zu erfassen, sollte eine Untersuchung von Temperaturempfindung, Propriozeption, Muskeleigenreflexen, Kraft, oberflächlicher Berührung sowie mechanischer Schmerzreize und Pallästhesie erfolgen, was u.a. im Rahmen einer Quantitativen sensorischen Testung (QST) geschehen kann (Schlereth et al., 2019).

Im Folgenden wird tabellarisch eine Übersicht über die verschiedenen neuropathischen Symptome, deren Definition sowie deren Untersuchungsmethode gegeben:

Tabelle 2: Übersicht über die neuropathischen Symptome, deren Definition, Untersuchungsmethode und der erwarteten *Response* auf die Untersuchung (Schlereth et al., 2019).

	Symptom/ Befund	Definition	Untersuchung Bedside-Test	Erwartete Antwort	
Negativsymptome	Hypästhesie	reduzierte Empfindung nicht schmerzhafter Reize	Bestreichen der Haut mit Pinsel oder Watteträger	reduzierte Empfindung, Taubheit	
	Pallhypästhesie	reduzierte Empfindung eines Vibrationsreizes	Applikation der Stimmgabel über Knochen oder Gelenk	reduzierte Empfindung	
	Hypalgesie	reduzierte Empfindung schmerzhafter Reize	Berühren der Haut mit spitzem Gegen- stand (z. B. Zahn- stocher oder steifem Von-Frey-Haar)	reduzierte Empfindung, Taubheit	
	Therm- hypästhesie	reduzierte Empfindung eines Warm- oder Kaltreizes	Berührung der Haut mit kalten Gegen- ständen (z. B. 10 °C, Metallrolle, Wasser- glas, Acetonspray) Berührung der Haut mit warmen Gegen- ständen (z. B. 45 °C, Metallrolle, Wasser- glas)	reduzierte Empfindung (erhöhte Temperatur- schwellen), bei Schädigung der Kaltfasern auch paradoxe Hitze- empfindung	
Positivsymptome	spontane Empfindung, Spontanschmerz	Parästhesie	nicht schmerz- hafte, anhaltende kribbelnde Empfindung (Ameisenlaufen)	Fragen nach Intensität (z. B. NRS)	–
		Dysästhesie	unangenehme Missempfindung	Fragen nach Intensität (z. B. NRS)	–
		einschießende Schmerz- attacke	elektrisierende Schocks von Sekundendauer	Fragen nach Anzahl pro Zeit und Intensi- tät (z. B. NRS) Fragen nach auslö- senden Faktoren	–
		oberflächlicher Schmerz	schmerzhafte anhaltende Empfindung, oft brennend	Fragen nach Intensität (z. B. NRS)	–
	evozierter Schmerz	Mechanisch- dynamische Allodynie	Ein normalerweise nicht schmerz- hafter, leichter Reiz auf der Haut löst Schmerz aus	Bestreichen der Haut mit Pinsel oder Watteträger, Größe der Fläche in cm²	brennender, stechender Schmerz in der primär betrof- fenen Zone und darüber hinaus (sekundäre Zone)
		mechanisch- statische Allodynie	Ein normalerweise nicht schmerzhafter, leichter statischer Druck auf der Haut löst Schmerz aus	leichter Druck mit einem Watteträger auf der Haut, Größe der Fläche in cm²	dumpfer Schmerz in der primär betroffenen Zone
		mechanische Pin-Prick- Allodynie (Hyperalgesie)	Ein normalerweise leicht stechender, nicht schmerz- hafter (leicht schmerzhafter) Reiz auf der Haut löst einen (stärkeren) Schmerz aus	Berühren der Haut mit spitzem Gegenstand (z. B. Zahnstocher oder steifem Von-Frey- Haar), Größe der Fläche in cm²	stechender Schmerz in der primär betrof- fenen Zone und darüber hinaus (sekundäre Zone)

Kälte-Allodynie (Hyperalgesie)	Ein normalerweise nicht schmerzhafter (leicht schmerzhafter) Kaltreiz auf der Haut löst einen (stärkeren) Schmerz aus	Berührung der Haut mit kalten Gegenständen (z. B. 10 °C, Metallrolle, Wasserglas, Acetonspray)	schmerzhaft-brennende Temperaturmissempfindungen in der primär betroffenen Zone, paradoxe Hitzeempfindung
Hitze-Allodynie (Hyperalgesie)	Ein normalerweise nicht schmerzhafter (leicht schmerzhafter) Warmreiz auf der Haut löst einen (stärkeren) Schmerz aus	Berührung der Haut mit warmen Gegenständen (z. B. 40 °C, Metallrolle, Wasserglas)	schmerzhaft-brennende Temperaturmissempfindungen in der primär betroffenen Zone

NRS = numerische Rating-Skala, bei der dem Wert 0 die Aussage „Symptom nicht vorhanden“ und dem Wert 10 die Aussage „maximal vorstellbare Ausprägung des Symptoms“ (z. B. Parästhesien, Brennschmerzen) zugeordnet wird (Details siehe Text)

Eine sensible Neuropathie kann, wie von Senties-Madrid and Vega-Boada (2001) beschrieben, auch paraneoplastisch in Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung auftreten. Hier werden als Ursache sogenannte neurotoxische Hu-Antikörper (*anti-neuronal nuclear antibody-1, ANNA-1*) diskutiert. Diese sind gegen die Hu-Proteine gerichtet, eine Familie von vier RNA-bindenden Proteinen, welche in allen Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems sowie dem entsprechenden Tumor exprimiert werden. Diese Hu-Antikörper gehören zur Klasse der IgG und es wird vermutet, dass sie die RNA-Bindung der Hu-Proteine stören sowie zu einer unregulierten Expression von c-fos und c-myc (Transkriptionsfaktoren und Protoonkogene) und somit zu Zelltod oder Apoptose führen (Senties-Madrid and Vega-Boada, 2001).

2.5 Small Fiber Neuropathie

Die Small Fiber Neuropathie ist eine Erkrankung, bei der es zu einer strukturellen Abnormalität sowie dem Untergang der distalen Enden von Nervenfasern kommt; betroffen sind hierbei die dünn myelinisierten A δ -Fasern und die marklosen C-Fasern (Sopacua et al., 2019, Themistocleous et al., 2014). Klinisch dominierend bei dieser Erkrankung sind die z.T. sehr schweren neuropathischen Schmerzen, die die Lebensqualität der Betroffenen deutlich einschränken (Sopacua et al., 2019).

Die Small Fiber Neuropathie kann idiopathisch sein, oder durch Mutationen in Genen, die für spannungsabhängige Natriumkanäle codieren verursacht werden. Sie ist zudem häufig mit Erkrankungen wie Diabetes Mellitus, Vitamin-B12-Mangel und Autoimmunerkrankungen assoziiert (Sopacua et al., 2019). Häufig wird die Diagnose der Small Fiber Neuropathie erst spät gestellt, sodass die Patienten oft schon eine längere Krankengeschichte und nicht sel-

ten durch Fehldiagnosen bedingte Therapieversuche hinter sich haben (Themistocleous et al., 2014).

Die Diagnostik dieser Erkrankung erweist sich als teils schwierig, da die Symptome von Patient zu Patient variieren können und es möglich ist, dass die Patienten zwar starke Schmerzen haben, sich aber kaum Befunde einer Neuropathie bei der klinischen Untersuchung und bei der Messung der Nervenleitgeschwindigkeit finden lassen (Cazzato and Lauria, 2017). Beim Therapiemanagement der Small Fiber Neuropathie liegt der Fokus aktuell vor allem auf der Linderung der Symptome (Sopacua et al., 2019).

Es gibt aktuell noch keine epidemiologischen Daten aus systematischen Studien, laut einer niederländischen Studie ergab sich aber eine Inzidenz von 12/100 000, eine Prävalenz von 53/100 000 und, dass vorwiegend Männer über 65 Jahre betroffen sind (Cazzato and Lauria, 2017, Tavee, 2018). Auch Kinder können an der Small Fiber Neuropathie erkranken, hier ist die Diagnose jedoch erschwert, da es noch keine Daten bezüglich der Norm der intraepidermalen Nervendichte (IENFD) bei Kindern gibt (Sopacua et al., 2019).

Laut Studien hat sich gezeigt, dass die Krankheit nur langsam progressiv ist (Themistocleous et al., 2014). Sie hat zudem i.d.R. einen gutartigen Verlauf und geht nur selten in eine Neuropathie von dick myelinisierten Nervenfasern über. Ein solcher Übergang in eine sogenannte gemischte Neuropathie, bei der auch die großen Nervenfasern betroffen sind, hat sich bisher nur bei Patienten mit Diabetes Mellitus bzw. einer Prädiabetes gezeigt (Sommer and Üçeyler, 2018).

Die bei der Small Fiber Neuropathie betroffenen kleinen Nervenfasern, die dünn myelinisierten A δ - und marklosen C-Fasern, sind Fasern des peripheren Nervensystems und enden in der Epidermis (Themistocleous et al., 2014). Diese sensorischen Enden von Nervenfasern haben, wie durch Sopacua et al. (2019) erläutert, ihren Ursprung in Nervenbündeln der subpapillären Dermis. Sie verlieren ihre Behüllung mit Schwann'schen Zellen, wenn sie die dermoepidermale Junktionszone durchqueren und haben spezielle somatische Funktionen. Dadurch, dass sie Capsaicin-Rezeptoren exprimieren, fungieren sie unter anderem als Nozizeptoren (Sopacua et al., 2019).

Die A δ - Fasern gehören laut der Klassifikation von Nervenfasern nach Lloyd und Hunt der Klasse III an, sie haben einen Durchmesser von ca. 2-7 μ m und leiten mit einer Geschwindigkeit von 10-40 m/s (Hoth and Rettig, 2021). Sie sind als nozizeptive Afferenzen für die Wahrnehmung von hellem Sofortschmerz und als Thermoafferenzen für die Wahrnehmung von Kälte verantwortlich, außerdem haben sie präganglionäre sympathische und parasympathische Funktionen (Hoth and Rettig, 2021, Themistocleous et al., 2014).

Bei den C-Fasern handelt es sich nach der Klassifikation von Lloyd und Hunt um die Faserklasse IV, sie haben einen Durchmesser von ca. 0,5-1,5 μm und leiten mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,5-2 m/s (Hoth and Rettig, 2021). Sie sind als nozizeptive Afferenzen für die Wahrnehmung von dumpfem Spätschmerz und als Thermoafferenzen für die Wahrnehmung von Wärme verantwortlich und haben außerdem als postganglionäre Fasern auch efferente Funktionen (Hoth and Rettig, 2021, Themistocleous et al., 2014).

Die A δ - und C-Fasern innervieren als prä- und postganglionäre Fasern auch Strukturen wie Schweißdrüsen, Blutgefäße und das Herz (Themistocleous et al., 2014). Dies erklärt, warum es im Rahmen der Small Fiber Neuropathie auch zu Dysfunktionen des autonomen Nervensystems kommen kann (Sopacua et al., 2019).

Klinik

Die Symptome einer Small Fiber Neuropathie variieren was ihre Stärke und Ausprägung angeht stark von Patient zu Patient. Typischerweise beginnen sie in den Füßen und breiten sich nach proximal aus, wenn sie der längenabhängigen Form folgen, sodass es zur Involvierung der Hände in Form eines Handschuhs kommen kann (Themistocleous et al., 2014). Es kann aber auch zu nicht-längenabhängigen Manifestationen der Symptome kommen (Sopacua et al., 2019).

Dominierend sind vor allem die schweren neuropathischen, brennenden oder prickelnden Schmerzen, die auch eine juckende Komponente haben können (Sommer and Üçeyler, 2018, Themistocleous et al., 2014). Üblicherweise sind diese Schmerzen andauernd und nicht abhängig von Stimuli, auch wenn manche Patienten von Schmerzprovokation durch das Tragen von Socken oder dem Gefühl der Bettdecke, die ihre Füße berührt, sprechen. Wenn es getriggert durch erhöhte Temperaturen oder Training zu Schmerzattacken kommt, kann dies ein Indiz dafür sein, dass eine schmerzhaft Kanallopathie im Sinne einer Mutation des spannungsabhängigen Natriumkanals 1.7 und/ oder ein Morbus Fabry vorliegen könnte (Themistocleous et al., 2014). Bei Morbus Fabry handelt es sich um eine lysosomale Speicherkrankheit, die X-chromosomal vererbt wird und bei welcher es durch einen Defekt der α -Galaktosidase zu einer Anreicherung von Trihexosylceramid in den Geweben diverser Organe kommt (Zidek, 2021).

Dysautonische Komponenten sind ebenfalls möglich, sodass die Patienten Symptome wie trockene Augen oder einen trockenen Mund, orthostatischen Schwindel, Störungen der Verdauung und der Miktion, Akkommodationsprobleme, Impotenz, veränderte Perspiration, verminderte Ejakulation oder verminderte vaginale Lubrikation sowie Hitzewallungen und Palpitationen des Herzens erleiden können (Sopacua et al., 2019).

Des Weiteren wurden Muskelkrämpfe bei Small Fiber Neuropathie beschrieben, was eventuell die Lokalisation der kleinen Nervenfasern als thermo- und nozizeptive Afferenzen des Muskels widerspiegeln könnte (Sopacua et al., 2019).

Generell zeigen sich, wie bei Sopacua et al. (2019) beschrieben, bei der neurologischen Untersuchung jedoch keine Abnormalitäten in der Funktion von motorischen oder großen Nervenfasern, wohingegen Hyperalgesie und Allodynie häufig mit dem Verlust von nozizeptiver und Temperatur-Wahrnehmung einhergehen. Es zeigte sich außerdem eine signifikante Assoziation zwischen der Schwere des Schmerzes und dem Gesundheitszustand der Patienten.

Bei der klinischen Inspektion kann das betroffene Hautareal mit trophischen Veränderungen, wie trockener, rissiger oder glänzender Haut imponieren (Sopacua et al., 2019).

Ätiologie

Es gibt viele verschiedene Ursachen für die Small Fiber Neuropathie, man unterscheidet hierbei zwischen der erworbenen und der genetisch bedingten Erkrankungsform. Sollte sich trotz umfangreicher Diagnostik, zu der auch eine serologische Diagnostik gehört, keine Ursache finden, ist von einer idiopathischen Form die Rede (Sommer and Üçeyler, 2018). In der Tabelle 1 findet sich eine Übersicht über die verschiedenen möglichen Ursachen einer Small Fiber Neuropathie.

Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Ursachen für Small Fiber Neuropathie (Themistocleous, Ramirez et al. 2014)

Primary	Secondary
Idiopathic	Metabolic
▶ Idiopathic small fibre neuropathy	▶ Impaired glucose tolerance
▶ Burning mouth syndrome	▶ Diabetes mellitus
	▶ Rapid glycaemic control
	▶ Vitamin B12 deficiency
	▶ Dyslipidaemia
	▶ Hypothyroidism
	▶ Chronic kidney disease
Hereditary/genetic	Infections
▶ Na _v 1.7 mutations	▶ HIV
▶ Na _v 1.8 mutations	▶ Hepatitis C
▶ Familial amyloid polyneuropathy	▶ Influenza
▶ Fabry's disease	Toxins and drugs
▶ Tangier's disease	▶ Anti-retrovirals
	▶ Antibiotics—metronidazole, nitrofurantoin, linezolid
	▶ Chemotherapy—bortezomib
	▶ Flecainide
	▶ Statin
	▶ Alcohol
	▶ Vitamin B6 toxicity
	Immune mediated
	▶ Coeliac disease
	▶ Sarcoidosis
	▶ Sjögren's syndrome
	▶ Rheumatoid arthritis
	▶ Systemic lupus erythematosus
	▶ Vasculitis
	▶ Inflammatory bowel disease
	▶ Paraneoplastic
	▶ Monoclonal gammopathy/amyloid

Note that a number of these conditions may present as a small fibre neuropathy and then evolve to include large fibres.

Die häufigste Ursache ist Diabetes Mellitus bzw. eine gestörte Glucosetoleranz, welche jeden dritten Fall an Small Fiber Neuropathie bedingt (Themistocleous et al., 2014). Deshalb gehören die Blutzuckerbestimmung und die Ermittlung des HbA1c, sowie ein oraler Glucosetoleranztest (oGTT) zu der Basisdiagnostik bei Verdacht auf SFN (Sommer and Üçeyler, 2018). Bei Diabetes Mellitus gibt es ein komplexes Wechselspiel von verschiedenen metabolischen Faktoren, Ischämie und eine neuronale Schädigung, sowie Prädisposition für eine gestörte Genesung peripherer Neurone, Gliazellen und Gefäßendothel, sodass es schließlich zu einer Verletzung von Neuronen und einer peripheren Neuropathie kommt (Themistocleous et al., 2014).

Wie von Themistocleous et al. (2014) erläutert, ist in Subsahara Afrika HIV sowie die kontinuierliche Einnahme neurotoxischer antiretroviraler Medikamente der wahrscheinlich häufigsten Ursache für Small Fiber Neuropathie.

figste Grund für die Entstehung einer SFN. Bei HIV kommt es zu einer peripheren axonalen Schädigung durch Aktivierung der Immunreaktion, welche ein für periphere Nerven toxisches Mikromilieu schafft. Des Weiteren verursachen auch antiretrovirale Medikamente, vor allem die Nukleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren, eine axonale Schädigung peripherer Nerven, indem sie mitochondrial toxisch wirken (Themistocleous et al., 2014).

Auch bei diversen autoimmunen und inflammatorischen Erkrankungen kann es zur Entstehung von SFN kommen, man vermutet hier als Ursache spezielle Autoantikörper, die gegen neuronale Proteine gerichtet sind. Der genaue Pathomechanismus ist aber noch nicht geklärt (Themistocleous et al., 2014).

Eine weitere mögliche Ursache stellt die Hypothyreose dar, welche durch einen TSH-Test diagnostiziert werden kann (Sommer and Üçeyler, 2018).

Wenn es zu einem subakuten Beginn kommt, liegt die Möglichkeit einer entzündlichen oder auch postinfektiösen Genese nahe (Sommer and Üçeyler, 2018).

Bei Morbus Fabry, auch eine mögliche Ursache für SFN, zeigen die Patienten brennende akrale Schmerzen, die durch Hitze, Fieber oder körperliche Belastung induziert werden und sich schon im Kindesalter manifestieren können. Des Weiteren zeigen sie auch eine subklinische SFN, was bedeutet, dass im Rahmen der klinischen Untersuchungen pathologische Befunde wie z. B. eine erhöhte Empfindungsschwelle für das Gefühl von Kälte, erhoben werden, ohne, dass die Patienten subjektiv den Verlust der Temperaturempfindung oder Schmerzen beschreiben (Sommer and Üçeyler, 2018).

Zudem kann eine Small Fiber Neuropathie auch genetisch bedingt sein. Spannungsabhängige Natriumkanäle spielen eine essenzielle Rolle in der Regulation der Erregbarkeit von primär afferenten nozizeptiven Neuronen. Es gibt drei Typen dieser Kanäle, die vorrangig in den peripheren Neuronen exprimiert werden und bekannterweise eine Rolle in menschlichen Schmerzerkrankungen spielen. Diese wären $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ und $\text{Na}_v1.9$, welche von den Genen SCN9A, SCN10A und SCN11A codiert werden (Sopacua et al., 2019).

Der Kanal $\text{Na}_v1.7$ wird selektiv in sensorischen und autonomen Nervenzellen exprimiert (Themistocleous et al., 2014). Wie bei Sopacua et al. (2019) beschrieben, wurde die erste *gain-of-function* Mutation in $\text{Na}_v1.7$, welche die Eigenschaften des Kanals und der Erregbarkeit der Spinalganglien verändert, im Jahr 2012 bei einer durch eine Hautstanzbiopsie und QST bestätigten idiopathischen SFN beschrieben. Unerwarteterweise zeigte sich, dass es einerseits zwar eine starke Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei einigen Mutationen gibt, aber andererseits manche Patienten, die Träger von $\text{Na}_v1.7$ -Varianten sind, einen bemerkenswerten Grad an Genotyp-Phänotyp-Variabilität zeigen. So kann eine einzige $\text{Na}_v1.7$ -Variante mit einer großen Palette an klinischen Phänotypen assoziiert sein und die gleichen klinischen Phänotypen wiederum können mit vielen verschiedenen Mutationen as-

soziiert sein. Auch zeigte ein Teil der Patienten schwere Symptome einer Dysautonomie, andere hingegen gar keine. Diese unterschiedlichen Effekte bestimmter Na_v1.7-Mutationen, die eine Hyperreagibilität in den Spinalganglien und eine Hyporeagibilität in den sympathischen Neuronen bewirken, können mit der Anwesenheit von Na_v1.8-Kanälen in den Spinalganglien versus die Abwesenheit dieser in den Ganglien sympathischer Neurone erklärt werden. Mutationen des Na_v1.7-Kanals können wahrscheinlich auch verschiedene Zelltypen beeinflussen, auch solche außerhalb des Nervensystems. So entwickeln manche Patienten mit schmerzhafter Small Fiber Neuropathie einen Diabetes Mellitus erst Jahre nachdem die SFN klinisch manifest wurde. Es wird spekuliert, dass Na_v1.7-Mutationen nicht nur in Spinalganglien und Neuronen, sondern auch in den Beta-Zellen des Pankreas vorhanden sind und somit eine erhöhte Prädisposition für die Entwicklung eines Diabetes Mellitus durch eine Schädigung der Beta-Zellen bewirken können und durch die starke Wirkung auf die Spinalganglien die schmerzhafteste Neuropathie entsteht. Allerdings muss diese Hypothese erst durch weitere Studien belegt werden (Sopacua et al., 2019).

Der Kanal Na_v1.8 wird, laut Sopacua et al. (2019), in den Axonen peripherer Nerven und in den Spinalganglien exprimiert. Er beeinflusst den Natrium-Einstrom und somit den Aufstrich des Aktionspotenzials und unterstützt außerdem das repetitive Feuern der Nervenzellen als Antwort auf eine anhaltende Depolarisation. Auch *gain-of-function* Mutationen dieses Kanals wurden bei Patienten mit schmerzhaften Neuropathien gefunden. Diese bewirken eine verstärkte Kanalantwort bei Depolarisation und führen zu einer Hyperreagibilität der Neurone der Spinalganglien, was eine herabgesetzte Erregungsschwelle zur Folge hat und somit zu einer gesteigerten Feuer Frequenz und Spontanaktivität führt. Auch andere Mutationen des Na_v1.8-Kanals konnten mit der Small Fiber Neuropathie in Zusammenhang gebracht werden, manche davon mit einem klinischen Phänotyp, der auf eine schwere Dysautonomie hinweist (Sopacua et al., 2019).

Bei 5% der Patienten mit SFN in einer Kohorte von 921 Patienten, wurde eine Mutation des Nav1.8-Kanals gefunden (Sopacua, Hoeijmakers et al. 2019).

Der Natriumkanal Na_v1.9 wird, nach Sopacua et al. (2019), spezifisch in Neuronen des Spinalganglions mit geringem Durchmesser, in Neuronen trigeminaler Ganglien und in intrinsischen myenterischen Neuronen exprimiert. Mit *gain-of-function* Mutationen dieses Kanals sind diverse Schmerzerkrankungen assoziiert, so auch die Small Fiber Neuropathie. Die Expression von Na_v1.9 in myenterischen Neuronen könnte die Erklärung für die gastrointestinalen Symptome sein, die von Patienten mit SCN11A-Mutationen beschrieben werden. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass *gain-of-function* Mutationen dieses Kanals ebenfalls bei Patienten mit einer Unempfindlichkeit gegenüber Schmerzen auftritt, welche in diesen Fällen durch die massive Depolarisation der Neuronen der Spinalganglien entsteht, welche die Natriumkanäle dieser Nervenzellen inaktivieren und so ihre Erregbarkeit herabsetzen (Sopacua et al., 2019).

Außer der SFN sind auch noch weitere Schmerzerkrankungen mit Mutationen im SCN9A Gen assoziiert, so auch die erbliche Erythromelalgie, die paroxysmale Hemikranie und die Kanalopathie-assoziierte Unempfindlichkeit gegenüber Schmerz (Sopacua et al., 2019).

Laut Sopacua et al. (2019), lässt sich also erkennen, dass Mutationen im Na_v1.7-Gen für eine große Bandbreite an Phänotypen verantwortlich sind, u. a. auch für die SFN und, dass es nicht immer klar ist, welche Verbindungen zwischen diesen Phänotypen besteht. So ist der brennende handschuh-/ strumpfförmige Schmerz zwar charakteristisch für die SFN, allerdings kommt er auch bei der erblichen Erythromelalgie vor. Bei der Erythromelalgie zeigt sich allerdings, anders als bei der Small Fiber Neuropathie, keine Reduktion bezüglich der IENFD. Auch fazialer und diffuser oder großflächiger Schmerz kann bei Patienten mit Small Fiber Neuropathie vorkommen, ist aber auch bei Patienten mit paroxysmaler Hemikranie möglich. Das Symptom der Rötung der Haut kann sowohl bei Erythromelalgie als auch bei paroxysmaler Hemikranie, und auch, allerdings in geringerem Umfang, bei der SFN vorkommen. Dies lässt sich möglicherweise durch die Aktivität mutierter Na_v1.7-Kanäle in glatten Muskelzellen und sympathischen Nervenfasern erklären, die für die Innervation von Blutgefäßen, welche die Haut versorgen, verantwortlich sind. Diese Überschneidungen von Symptomen bei Schmerzerkrankungen, verursacht durch Mutationen im gleichen Kanal gehen sogar so weit, dass Mischtypen, bezogen auf den Phänotyp, zwischen Erythromelalgie, paroxysmaler Hemikranie und SFN und beschrieben werden (Sopacua et al., 2019).

Obwohl also bekannt ist, dass Mutationen in den Genen für die spannungsabhängigen Natriumkanäle (SCN9A, SCN10A und SCN11A) ursächlich für bestimmte Schmerzerkrankungen sein können, ist es dennoch wichtig, zwischen krankheitsverursachenden Mutationen, Mutationen, die krankheitsbeeinflussend sind und Mutationen, deren Signifikanz für die Erkrankung unklar ist, zu unterscheiden. Auch wird aktuell diskutiert, ob manche Mutationen wirklich krankheitsbeeinflussend bezüglich der SFN sind oder eher als eine Art Risikofaktoren fungieren. Es gibt einen Konsens darüber, dass die neu beschriebenen Genvarianten von SCN9A, SCN10A und SCN11A in Kontext mit dem Phänotyp, der familiären Krankengeschichte, sowie dem funktionellen *Profiling* der mutierten Kanäle beurteilt werden sollen und die Mutationen dieser Gene mit pathologischer hypererregbarer Kanalaktivität nur behutsam in der klinischen Praxis zu nutzen, sollte es nicht möglich sein, anhand der Symptome eine klare Zuordnung zu einer Diagnose vorzunehmen (Sopacua et al., 2019).

Pathomechanismus

Nach Sommer and Üçeler (2018), unterliegen die betroffenen marklosen Nervenendigungen der C-Fasern in der epidermalen Hautschicht einer ständigen Regeneration, da die Epidermis des Menschen ca. alle 30 Tage erneuert wird und somit auch die intraepidermalen Nervenfasern verloren gehen. Diese regenerieren sich aus dem subepidermalen Nervenplexus.

Durch diese andauernde Regeneration weisen beim gesunden Menschen fast alle intraepidermalen Nervenfasern den Regenerationsmarker GAP43 auf. Es ist möglich, dass Faktoren, welche mit der axonalen Regeneration interferieren, z.B. eine gestörte mitochondriale Funktion oder die Behinderungen des axonalen Transports, eine *Imbalance* zwischen der Degeneration und der Regeneration hervorrufen und dadurch eine SFN verursachen können (Sommer and Üçeyler, 2018).

Auch Studien bezüglich der Mutationen in den Genen der spannungsabhängigen Natriumkanäle kamen zu der Erkenntnis, dass hier, wahrscheinlich durch die ständige Überaktivität, aber auch durch mitochondriale Störungen, eine axonale Degeneration die Folge sein kann (Sommer and Üçeyler, 2018).

Auch eine erhöhte Natriumkonzentration in den Neuronen oder Behinderungen bzw. die Umkehrung des Natrium-/ Kalzium-Austauschers könnten zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Nervenzellen und schließlich zur Degeneration der kleinen Nervenfasern führen (Themistocleous et al., 2014).

Eine andere Theorie besagt, dass es zu einer selektiven Degeneration von kleinen Neuronen, die im Spinalganglion lokalisiert sind, kommt. Dies führt aber in der Regel zu einer generalisierten, nicht-längenabhängigen Form der Small Fiber Neuropathie. Vermutet wird dies bei Zöliakie, M. Sjögren, Hepatitis C und einer gestörten Glucosetoleranz (Sommer and Üçeyler, 2018).

Diagnostik

Zur Diagnostik der SFN gehört zuerst die Anamnese, in welcher man u.a. Schmerzlokalisation, -stärke und -charakter sowie mögliche Trigger erfragt und für welche man standardisierte Schmerzfragebögen, wie z.B. den *Neuropathic Pain Symptom Inventory* (NPSI), den es auch als deutsche Version gibt, nutzen. Besteht daraufhin der Verdacht auf eine Small Fiber Neuropathie, erfolgt die klinisch neurologische Untersuchung (Sommer and Üçeyler, 2018).

Nach Stewart und Lacomis müssen die Rückschlüsse, ob eine SFN vorliegt, im Anschluss an die entsprechende Anamnese, aufgrund der Befunde folgender Untersuchungen erfolgen (Sommer and Üçeyler, 2018):

- Klinisch-neurologische Untersuchung, mit Zeichen einer gestörten Funktion der dünnbemarkten und marklosen Nervenfasern (z.B. Hyperalgesie, Allodynie etc.) (Papagianni, 2018),
- Quantitative sensorische Testung (QST)/ spezielle Small-Fiber-Neurophysiologie (Papagianni, 2018),
- Hautstanzbiopsie (Sommer and Üçeyler, 2018).

Ist nur in einer dieser Untersuchungen ein Hinweis auf eine SFN zu finden, spricht man von einer möglichen SFN. Sind in zwei dieser Untersuchungen Befunde zu finden, die für eine SFN sprechen, ist von einer wahrscheinlichen SFN die Rede. Sind in allen diesen Untersuchungen Befunde zu finden, die für eine SFN sprechen, spricht man von einer sicheren SFN (Sommer and Üçeyler, 2018). Bei Befunden, die auf eine Beteiligung dickbemarkter Nervenfasern hindeuten, wie ein vermindertes Vibrationsempfinden, ein gestörter Lagesinn, Lähmungen, Muskelatrophien, fehlende Reflexe oder entsprechende pathologische elektroneurographische Befunde, kann man die Diagnose einer Small Fiber Neuropathie nicht stellen (Papagianni, 2018). Allerdings muss hierbei auch bedacht werden, dass die genannten Kriterien zwar erfüllt sein können, aber es dennoch, wenn schwere Begleiterkrankungen vorliegen sollten, z. T. nicht möglich ist, eine isolierte SFN zu diagnostizieren sowie auch eine Dysfunktion, v.a. hinsichtlich der Hyperreagibilität bei kleinen Nervenfasern nicht zwingend zu einem Funktionsverlust in einem dieser Tests oder einer verminderten IENFD führen muss (Sommer and Üçeyler, 2018).

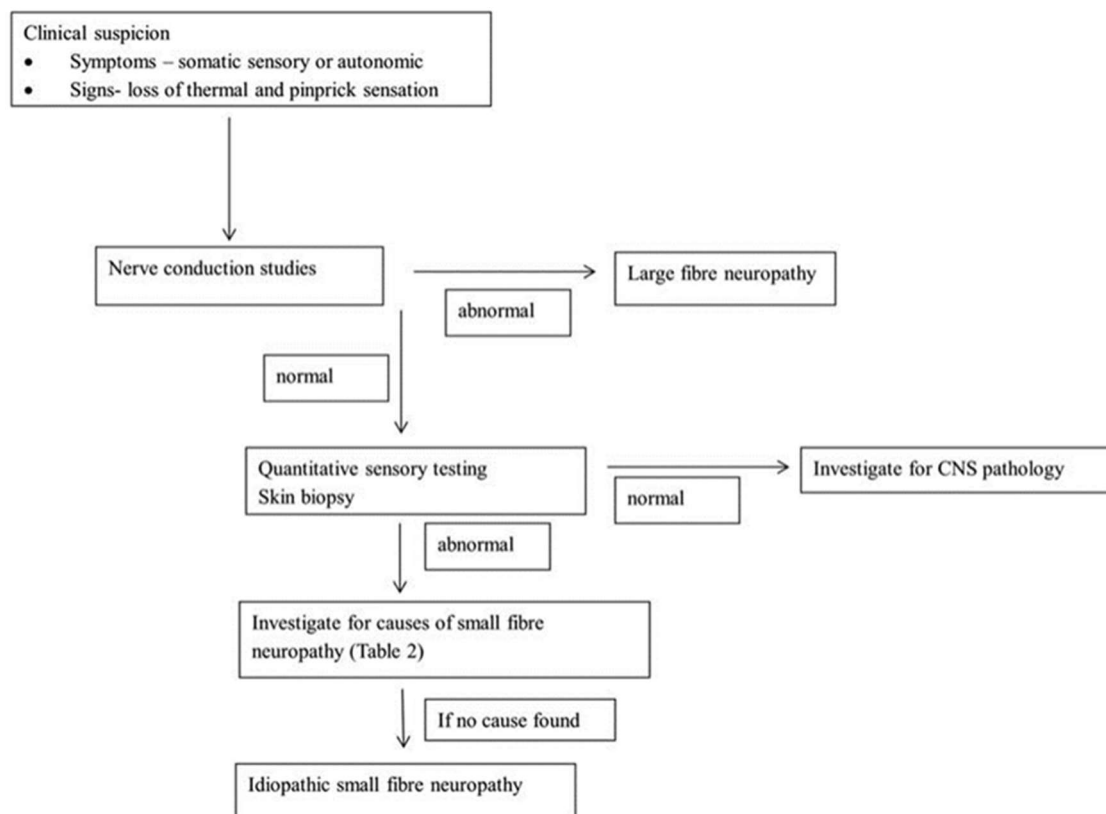


Abbildung 9: Vorgehen und Algorithmus bei der Diagnose der SFN (Themistocleous, Ramirez et al. 2014)

Hautbiopsie

Die Problematik bei der Diagnostik der SFN ist, dass bis dato ein echter Goldstandard fehlt, daher wird aktuell die Hautstanzbiopsie als solcher angesehen, (Papagianni, 2018, Sopacua et al., 2019). Diese wird bei klinisch verdächtigen Patienten angewandt. Hierbei wird meist eine ca. 3 mm (Durchmesser) große Stanze ca. 10 cm proximal des lateralen Malleolus, innerhalb des Innervationsgebiets des N. Suralis entnommen (Sopacua et al., 2019) sowie z.T. zusätzlich etwa 20 cm distal der Spina iliaca anterior superior am proximalen Oberschenkel (Sommer and Üçeyler, 2018). In diesen Hautproben wird dann immunhistochemisch durch Antikörper gegen das Genprodukt PGP9.5 (*protein gene product 9.5*), eine zytoplasmatische Ubiquitin Hydrolase, welche typischerweise in Nervenfasern gefunden wurde, die intraepidermalen Nervenfasern angefärbt und deren Dichte (IENFD) mittels licht-/ fluoreszenzmikroskopischer Auswertung detektiert (Sopacua et al., 2019, Themistocleous et al., 2014). Hierbei wird die Anzahl der Nervenfasern quantifiziert, die die dermo-epidermale Junctionszone durchqueren. Hierbei ist die Länge des Abschnitts abgemessen und man erhält so die lineare Dichte der IENF pro Millimeter, welche mit den Normwerten des entsprechenden Alters und Geschlechts verglichen wird (Sopacua et al., 2019).

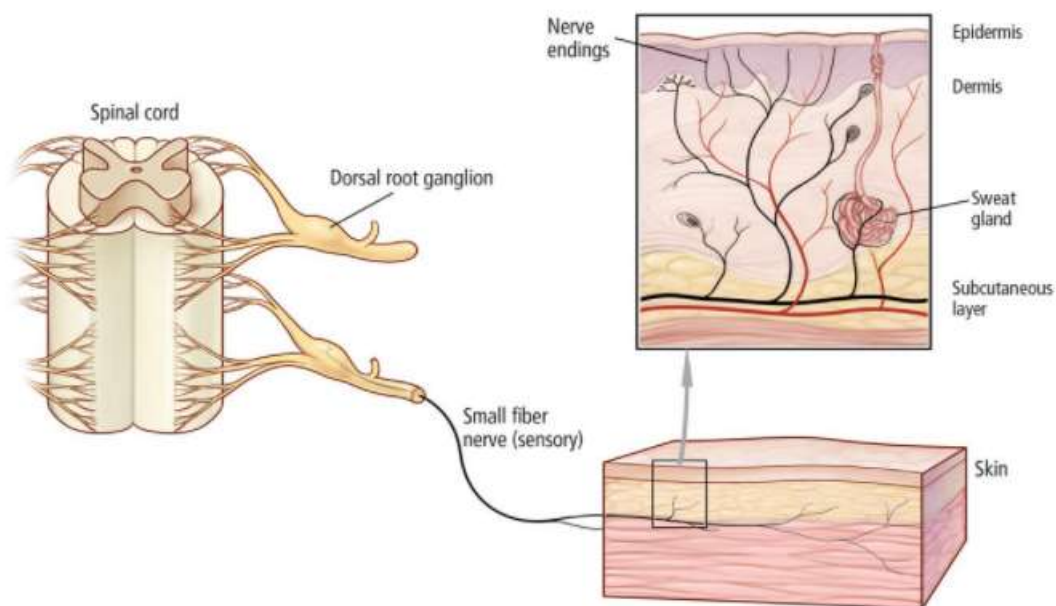


Abbildung 10: Skizzenhafter Überblick über die Innervation der Haut (Tavee 2018).

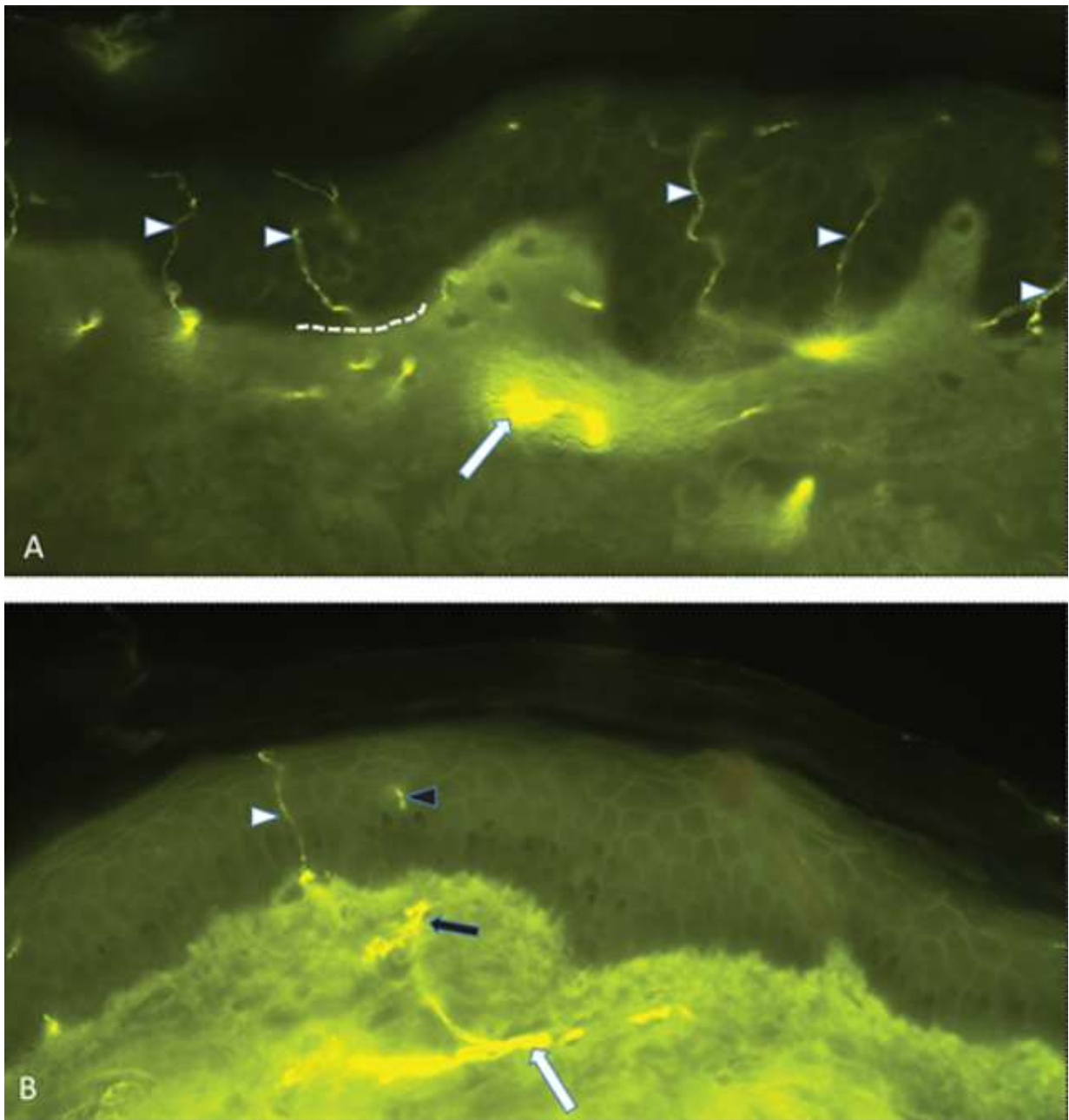


Abbildung 11: Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Hautstanzbiopsie einer gesunden Kontrollperson A und eines Patienten mit SFN B. In A ist eine gesunde Kontrollperson zu sehen, hier kreuzen eine große Anzahl an intraepidermalen Nervenfasern (mit Pfeilköpfen gekennzeichnet) die Basalmembran, welche als gestrichelte Linie gekennzeichnet ist und die Grenze zwischen Epidermis und Dermis darstellt (Sommer and Üçeyler, 2018). In B hingegen sieht man einen Patienten mit SFN, bei welchem eine deutliche Reduktion der IENFD erkennbar ist (Sommer and Üçeyler, 2018). Der dunkle Pfeil zeigt hierbei auf ein Faserfragment, dass erst weiter untersucht werden muss, um zu klären, ob es als intraepidermale Nervenfaser zählt (Sommer and Üçeyler, 2018).

Sommer and Üçeyler (2018) führen aus, dass es durch die Entnahme an zwei verschiedenen Stellen möglich ist, die Hautinnervation distal und proximal zu vergleichen. Findet sich in beiden Hautproben eine Faserreduktion, so kann die Diagnose einer nicht längenabhängigen SFN gestellt werden. Findet sich hingegen lediglich eine distale Beteiligung, so kann anhand der proximalen Stanze besser abgeschätzt werden, wie groß das Ausmaß der Faserredukti-

on ist. Bei dem gesunden Individuum beträgt der IENFD-Quotient zwischen proximal und distal zwischen 1,5–2, ist dieser Quotient stark erhöht, so spricht man von einer längenabhängigen Small Fiber Neuropathie mit einer Axonopathie als Pathophysiologie, während eine nicht längenabhängige Form i.d.R. auf eine Ganglionopathie zurückzuführen ist (Sommer and Üçeyler, 2018). Kürzlich haben Studien eine Übereinstimmung hinsichtlich der rechts- und linksseitigen IENFD bei Gesunden und auch bei Patienten mit längenabhängiger SFN gezeigt. Des Weiteren zeigte sich, dass sich die IENFD über einen Zeitraum von drei Wochen, welcher der Zeitraum für die Erneuerung der Epidermis ist, als stabil erwiesen hat (Sopacua et al., 2019). Die Nachteile der Hautstanzbiopsie sind, dass die Analyse sehr zeitaufwändig und teuer ist, sie an Patienten mit Hauterkrankungen oder Ödemen z.T. nicht möglich sein kann und, dass sie möglichst nicht an infizierten Arealen durchgeführt werden sollte (Alguire and Mathes, 1998) (Sopacua et al., 2019). Manche Patienten mit Symptomen einer SFN können trotzdem eine normale IENFD haben und eventuell eine prä-degenerative Funktionsschädigung der Nervenfasern repräsentieren, werden aber mittels der Hautstanzbiopsie nicht erfasst (Sopacua et al., 2019). Laut vergangenen Studien hat sich bezüglich der Hautstanzbiopsie für die Diagnostik einer SFN eine Sensitivität von ca. 90 %, eine Spezifität von ca. 95 %, ein positiver prädiktiver Wert von 95 % und ein negativer prädiktiver Wert von 91 % gezeigt. Bei dieser Methode der Diagnostik gibt es eher selten Komplikationen, sie wird von den Patienten i.d.R. gut toleriert und ist bei den meisten Patienten auch durchführbar (Themistocleous et al., 2014). Die Komplikationen, die bei einer Hautstanzbiopsie auftreten können, sind, dass es immer möglich ist, dass eine Narbe zurückbleibt. Es kann außerdem zu einer Infektion kommen, zu Blutungen, die z.T. auch mittels einer Naht gestoppt werden müssen (eine Naht kann auch zur besseren Wundheilung, v.a. bei einer Biopsie, die größer als 3 mm ist, nötig sein) sowie zu allergischen Reaktionen gegen topische Antibiotika, Desinfektionsmittel, Lokalanästhetika und Verbandsmaterial (Alguire and Mathes, 1998). Wie bei Sopacua et al. (2019) beschrieben, nimmt die IENFD generell mit dem Alter ab und die Werte von Proben des Oberarms und der proximalen Oberschenkel sind signifikant größer als die von den Handgelenken und dem distalen Bein. Die Reduktion der IENFD kann außerdem nicht zwischen einer idiopathischen, einer diabetischen oder durch Glucosetoleranzstörung verursachten SFN unterscheiden. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die IENFD auch bei anderen Schmerzerkrankungen reduziert sein kann, so z.B. beim Guillain-Barré-Syndrom, bei Notalgie, der Meralgia Paresthetica, dem Ehlers-Danlos-Syndrom und der Fibromyalgie. Aber auch bei Erkrankungen, die per se keine Schmerzerkrankung sind, wie dem M. Parkinson, der Amyotrophen Lateralsklerose und der pAVK kann die IENFD reduziert sein (Sopacua et al., 2019). Das bedeutet, dass ein Normalbefund bezüglich der IENFD eine SFN nicht zwingend ausschließen kann, aber eine reduzierte IENFD umgekehrt auch nicht zwingend beweisend für eine SFN sein muss (Schlereth T. et al., 2019).

Zusätzlich zu der quantitativen Untersuchung der kleinen Nervenfasern gibt es die Möglichkeit, diese qualitativ zu untersuchen, wie z.B. die Axonschwellung als Marker einer prädegenerativen Veränderung in den Nervenfasern der Patienten. Diese sind allerdings noch nicht ausreichend erforscht (Themistocleous et al., 2014).

Quantitative sensorische Testung

Als Assessment zur Überprüfung der Funktionen der A β -, A δ - und C- Fasern gibt es u.a. die Quantitative sensorische Testung (QST), eine nicht-invasive psychophysische Methode, die die Schwelle der sensorischen Wahrnehmung für mechanische und thermale Reize sowie Schmerz, quantifiziert (Sopacua et al., 2019, Cazzato and Lauria, 2017, Themistocleous et al., 2014). Im Rahmen der QST werden bestimmte Variablen, wie Wahrnehmungsschwelle, Schmerzschwelle und Antwort auf Stimulation erhoben (Themistocleous et al., 2014). Das standardisierte Protokoll des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerzen e.V. (DFNS e.V.) besteht aus 13 Tests (siehe Tabelle 2), deren Ergebnisse mit den Normwerten eines Kontrollkollektivs, bestehend aus 180 Personen, verglichen wird (Sommer and Üçeyler, 2018).

Wichtig für eine gute Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der QST sind dabei standardisierte Protokolle, entsprechendes Equipment, ausgebildete Fachkräfte sowie Normativen, anhand derer die Ergebnisse ausgewertet werden können (Sopacua, Hoeijmakers et al. 2019). In diversen Studien wurde bezüglich der QST eine Sensitivität von ca. 57% und eine Spezifität von ca. 37% gemessen (Papagianni 2018). Es gibt verschiedenen Faktoren, die die Reproduzierbarkeit der QST beeinträchtigen können, wie die Ausbildung des Testers sowie das Training der zu testenden Person, die *Baseline* der Hauttemperatur, der Ort und die Anzahl der Stimuli, der Charakter des Stimulus und die Dauer der Intervalle zwischen den einzelnen Tests (Themistocleous, Ramirez et al. 2014). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die QST durch non-organische Faktoren oder Simulation durch den Patienten beeinflusst wird (Sopacua, Hoeijmakers et al. 2019). Es ist wichtig, dass *cut-off* Werte festgelegt werden, um eine Schädigung der Haut zu vermeiden, was extreme Endpunkte implausible macht (Themistocleous, Ramirez et al. 2014). Mittels der QST ist es möglich, sowohl eine Zunahme als auch einen Verlust der Nervenfunktion zu detektieren (Cazzato and Lauria 2017). Allerdings ist es nicht möglich anhand der QST zwischen peripheren und zentralen Ursachen des sensorischen Defizits zu unterscheiden (Themistocleous, Ramirez et al. 2014). Die beste Sensitivität und Spezifität wird wahrscheinlich erreicht, indem man die Wärme- und Kälteschwellen bilateral sowohl an den Händen als auch an den Füßen testet (Sopacua, Hoeijmakers et al. 2019). Liegt eine Small Fiber Neuropathie vor, werden im Rahmen der QST typischerweise angehobene Schwellen bezüglich der Wärme- und Kältereize detektiert (Papagianni 2018). Dabei ist eine Verschlechterung der thermalen Wahrnehmungsschwelle mit

der Intensität des Schmerzes bei einer peripheren Neuropathie assoziiert (Sopacua, Hoijmakers et al. 2019).

Tabelle 4: Übersicht über die Nervenfasertypen, die mittels der QST erhoben werden, zugeordnet zu den entsprechenden Fasertypen (Papagianni 2018)

QST Modalitäten	A β	A δ	C
MDT	◇		
DMA	◇		
VDT	◇		
CDT		◇	
CPT		◇	
TSL		◇	
PHS		◇	
MPT		◇	
MPS		◇	
PPT		◇	◇
HPT			◇
WDT			◇
WUR			◇

Abkürzungen: CDT (cold detection threshold), CPT (cold pain threshold), DMA (dynamic mechanical allodynia), HPT (heat pain threshold), MDT (mechanical detection threshold), MPT (mechanical pain threshold), MPS (mechanical pain detection), QST (quantitative sensorische Testung), PHS (paradoxical heat sensations), PPT (pressure pain threshold), TSL (thermal sensory limen), VDT (vibration detection threshold), WDT (warm detection threshold), WUR (wind-up ratio).

Weitere Methoden in der Diagnostik der Small Fiber Neuropathie sind u.a. die korneale konfokale Mikroskopie, die nozizeptiven evozierten Potenziale, der Ultraschall peripherer Nerven, MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), die autonomen Testungen und die Messung des „axon flare“ (Papagianni, 2018, Sopacua et al., 2019).

Korneale konfokale Mikroskopie

Die korneale konfokale Mikroskopie (CCM) ist, wie von Sopacua et al. (2019) ausgeführt, eine Methode zur Visualisierung der unmethylierten C-Fasern, die aus dem Nervus ophthalmicus, einem Ast des Nervus Trigeminus entspringen und durch die Bowman-Membran der Cornea ziehen sowie des subbasalen Plexus (zwischen Bowman- und Basalmembran. Dies ermöglicht eine in vivo Evaluation von krankheits- oder operationsinduzierten Veränderungen der kornealen Nerven. Mittels dieser Methode werden 4 etablierte Parameter untersucht und quantifiziert: die korneale Nervenfaserdichte (CNFD), die Anzahl der Verästelungspunkte der kornealen Nerven (CNBD), die korneale Nervenfaserlänge (CNFL) und die korneale Nervenfasertortuosität (CNFT). Die erhobenen Bilder werden automatisiert ausgewertet und die Parameter können anhand von Normwerten gesunder Individuen verglichen werden (Sopacua et al., 2019).

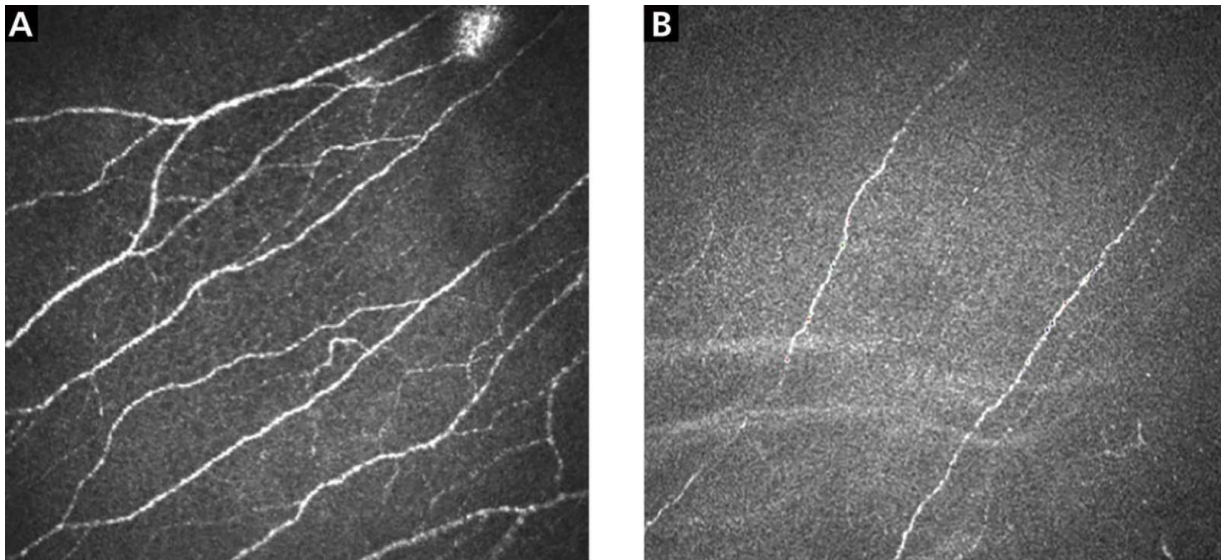


Abbildung 12: Vergleich der CFND bei einer gesunden Kontrollperson A mit einer an SFN erkrankten Person B in der CCM (Tavee 2018)

Bei Patienten mit Diabetes, nach einer Nieren- und Pankreas-Transplantation sowie einer kontinuierlichen subkutanen Insulintherapie und einer Optimierung der Therapie der arteriellen Hypertonie und Hyperlipidämie (Schlereth T. et al., 2019), zeigte sich eine Regeneration der kleinen Nervenfasern in der Kornea, allerdings ohne eine Verbesserung der IENFD oder in der QST (Sopacua et al., 2019).

Autonome Testungen

Methoden die zu den autonomen Testungen zählen, um eine autonome Dysfunktion zu detektieren, sind u.a. die Messung der sympathischen Hautantwort (SSR= *sympathetic skin response*), die thermoregulatorische Schweißtestung (TST= *thermoregulatory sweat test*), die Untersuchung des quantitativen sudomotorischen Axonreflexes (QSART), die Testung des quantitativen direkten und indirekten Axon-Reflexes und auch die Analyse der Herzfrequenzvarianz (Papagianni, 2018). Veränderungen des peripheren autonomen Nervensystems können eine frühe Manifestation bei der Small Fiber Neuropathie sein (Sopacua et al., 2019).

Ultraschall

Der Ultraschall peripherer Nerven zeigt, laut Sopacua et al. (2019), bei Patienten mit SFN und reduzierter IENFD eine Verbreiterung bezüglich der Querschnittsfläche des Nervus Suralis, verglichen mit BMI-gleichen gesunden Kontrollpersonen. Dies ist ein Indiz dafür, dass es bei SFN auch zu einer Veränderung in der Struktur oder Morphologie von großen Nervenfasern kommt. Mögliche Erklärungen für diese Verbreiterung großer Nervenfasern sind z.B. ein gestörter axoplasmatischer Fluss in den proximalen (größeren) Nervensegmenten durch den Verlust oder die Schädigung der distalen kleinen Nervenfasern. Oder eine Natriumkanal-Dysfunktion, welche zu einer axonalen Degeneration mit Axon-Schwellung führt. Alternativ kann auch eine Veränderung im Extrazellularraum peripherer Nerven und/ oder Veränderungen von nicht-neuronalem Gewebe, welches die Axone umgibt, ursächlich dafür sein (Sopacua et al., 2019).

MRI

Bei der Magnet-Resonanz-Tomografie (MRI) handelt es sich um eine nicht-invasive Technik, bei welcher die neuronale regionale Aktivität in verschiedenen, spezifischen Teilen des Gehirns bei Patienten mit chronischen Schmerzen gemessen wird. Die Denervation der Haut ist assoziiert mit einer abnormalen Rekrutierung von Schmerz-assoziierten Regionen des Gehirns und dortigen veränderten Aktivitätsmustern. In diesen Regionen zeigt sich eine Volumenreduktion, v.a. bilateral im anterioren cingulären Cortex, welcher verantwortlich für die Schmerzverarbeitung ist. Es besteht außerdem ein Zusammenhang mit einer starken Reduktion der IENFD (Sopacua et al., 2019).

axon flare

Bei der Messung des „axon flare“ erfolgt eine pharmakologische oder elektrische Stimulation der C-Fasern (Papagianni, 2018). Nach dieser C-Faser-Aktivierung erfolgt eine Ausbreitung der Aktionspotenziale in alle Verästelungen des axonalen Baums der Haut (Schlereth et al., 2019). Dies führt in den Nervenendigungen zu einer Freisetzung von Neuropeptiden, genauer des Neuropeptids *Calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP), welches eine neurogene Vasodilatation mit einhergehender Hautrötung („Flare“), dem sogenannten Axon-Erythem zur Folge hat (Papagianni, 2018, Schlereth et al. 2019). Die Ausdehnung dieser Hautrötung wird anschließend mittels eines *Laser-Doppler-Imaging* (LDI) gemessen und zeigt eine starke Korrelation mit der Dysfunktion der entsprechenden C-Fasern sowie der IENFD (Papagianni, 2018). Kommt es zu einer Degeneration von C-Fasern oder ist die Weiterleitung ihrer Aktionspotenziale gestört, verkleinert sich das Axon-Erythem (Schlereth et al., 2019).

LEP, CHEP und PREP

Wie bei Sopacua et al. (2019) beschrieben, kann die Messung nozizeptiver evozierter Potenziale genutzt werden, um die Leitungseigenschaften der kleinen Nervenfasern in einer Weise zu detektieren, die nicht abhängig von der Patienten-Kooperation und -Aufmerksamkeit sind. Diese Potenziale können entweder durch Hitze-Strahlung, das wären die sogenannten Laser-evozierten Potenziale (LEPs), oder durch Kontakthitze, das wären die sogenannten Kontakthitze-evozierten Potenziale (CHEPs) ausgelöst werden. Diesen beiden Methoden liegt eine selektive Aktivierung von A δ - und C-Fasern zugrunde. Bei der Methode der Schmerzassoziierten-evozierten Potenziale (PREPs, *Pain-related evoked potentials*) hingegen findet vor allem eine Stimulation der A δ -Fasern statt. Nach Stimulation erfolgt eine Ableitung der Potenziale mittels EEG, bei allen drei Methoden zeigt sich bei SFN dabei eine Reduktion der Amplitude (Sopacua et al., 2019).

Therapie

Wenn sich bei der Diagnostik eine Small Fiber Neuropathie herauskristallisiert, so ist es wichtig deren Ursachen herauszufinden. Da es aktuell noch keine therapeutischen Möglichkeiten gibt eine SFN zu heilen oder ihr präventiv entgegenzuwirken, ist die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung, sollte es eine geben, das Schlüsselement der SFN-Therapie (Themistocleous et al., 2014).

So kann, wie von Themistocleous et al. (2014) ausgeführt, eine adäquate Einstellung des Blutzuckers bei Patienten mit Diabetes Mellitus die Krankheitsprogression aufhalten und laut einzelnen Berichten hat eine Pankreas-Transplantation in manchen Fällen sogar eine Regression der Neuropathie bewirkt. Bei Patienten mit Zöliakie und Sjögrens Syndrom hat eine

immunmodulatorische Therapie mit Gamma-Immunglobulinen eine Reduktion der neuropathischen Schmerzen erzielt. Bei Patienten mit Morbus Fabry, einer lysosomalen Speicherkrankheit durch α -Galactosidase-Mangel, hat sich die Substitution des Enzyms als Möglichkeit erwiesen, die neuropathischen Schmerzen zu vermindern und die Temperaturempfindungsschwellen wiederherzustellen (Themistocleous et al., 2014).

Allerdings ist die optimale Therapie der Grunderkrankung nicht in allen Fällen und nicht bei allen Erkrankungen wirksam, um die Small-Fiber-Neuropathie adäquat zu therapieren. So zeigen Patienten, bei denen HIV die Ursache der SFN ist, durch eine erfolgreiche Suppressionstherapie und Senkung der Viruslast unter die Nachweisgrenze, keine Veränderungen bezüglich des Krankheitsprogresses der SFN (Themistocleous et al., 2014).

Aktuell gibt es noch keine erfolgreiche neuroprotektive Therapie bei SFN. Verschiedene Studien, die bezüglich der Regeneration von Nerven mithilfe von neuroprotektiven Faktoren, wie z.B. dem *nerve growth factor*, geforscht haben, zeigten bisher keine ausreichende Wirkung und waren durch Dosis limitierende Nebenwirkungen begrenzt (Themistocleous et al., 2014).

Daher ist es wichtig, dass, sobald die zugrunde liegende Erkrankung therapiert wird, die Behandlung der Komplikationen und Symptome der Small Fiber Neuropathie in den Vordergrund tritt. Diese wären vor allem die starken neuropathischen Schmerzen und auch die Dysautonomie (Themistocleous et al., 2014). Beide sind nicht einfach zu therapieren, so zeigen sich neuropathische Schmerzen bei klassischer Schmerztherapie z.T. nicht ausreichend eingestellt. Realistische Ziele einer Therapie neuropathischer Schmerzen sind eine Reduktion der Schmerzen um $\geq 30\%$, eine Verbesserung des Schlafs sowie der Lebensqualität, das Erhalten der Arbeitsfähigkeit sowie der Einbindung in ein soziales Gefüge und soziale Aktivitäten und schließlich auch eine Verbesserung der Funktionalität. Bei der Überlegung, welche Medikamente genutzt werden sollen, gilt es zu beachten, dass bei einigen Substanzen ein *off-label-use* stattfindet (Schlereth T. et al., 2019).

Es gibt drei Hauptklassen von Medikamenten, die laut Sopacua et al. (2019) in der Behandlung einer Neuropathie hauptsächlich Anwendung finden. Diese wären Antidepressiva, Antiepileptika und Opioide. Als *first-line* Therapie gilt allgemein die Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva, selektiven Serotonin- und Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SSNRI) sowie den Antikonvulsiva Pregabalin und Gabapentin. Als Zweitlinientherapie können sich 5 %ige Lidocain-Pflaster, Capsaicin-Pflaster hoher Konzentration und Tramadol eignen (Sopacua et al., 2019). Die topischen Therapien sind dabei v.a. bei fokalen Schmerzen, beispielsweise an den Fußsohlen, hilfreich (Themistocleous et al., 2014). Als *third-line* Therapie kann die Nutzung von stark wirksamen Opioiden und Botulinum-Toxin A erwogen werden. Die Anwendung von topischen Therapien und Botulinum-Toxin A wird allerdings ausschließlich für die Behandlung periphere Neuropathien empfohlen (Sopacua et al., 2019).

Aktuell ist die Schmerztherapie oft frustrierend oder nicht ausreichend, so zeigt sich nur bei der Hälfte der Patienten eine Reduktion der Schmerzen um ca. 50 % (Sopacua et al., 2019). Oft kann trotz medikamentöser Therapie also keine Schmerzfreiheit bewirkt werden (Schlereth T. et al., 2019). Die Medikamenteneinnahme muss ferner oftmals wegen Nebenwirkungen unterbrochen werden (Sopacua et al., 2019). Daher ist es wichtig die Therapieoptionen und -Ziele mit dem Patienten realistisch zu besprechen und über die Wichtigkeit der *Compliance* aufzuklären, um Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten (Schlereth T. et al., 2019). Generell hat sich gezeigt, dass physikalische Therapien und Rehabilitation sowie allgemein körperliches Training, vor allem bei Patienten mit einem Metabolischen Syndrom, einen positiven Effekt haben (Sopacua, Hoeijmakers et al. 2019).

Schmerz ist komplex, daher gibt es nicht nur die physikalischen Faktoren, die bedacht werden müssen, sondern auch psychologische, neurophysiologische und soziokulturelle Aspekte, die die Schmerzwahrnehmung und den Umgang der Patienten mit diesem beeinflussen. Daher ist bei der Behandlung von Neuropathien ein multidisziplinärer Ansatz wichtig, um die Therapie optimal auf die individuellen Patienten zuzuschneiden (Sopacua et al., 2019). Die Patienten müssen i.d.R. über einen langen Zeitraum betreut werden und sollten, wenn möglich, an eine Schmerzklinik angebunden werden (Themistocleous et al., 2014).

2.6 Zellfreie DNA als epigenetischer Biomarker

DNA liegt hauptsächlich im Zellkern vor. Durch verschiedene Mechanismen wie Apoptose, Nekrose und Sekretion können DNA und andere Nukleinsäuren jedoch auch in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut gelangen und werden dann als sogenannte zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA) bzw. zirkulierende zellfreie Nukleinsäuren (ccfNAs) bezeichnet. Diese im Blut zu findenden ccfNAs sind eine Mischung aus einzel- und doppelsträngigen Nukleinsäuren, wie DNA, RNA, *microRNA*, *long non-coding RNA*, fetale DNA/ RNA und mitochondriale RNA/ DNA (Rahat et al., 2020). Erstmals beschrieben wurde die cfDNA in Immunkomplexen bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses im Jahr 1948, die Analyse von cfDNA im Zusammenhang mit Krebspatienten hingegen fand erst ca. 30 Jahre später statt (Kustanovich et al., 2019).

Bei gesunden Individuen stammt diese cfDNA vor allem aus dem hämatopoetischen System, dabei stammen ca. 50 % von Leukozyten und 30 % von Erythrozyten-Vorläuferzellen (Rahat et al., 2020, Kustanovich et al., 2019). Der Anteil der cfDNA, der von festem Gewebe stammt, ist hingegen deutlich geringer, so macht der Anteil von Zellen des Gefäßendothels ca. 10 % aus, der von Neuronen ca. 2 % und der von Hepatozyten ca. 1 % (Kustanovich et al., 2019). Man hat festgestellt, dass bei schwangeren oder transplantierten Patienten, oder Patienten mit Erkrankungen wie Krebs, Autoimmunerkrankungen und neuronalen Erkrän-

kungen, weitere DNA aus dem Gewebe ins Blut gelangt. Somit sind hier größere Gesamtmengen an cfDNA im Blut zu finden als bei gesunden Individuen (Gai and Sun, 2019). Die Mechanismen, durch welche dies geschieht, sind die Apoptose, also der „programmierten“ Zelltod und die Nekrose, als pathologisches Absterben von Zellen durch schädliche Einflüsse. Aber es werden auch andere Möglichkeiten, wie Onkose, Pyroptose, Phagozytose, Freisetzung von *neutrophil extracellular traps* (NETosis) sowie die aktive Sekretion diskutiert (Kustanovich et al., 2019).

Anders als bei den verschiedenen Arten des Zelltodes, kommt die aktive Sekretion auch bei lebenden Zellen vor und ist beispielsweise bei aktivierten Neutrophilen, bei Lymphozyten und Monozyten zu finden (Kustanovich et al., 2019). Wie von Gai and Sun (2019) beschrieben, wird bei Krebserkrankungen außerdem die Möglichkeit der Entstehung der cfDNA durch Zerstörung von Zellen durch hypoxische Bedingungen im Tumormikromilieu vermutet sowie durch Zellen, die in die antitumoröse Reaktion des Körpers involviert sind. Die Menge der cfDNA kann dabei variieren, so haben Patienten mit benignen Läsionen oder Patienten, die sich in einem frühen Krebsstadium befinden, geringere Mengen von cfDNA in ihrem Blut als Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren einer vergleichbaren Größe. Das Level der vorzufinden cfDNA ist somit vermutlich abhängig von dem Stadium der Krebserkrankung, aber kann wohlmöglich auch dessen Interaktion mit dem Mikromilieu reflektieren sowie dessen Metabolismus, da es mit der Tumorlast zusammenhängt (Gai and Sun, 2019).

Laut Kustanovich et al. (2019), ist der Großteil der cfDNA, der aus dem Zellkern stammt, in Form von Mono- oder Oligonukleosomen verpackt und kann sowohl an der Oberfläche als auch im Lumen der Vesikel, in welchen sie verpackt sind, lokalisiert sein. Die durch Gelelektrophorese ermittelte Größe dieser cfDNA-Fragmente variiert zwischen ca. 40 bis 200 bp, mit einem Peak bei ungefähr 166 bp, was der Größe der Mono- bzw. Oligonukleosomen entspricht. Allerdings können die individuellen cfDNAs z.T. auch deutlich größer ausfallen, längere DNA-Fragmente werden dabei vor allem als Resultat von nekrotischem Zelltod erachtet. Kürzere DNA-Fragmente, mit einer Größe von unter 100 bp hingegen sind häufig bei zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA), mtDNA und bakterieller DNA zu finden (Kustanovich et al., 2019). Dadurch, dass die cfDNA im Allgemeinen mit Nukleosomen assoziiert ist, ist es außerdem möglich, die posttranslationalen Modifikationen von Histonen an den Aminosäuren ihrer N- und C-terminalen Reste als epigenetischen Marker zu untersuchen, der spezifisch krankheitsassoziierte cfDNA im Plasma unterscheiden kann. Denn verschiedene Arten der Histonmodifikationen sind mit dem Verlauf und der Pathogenese von menschlichen Erkrankungen assoziiert (Rahat et al., 2020).

Wie von Kustanovich et al. (2019) beschrieben, entspricht die Menge der vorzufindenden extrazellulären DNA der Balance zwischen ihrer Freisetzung und ihres *Clearance*-Prozesses, welcher sowohl im Ursprungsgewebe als auch in Körperflüssigkeiten, der Leber, der Niere,

der Milz und den Lymphknoten stattfindet. In gesunden Individuen findet sich i.d.R. eine geringe Menge an cfDNA, da diese und auch die apoptotischen Zellen schnell beseitigt werden. Patienten die ein Malignom, eine chronisch entzündliche Erkrankung oder eine Erkrankung haben, die mit massivem Zelltod einhergeht, weisen hingegen eine insuffiziente *Clearance* auf, sodass es zur Akkumulation von cfDNA kommt (Kustanovich et al., 2019). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht genau bekannt. Es wird vermutet, dass es sich um eine Überlastung des Clearance Systems durch den massiven Zelltod handeln könnte (Gai and Sun, 2019). Die Leber ist das Hauptorgan für die Clearance von Nukleosomen. Sie beseitigt ca. 71-84,7 % der Nukleosomen innerhalb von 10 Minuten aus dem zirkulierenden Blut. Die dort und auch in der Milz für die Beseitigung der Nukleosomen zuständigen Zellen sind die Kupffer-Zellen, welche zu den Makrophagen gehören. Die Niere hat wahrscheinlich eine Art selektive cfDNA-Clearance, da sich gezeigt hat, dass kurze Fragmente mit einer Größe von 160-200 bp auch nach 24 h noch in der Niere zu finden sind, wohingegen längere Fragmente einer Größe von ca. 2-6 kb nicht mehr nachweisbar sind (Kustanovich et al., 2019).

Die geschätzte Halbwertszeit von cfDNA in zirkulierendem Blut variiert zwischen wenigen Minuten bis hin zu 2 Stunden. Sie ist dabei von verschiedenen Faktoren, wie ihrer Assoziation mit molekularen Komplexen, welche die schnelle Degradierung der cfDNA verhindern, oder dem Tumortyp und -stage, der Behandlungsmodalität und diversen anderen, abhängig. Im Blut findet die Degradierung der cfDNA vor allem durch zirkulierende Enzyme, wie z.B. die DNase I, Faktor H und Plasma-Faktor-VII-aktivierende Protease (FSAP), statt (Kustanovich et al., 2019).

Mittels der Methode der *Liquid Biopsy* ist es möglich, in dieser cfDNA durch Detektion von Biomarkern nach Erkrankungen zu screenen, sie zu diagnostizieren, Aussagen über die Prognose zu treffen sowie die Behandlung spezifisch an den betroffenen Patienten anzupassen. Für dieses Feld der Diagnostik wurden sowohl genetische, als auch epigenetische Biomarker untersucht (Rahat et al., 2020). Dabei zeigte sich, wie von Gai and Sun (2019) ausgeführt, dass die genetischen Biomarker weniger konstant waren und eine größere Variabilität über verschiedene Studien hinweg aufwiesen, was das Finden von sensitiven und generalisierbaren diagnostischen Markern schwierig macht. Daher werden die epigenetischen Biomarker diesen gegenüber bevorzugt genutzt. Die DNA-Methylierung ist dabei eine der am weitesten erforschten epigenetischen Modifikationen, die sich als Biomarker eignet (Gai and Sun, 2019). Ein perfekter epigenetischer Biomarker sollte dabei in der Lage sein, die Erkrankung mit einer hohen Sensitivität zu detektieren, das Risiko der Krankheitsentwicklung und -progression vorherzusagen sowie die therapeutische Wirkung und Antwort des Patienten zu monitoren (Rahat et al., 2020). Die Nutzung von DNA-Methylierung als epigenetische Biomarker wurde, wie von Gai and Sun (2019) beschrieben, vor ca. 2 Jahrzehnten in der Diag-

nostik von Krebserkrankungen und im Rahmen der pränatalen Diagnostik etabliert. Dabei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen cfDNA und genomischer DNA des Ursprungsgewebes in beiden Modellen. Außerdem ist das Muster der DNA-Methylierung hochgradig gewebsspezifisch, sowie beständig in den entsprechenden Geweben von verschiedenen Individuen. Daher kann es möglich sein, durch Analyse der DNA-Methylierungsmuster das Ursprungsgewebe der cfDNA zu bestimmen, was eine Messung der cfDNA des zu untersuchenden Gewebes sowie die Möglichkeit des Monitorings des Krankheitsverlaufs erlaubt. Diese Übereinstimmung im Bereich der epigenetischen Veränderungen ist bei Krebserkrankungen sogar noch höher, denn zwei Tumoren desselben Typs haben meist nur wenige somatische Mutationen gemeinsam, aber sehr ähnliche epigenetische Profile, da sie vom selben Gewebe abstammen. Diese Informationen führten kürzlich zur Entstehung eines genomweiten Plasma-DNA *tissue mapping*. Hier wurde durch das Vergleichen des Methyloms der cfDNA aus dem Plasma mit Referenz-Methylomen aus verschiedenen Geweben, mittels einer genomweiten Bisulfitsequenzierung der Plasma-cfDNA, der fraktionelle Anteil von jedem Gewebe an dem cfDNA-Pool des Plasmas ermittelt. Ein anderer Ansatz konzentriert sich auf hochgradig gewebsspezifische Methylierungs-Biomarker, um das Ursprungsgewebe der cfDNA aus dem Plasma zu ermitteln. Hier werden immer nur wenige Marker gleichzeitig untersucht, statt eines genomweiten Ansatzes, was Ähnlichkeiten zu der Pränataldiagnostik aufweist. Der genomweite Ansatz ist effizienter, da in einem Experiment die Anteile vieler verschiedener Gewebe untersucht werden können, wohingegen der zielgerichtete Ansatz kostengünstiger ist und eine breitere klinische Sichtweise haben könnte (Gai and Sun, 2019).

Neben der DNA-Methylierung hat auch die Untersuchung von sogenannten cfDNA *fragmentation patterns* ein großes Potenzial als Mittel der Diagnostik im Rahmen einer *Liquid Biopsy*. Die cfDNA-Moleküle werden nicht willkürlich fragmentiert, sondern die Endonukleasen, welche die DNA fragmentieren, zeigen Präferenzen bezüglich ihrer Schnittstellen, wie internukleosomale DNA, welche nicht an Histone gebunden ist. So wird versucht, durch Analyse des Profils der Nukleosomen-Positionen der cfDNA, welches stark mit der Zellidentität korreliert, das Ursprungsgewebe der cfDNA zu ermitteln (Gai and Sun, 2019).

Die cfDNA ist zwar primär eine Art Abfallprodukt, das bei Zelltod entsteht, aber, wie von Kustanovich et al. (2019) beschrieben, können Moleküle, die durch Zelltod oder Zellschädigung freigesetzt werden auch als *damage associated molecular patterns* (DAMPs) fungieren, welche immunmodulatorische Effekte vermitteln. So können durch die aktive Sekretion von DNA, wie bspw. im Rahmen der NETosis, proinflammatorische Effekte vermittelt werden. Diese sezernierte DNA wird im Blut in extrazelluläre Vesikel verpackt transportiert und von Leukozyten per Endozytose aufgenommen. Extrazelluläre Histone, Nukleosomen und nackte cfDNA unterscheiden sich dabei hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und proinflammatorischen Wirkung. So lösen Histone proinflammatorische Signale über Toll-like Rezeptoren (TLR 2/4)

aus, was in der Produktion von TNF- α , IL-6, IL-10 und MPO (Myeloperoxidase) resultiert, oder zeigen eine Zytotoxizität unabhängig von Toll-like-Rezeptoren, indem sie über ein Netzwerk extrazellulärer Fasern von Neutrophilen (NET) eine Freisetzung weiterer Histone bewirken. Histone wirken zytotoxisch auf das Endothel und können somit makro- und mikrovaskuläre Thrombosen und eine renale Dysfunktion hervorrufen. Im Gegensatz dazu stimulieren Nukleosomen unterschiedliche inflammatorische Signalwege, ohne den zytotoxischen Effekt der Histone. Mitochondriale DNA, welche der bakteriellen DNA sehr ähnlich ist, wird ebenfalls vom Immunsystem als DAMP wahrgenommen. Anders als die bakterielle DNA bewirkt sie aber keine Induktion der IL-6 Produktion. Die prokoagulatorische Wirkung und Stimulierung der Blutplättchen hingegen ist dieser sehr ähnlich. Auch extrazelluläre mitochondriale DNA aktiviert die Leukozyten über Toll-like-Rezeptoren (TLR 9), was die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen induziert. Anhand dieser Beispiele ist ersichtlich, dass cfDNA einen Anteil an der Veränderung des Tumormikromilieus hat (Kustanovich et al., 2019).

Die aktive Sekretion von DNA wird vom Körper aber auch dazu genutzt, geschädigte DNA, welche schädlich für die Zelle wäre, via Exosomen freizusetzen und so die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten und aberrante Immunantworten zu verhindern (Kustanovich et al., 2019).

Des Weiteren besteht die Hypothese, dass cfDNA in der Lage sein könnte, sich in das Genom gesunder Zellen zu integrieren, als eine Art der Genommetastasierung (Kustanovich et al., 2019).

Nach Rahat et al. (2019), hat sich jedoch nicht nur bei Tumoren, sondern auch bei Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen oder auch neurologischen Erkrankungen gezeigt, dass es Veränderungen in der DNA-Methylierung in cfDNA gibt, wenn auch in geringerer Menge. So zeigte sich eine abnorme DNA-Demethylierung in mononukleären Zellen des peripheren Blutes sowie CD4⁺ Zellen bei Lupus Patienten. Man identifizierte Hypomethylierungen in Promotorregionen eines bestimmten Gens als Biomarker für die Diagnose von Systemischem Lupus erythematodes sowie das Sjögren Syndrom. Es gibt außerdem bereits cfDNA assoziierte Biomarker für die Detektion von neurodegenerativen Erkrankungen und traumatische Hirnschädigungen, bei denen die Blut-Hirn-Schranke verletzt wird und so cfDNA aus den geschädigten Gehirnzellen über den Liquor und die geschädigte Blut-Hirn-Schranke ins periphere Blut gelangt und dort nachgewiesen werden kann (Rahat et al., 2020).

Die meisten Studien, die sich mit der Analyse von epigenetischen Biomarkern in cfDNA befassen, nutzen die Methode der Bisulfitsequenzierung, dabei kommt es jedoch bekannterweise auch zur Degradierung von DNA, was dazu führt, dass die Menge der für die Analyse

nutzbaren DNA geringer ausfällt. Ein weiterer Punkt ist, dass das Profil der DNA-Methylierung auch mit dem Geschlecht und der Ethnie zusammenhängt und somit individuelle Unterschiede aufweist (Gai and Sun, 2019). Kritisch betrachtet ist diese Methode also nicht perfekt, dennoch ist sie aktuell der Goldstandard zur Bestimmung von Mustern der DNA-Methylierung und findet auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung.

2.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Eignung der Analyse der Methylierungsmuster der Promotorregionen von C-Faser-spezifischen Genen in zellfreier DNA als epigenetische Biomarker in der Diagnostik der Small Fiber Neuropathie untersucht werden. Bei diesen C-Faser-spezifischen Genen handelt es sich um die Gene SCN9A (*Sodium channel protein type 9 subunit alpha*), SCN10A (*Sodium channel protein type 10 subunit alpha*) und SCN11A (*Sodium channel protein type 11 subunit alpha*), welche für Untereinheiten von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen codieren, die spezifisch in Nervenfasern (C-Fasern) exprimiert werden. Die zellfreie DNA für die Untersuchungen sollte dabei aus Blutplasma-Proben isoliert werden, welche von der Forschungsgruppe um Prof. Dr. med. Frank Birklein, welche sich mit neurologischen Schmerzerkrankungen beschäftigt, bereitgestellt werden sollten. Es sollten die Methylierungsmuster dieser Promotorregionen zwischen gesunden Individuen als Kontrollgruppe und an SFN erkrankten Patienten verglichen werden. Bei der Auswahl der zu untersuchenden Abschnitte dieser Gene sollten deren Promotorregionen hierfür mittels der Genomdatenbank ensembl, des UCSC *Genome Browser on Human* GRCh38/hg38 und GRCh37/hg19 ausfindig gemacht und auf CpG-Stellen untersucht werden, um so für die Untersuchung geeignete Abschnitte auszuwählen. Es sollte sich dabei um Sequenzen von einer Länge zwischen 50 und 200 bp handeln, da zellfreie DNA i.d.R. eine Größe von 40-200 bp mit einem Peak bei 166 bp hat (Kustanovich et al., 2019). Diese zellfreie DNA sollte zuerst aus den Plasma-Proben isoliert und anschließend einer Bislufitkonversion unterzogen werden. Daraufhin sollte mittels PCR, Gelelektrophorese, Klonierung und schließlich Sanger Sequenzierung die Analyse der Sequenzen sowie ihres Methylierungsmusters erfolgen. Da die untersuchten Gene spezifisch in C-Fasern exprimiert werden, wird die Hypothese aufgestellt, dass sich die Promotorregion dieser Gene in Gewebe anderen Ursprungs methyliert und somit transkriptiv stillgelegt vorfinden, in den C-Fasern selbst jedoch unmethyliert und aktiv sind. Laut der aufgestellten Hypothese sollte der cfDNA-Anteil von C-Fasern im Blut der an SFN erkrankten Patienten höher sein als bei den gesunden Kontrollpersonen, da bei diesen vermehrt C-Fasern untergehen. Somit wäre mit einer im Verhältnis zu der cfDNA der gesunden Kontrollpersonen geringeren Methylierung der untersuchten Promotorregionen bei den an SFN erkrankten Patienten zu rechnen.

Zusätzlich sollte anhand von aus Hautstanzbiopsien isolierter DNA der Methylierungsstatus der entsprechenden Methylierungsstellen in diesen zu untersuchenden Abschnitten der Promotorregionen mit den Ergebnissen aus den Plasma-Proben verglichen werden. Die Biopsie-Proben sollten hierbei als weitere Kontrolle dienen und die Methylierungsverhältnisse der epidermalen und dermalen Zellen der Hautstanze darstellen. Die Proben der Hautstanzbiopsien sollten ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Frank Birklein bereitgestellt werden.

Ziel sollte es sein, die ersten Schritte hin zur Entwicklung eines epigenetischen Biomarkers zu machen, um eine Alternative zu dem bisherigen Goldstandard der Hautstanzbiopsie mittels einer durch eine einfache Blutentnahme durchzuführenden Diagnostikform zu ermöglichen. Denn die Hautstanzbiopsie ist nicht bei allen Patienten anwendbar und kann für die Patienten z.T. mit Schmerzen und Komplikationen verbunden sein (Alguire and Mathes 1998, Sopacua, Hoeijmakers et al. 2019).

3.1 Übersicht über die untersuchten Proben

Kontroll-Proben:

Die Probe K1 stammte von einer schwangeren Frau zwischen 20-40 Jahren. Vorerkrankungen oder Medikationen bestanden keine. Weitere Informationen zu dieser Probe liegen nicht vor.

Die Probe K2 stammte von einem Mann, Jahrgang 1998, der zum Zeitpunkt der Probenentnahme, im März 2019, 21 Jahre alt war. Bei diesem waren keine Vorerkrankungen oder Medikationen bekannt, jedoch eine Allergie gegen Amoxicillin. Familiär waren ebenfalls keine Vorerkrankungen vorbekannt. Es bestand weder Nikotin- noch Alkohol- oder Substanzabusus. Der Proband war deutscher Abstammung.

Die Probe K3 stammte von einer Frau, Jahrgang 1989, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme, im März 2019, 30 Jahre alt war. Bei ihr waren keine Vorerkrankungen oder Medikation bekannt. Es bestand weder Alkohol- oder Substanzabusus. Die Probandin war griechisch-deutscher Abstammung.

Bei den Kontroll-Proben wurde weder eine QST noch eine IENFD-Bestimmung durchgeführt, da keine Neuropathie vorlag. Es wurde daher von normwertigen Ergebnissen ausgegangen.

Patienten-Proben:

Die Plasma-Probe P1 stammte von einem Mann, Jahrgang 1961. Bekannte Vorerkrankungen waren eine Arterielle Hypertonie sowie ein Prostata-CA, welches operativ therapiert worden war. Klinisch imponierten Kribbel-Parästhesien an beiden Füßen, zu dem Zeitpunkt seit 3 Jahren (2016) bestehend, später auch mit einer Beteiligung der Arme sowie brennende Schmerzen in den betroffenen Bereichen. Eine Dysautonomie bestand jedoch nicht. Die IENFD betrug $3/\text{mm}^2$ (Normwert: $13 \pm 5/\text{mm}^2$). Eine QST wurde nicht durchgeführt, in der klinischen Untersuchung zeigte sich das Temperaturempfinden jedoch unauffällig. Die Neuropathie wurde mit Pregabalin 150 mg 1-0-1 therapiert. Es wurde von einer idiopathischen SFN ausgegangen, eine Tumorassoziation konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die Plasma-Probe P2 stammte von einem Mann, 1971 geboren. Vorerkrankungen waren keine bekannt. Klinisch zeigte der Patient Taubheitsgefühle sowie brennende Schmerzen an Unterschenkeln und Füßen beidseits. Eine Dysautonomie bestand nicht. Die IENFD betrug $4/\text{mm}^2$ (Normwert: $13 \pm 5/\text{mm}^2$), bei der QST zeigte sich eine erhöhte Schwelle bei der Wahr-

nehmung von Wärme. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte auf Patientenwunsch keine Therapie der Neuropathie. Auch hier wurde von einer idiopathischen SFN ausgegangen.

Die Biopsie-Probe P1 stammte von einer Frau, Jahrgang 1991. Bekannte Vorerkrankungen waren Diabetes Mellitus Typ 1, mit Insulin therapiert (Toujeo) sowie der Verdacht auf eine Hashimoto Thyreoiditis bzw. es lagen leicht erhöhte Antikörper vor, es bestand aber keine manifeste Hypothyreose. Eine medikamentöse Therapie mit L-Thyroxin erfolgte demnach nicht. Bei der Patientin ergab sich eine IENFD von 17/ mm² (Normwert: 13±5/mm²) trotz Symptomen einer Neuropathie, daher waren bei ihr die Diagnosekriterien einer SFN formal nicht erfüllt. Die Klinik passte jedoch zu einer SFN. Die bestehende Symptomatik waren Missempfindungen an beiden Beinen mit Fluktuationen; dauerhaft brennenden Dysästhesien an Händen und Füßen v.a. bei einem Blutzucker von >250 mg/dl, mit starken Schmerzen aber ohne Dysautonomie. Die Patientin zeigte normale Werte bezüglich der QST bei ebenfalls unauffälligen Ergebnissen der autonomen Tests. Die Neuropathie wurde mit Duloxetin 60 mg/d therapiert.

Die Zuordnung der Plasma-Proben zu den Biopsie-Proben lautet wie folgt: P1 der Plasma-Proben entsprach dem gleichen Patienten wie P2 der Biopsie-Proben, die Plasma-Probe P2 entsprach dem Patienten der Biopsie-Probe P3. Bei dem Patienten der Biopsie-Probe P1 wurde keine Analyse der Plasma-Probe durchgeführt, da hier die Diagnose der Small Fiber Neuropathie formal nicht gestellt werden konnte, da keine reduzierte IENFD vorlag.

3.2 Isolation von zellfreier DNA aus Plasma

Es wurde mit Blutproben sowohl der Patienten als auch der Kontrollgruppe gearbeitet, welches zentrifugiert und wovon der Überstand bei -80°C weggefroren wurde. Aus diesen so erstellten Plasma-Proben wurde nun mittels des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit nach dem von QIAGEN angegebenen Protokoll die zellfreie DNA isoliert.

Diese Methode gliedert sich in vier Schritte: das Lysieren der Probe, die Adsorption auf die Mini-Membran, das Waschen und die Elution. Das Lysieren der Probe ist nötig, da die frei zirkulierenden Nukleinsäuren im Plasma meist an Proteine gebunden oder in Vesikel gehüllt sind, sodass sie erst von diesen gelöst werden müssen, damit sie an die Mini-Säulen binden können. Dazu erfolgt eine Denaturierung durch erhöhte Temperatur und mittels der Proteinase K. Die Adsorption der Nukleinsäuren aus einem größeren Volumen auf die Mini-Membran erfolgt unter Vakuum-Druck, welcher von einer Vakuum-Pumpe erzeugt wird. Proteine und andere Kontaminationen, welche die PCR stören oder zu enzymatischen Reaktionen führen könnten, können nicht an die Membran binden und werden im anschließenden Waschschrift in drei Durchgängen effizient entfernt. Zum Schluss wird die CNA im Rahmen

der Elution in AVE-Puffer gelöst und kann anschließend für die Bisulfitkonversion genutzt werden.

Zuerst wurden die Reagenzien präpariert. Um 500 ml ACB-Puffer zu erhalten, wurden 200 ml Isopropanol (100 %) zu 300 ml konzentriertem ACB-Puffer hinzugegeben. Um 44 ml des ACW1-Puffers zu erhalten, wurden 25 ml Ethanol (96-100 %) zu 19 ml ACW1-Puffer pipettiert. Die 43 ml ACW2-Puffer wurden durch eine Mischung von 30 ml Ethanol (96-100 %) mit 13 ml ACW2 erstellt. Um die *carrier* RNA zu präparieren, wurden 1550 µl AVE-Puffer zu 310 µg *carrier* RNA gegeben. Die Nutzung von *carrier* RNA hat zwei Gründe, einmal verbessert sie die Bindung der Nukleinsäuren aus den Proben an die QIAamp Mini-Membran und zweitens reduziert sie das Risiko für eine RNA-Degradierung, falls RNase-Moleküle den Denaturierungsprozess überstehen. Anhand der Angaben des Kits wurde nun die entsprechende Menge *carrier*-RNA-AVE-Puffer-Lösung zu der jeweiligen Menge ACL-Puffer gegeben. Im Falle der Kontrollgruppe handelte es sich um drei Proben, weshalb 5,3 ml ACL-Puffer zu 16,9 µl *carrier*-RNA-AVE-Puffer-Lösung gegeben wurden. Bei den Patienten handelte es sich um zwei Proben, weshalb 3,5 ml ACB-Puffer zu 11,3 µl *carrier*-RNA-AVE-Puffer-Lösung pipettiert wurden.

Bevor mit der eigentlichen Isolation der CNA gestartet wurde, mussten sowohl die Proben als auch die Puffer an Raumtemperatur gewöhnt und das Wasserbad auf 60 °C sowie der Heizblock auf 56 °C erhitzt werden. Waren die Proben weniger als 1/ 2/ 3 ml groß, wurde auf die volle Zahl mit der entsprechenden Menge Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung aufgefüllt. Im Falle der Kontrollgruppe wurden bei K1 1,6 ml Probe mit 400 µl DPBS auf 2 ml aufgefüllt bei K2 wurde 1 ml Probe verwendet und bei K3 1,8 ml Probe mit 200 µl Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (DPBS) auf 2 ml aufgefüllt. Im Falle der Patientengruppe wurde bei der Probe P1 von 1,44 ml mittels 560 µl DPBS und bei der Probe P2 1,45 ml mit 550 µl DPBS auf jeweils 2 ml aufgefüllt.

Für die Isolation der zellfreien DNA aus dem Plasma wurden je 200 µl Proteinase K (bzw. 100 µl bei K2) in einen 50 ml Falcon gegeben und jeweils 2 ml (bzw. 1 ml bei K2) der Probe hinzugefügt. Nach Hinzugabe von 1,6 ml (bzw. 0,8 ml bei K2) ACL-Puffer (mit enthaltener *carrier* RNA) wurde das Ganze für 30 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Proben direkt in einem Wasserbad für 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 3,6 ml (bzw. 1,8 ml bei K2) ACB- Puffer zu dem Lysat gegeben und das Ganze wieder für 30 s gevortext. Danach inkubierte die Mischung für 5 min auf Eis. Nun wurde die Mini-Säule in den Vac-Connector auf den QIAvac 24 Plus, eine Vakuum-Pumpe gesetzt und ein 20 ml *tube extender* in die offene Säule gesteckt. Dann wurde die Lysat-ACB-Puffer-Mischung in den *tube extender* gefüllt und die Vakuum-Pumpe gestartet. Nachdem die Mischung komplett durch die Säule gezogen worden war, wurde die Pumpe abgestellt, der Druck auf 0 mbar abgelassen und der *tube extender* vorsichtig entfernt. Als Nächstes wurden 600 µl

ACW1-Puffer in die Mini-Säule gegeben, die Vakuum-Pumpe erneut gestartet. War dieser komplett durch die Säule gezogen, wurden 750 µl ACW2-Puffer in die Säule gefüllt und ebenfalls vollständig durch die Säule ziehen gelassen. Genauso wurde mit 750 µl Ethanol (100 %) verfahren. Die Vakuum-Pumpe wurde abgestellt, die Säule entfernt und der *Vac-Connector* verworfen. Die Säule wurde anschließend in einem sauberen 2 ml Sammelröhrchen platziert und für 3 min bei voller Stärke (20000 x g; 14000 rpm) zentrifugiert. Nun inkubierte das *Assembly* bei 56 °C für 10 min, um die Membran komplett zu trocknen. Das Sammelröhrchen wurde verworfen und die Säule in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Danach wurde vorsichtig 50 µl AVE-Puffer auf die Membran der Säule gegeben. Das Ganze inkubierte anschließend bei Raumtemperatur für 3 min und wurde dann in einer Microzentrifuge bei voller Geschwindigkeit (20000 x g; 14000 rpm) für 1 min zentrifugiert, um die Nukleinsäuren zu lösen. Das Endvolumen betrug ca. 50 µl und konnte nach Messung der Konzentration für die Bisulfit-Behandlung verwendet werden.

3.3 Messung der DNA-Konzentration mittels *NanoDrop*

Mittels des *Nanodrop* wurde die Konzentration der DNA in den zuvor isolierten Proben gemessen. Als Leerwert fungierte je 1 µl des AVE-Puffers aus dem QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN). Für die Messung wurde je 1 µl der entsprechenden cfDNA-genutzt. Für jede Probe erfolgten zwei Messungen.

Tabelle 5: Übersicht über die mittels *NanoDrop* gemessenen DNA-Konzentrationen in den Blutplasma-Proben der Kontrollen

Probe	ng/ µl	A260/ A280	A260/ A230
K1	17,95	2,7	0,32
K1	17,2	2,85	0,35
K2	18,9	2,12	0,74
K2	19,8	2,13	0,75
K3	7,7	1,16	0,14
K3	12,3	-1.28	0,21

Tabelle 6: Übersicht über die mittels *NanoDrop* gemessenen DNA-Konzentrationen in den Blutplasma-Proben der Patienten

Probe	ng/ μ l	A260/ A280	A260/ A230
P1	22,6	3,15	0,65
P1	22,4	3,41	0,65
P2	17,6	2,75	0,42
P2	17,8	3,01	0,47

Durch die Bestimmung dieser Werte konnte die Menge an cfDNA errechnet werden, die bei der Bisulfit-Konversion verwendet wurde.

Es wurden je 20 μ l der Proben für die Bisulfit-Konversion verwendet.

3.4 Bisulfit-Konversion der DNA

Durch die Bisulfit-Behandlung der zellfreien DNA kann später, nach PCR-Amplifikation, Klonierung und der Sequenzierung das Methylierungsprofil der DNA bestimmt werden. Methyliert werden die Cytosine von CpG-Positionen, da nur so die Vererbung dieser genetischen Information an die Tochterzelle gesichert ist. Wird methylierte DNA einer Bisulfit-Konversion unterzogen, werden alle unmethylierten Cytosine in Uracil desaminiert. Methylierte Cytosine hingegen bleiben von der Konversion unverändert.

Im ersten Schritt der Bisulfitsequenzierung wird die cfDNA mit Natriumbisulfit inkubiert, so dass eine Sulfonierung des C6-Atoms des Cytosins geschieht, wodurch Cytosin-Sulfonat entsteht (Walter, 2018). Dieser Schritt läuft in einem leicht sauren Milieu ab (Walter, 2018). Es folgt nun eine hydrolytische Desaminierung am C4-Atom des Cytosin-Sulfonats, wodurch Uracil-Sulfonat entsteht (Walter, 2018). Dieses wird anschließend in einem alkalischen Milieu durch Umpufferung und Abspaltung der SO_3 -Gruppe zu Uracil desulfoniert (Walter, 2018).

Dafür wurde das EZ DNA Methylation-Direct Kit verwendet, vorgegangen wurde nach dem entsprechenden Protokoll von Zymo Research.

Proben mit aufgereinigter DNA enthalten i.d.R. ca. 50 pg bis 2 μ g DNA, für optimale Ergebnisse sollte für die Bisulfit-Konversion nach Zymo die genutzte DNA-Menge ca. 200-500 ng betragen. Daher wurde zuvor die Konzentration der Proben mittels des *NanoDrop* bestimmt.

Zuerst wurden die Reagenzien präpariert. Dazu wurden 260 μ l des Proteinase-K-Storage-Puffers zur Proteinase K hinzugegeben und gemischt, bis sie sich ganz gelöst hatte.

Zur Erstellung des CT-*Conversion*-Reagenz wurden 760 µl des M-*Solubilization*-Puffers und 300 µl des M-*Dilution*-Puffers in das Röhrchen mit dem CT-*Conversion*-Reagenz hinzugegeben. Das Ganze wurde bei Raumtemperatur 10 min lang gevortext, anschließend wurde 160 µl des M-*Reaction*-Puffers hinzu pipettiert. und erneut 1 Minute lang gemischt.

Zur Erstellung des M-*Wash*-Puffers wurden 24 ml Ethanol (100 %) zu den 6 ml M-*Wash*-Puffer-Konzentrat hinzugegeben.

Für die Bisulfit-Konversion wurden zuerst 20 µl der Probe und 130 µl der CT-*Conversion*-Reagenz-Lösung in ein PCR-Gefäß gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Danach durchlief es im *Thermocycler* folgende Schritte:

Tabelle 7: Programm des *Thermocyclers* für die Bisulfitkonversion

1. Schritt	98 °C	8 min
2. Schritt	64 °C	3,5 h
3. Schritt	4 °C	Lagerung (max. 20 h)

Als Nächstes wurden 600 µl des M-*Binding*-Puffers in eine Zymo-*Spin*-IC-Säule gegeben, welche in einem *collection tube* platziert wurde. Danach wurde die Probe in die Säule gefüllt, die Kappe verschlossen und alles durch mehrfaches *Invertieren* gemischt. Nun erfolgte die Zentrifugation des *collection tubes* mit enthaltener Säule bei voller Geschwindigkeit (> 10000 x g) für 30 s. Die so gesammelte Flüssigkeit wurde verworfen. Dann wurden 100 µl des M-*Wash*-Puffers zur Säule hinzugefügt und ebenfalls bei voller Geschwindigkeit für 30 s zentrifugiert. Als Nächstes wurden 200 µl des M-*Desulphonation*-Puffers zu der Säule gegeben, bei Raumtemperatur für 15-20 min inkubieren gelassen und anschließend wieder für 30 s bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurden erneut 200 µl M-*Wash*-Puffer hinzugegeben und für 30 s zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nun wurde die Säule in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und 10 µl M-*Elution*-Puffer wurden direkt auf die Säulenmatrix gegeben. Nach der anschließenden 30 s Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit zur Lösung der DNA, wurde die Säule verworfen. Das Endvolumen betrug ca. 10 µl. Die DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

3.5 PCR (Polymerase Ketten Reaktion)

Die PCR (Polymerase Ketten Reaktion) ist eine Methode zur in *vitro* Amplifikation von genau definierten DNA-Abschnitten oder -Fragmenten. Zu ihrer Durchführung benötigt man zwei zu

dem *Template* passende Oligonukleotid-*Primer* (*Forward* und *Reverse*) als Startpunkt der DNA-Synthese, Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine für den neusynthetisierten DNA-Strang, einen Puffer für optimale Reaktionsbedingungen, H₂O, eine hitzestabile Taq-DNA-Polymerase sowie das entsprechende zu amplifizierende DNA-Fragment, *Template* genannt. Aus diesen wird ein Reaktionsansatz erstellt. Die PCR besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: der Denaturierung bei 95 °C, dem *Annealing*, und der Elongation und wird in einem *Thermocycler* durchgeführt. Bei der Denaturierung wird der DNA-Doppelstrang durch die hohe Temperatur in zwei Einzelstränge getrennt, indem die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. Im ersten Zyklus findet häufig eine längere Erhitzung statt, auch Initialisierung genannt, durch welche sichergestellt werden soll, dass sich das *Template* sowie auch die *Primer* vollständig getrennt haben und lediglich Einzelstränge vorliegen. Im Rahmen des *Annealings* findet anschließend eine Abkühlung auf ca. 50-60 °C, je nach *Primer*, statt. Diese hybridisieren dann mit dem *Template*. Die entsprechende Temperatur des *Annealings* wird dabei durch die Sequenz und die Länge der jeweiligen *Primer* bestimmt. Die Elongation findet hier bei 68 °C statt. Das freie 3'-OH-Ende der *Primer* wird dazu genutzt, Nukleotide komplementär zum *Template*, an den *Primer* zu synthetisieren. Dies geschieht durch die Polymerase, von welcher die bei der Elongation genutzte Temperatur abhängig ist.

Diese drei Schritte (Denaturierung, *Annealing* und Elongation) bilden einen Zyklus. Bei jedem Zyklus findet eine Verdopplung der genetischen Information statt, sodass im Laufe der PCR eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA-Fragmente geschieht. Insgesamt laufen zwischen 30 und 50 Zyklen pro PCR ab. Bei einer sogenannten *nested-PCR* werden zwei PCR-Reaktionen hintereinandergeschaltet. Das heißt, der DNA-Abschnitt wird erst durch eine *outer-PCR* vervielfältigt und dessen Amplifikate dienen anschließend bei einer *inner-PCR* mit jeweils eigenen *Primern* als *Matrize*. Der Vorteil einer *nested-PCR* ist, dass die Sensitivität gegenüber einer normalen PCR um ca. 2-3 Zehnerpotenzen erhöht ist und auch die Spezifität gesteigert ist. So können auch sehr geringe Spuren von DNA amplifiziert werden.

Insgesamt wurden mit der PCR 3 Proben der Kontrollgruppe und 3 Patientenproben amplifiziert, welche als zellfreie Bisulfit-konvertierte-DNA (cfBisDNA) vorlagen. Ebenso erfolgte die Amplifikation von deren Einzelklone.

Ansetzen des PCR-Puffers:

Zur Erstellung des PCR-Puffers wurden 5 ml 1 M von 500 mM KCl mit 1 ml 1 M von 100 mM TrisHCl (pH=8,3) und 0,15 ml 1 M $MgCl_2$ 15 mM in 3,85 ml destilliertem Wasser gelöst. Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 10 ml.

Ansetzen der dNTPs:

Verwendet wurde der dNTP *Solution Mix* (New England BioLabs® Inc.), mit einer Konzentration von insgesamt 40 mM. Die 200 µl des dNTP *Solution Mixes* wurden mit 600 µl destilliertem Wasser verdünnt.

3.5.1 PCR-Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA

Für die PCR von cfBisDNA wurden *Primer* (Verdünnung 1:10) verwendet, die nicht an Bereiche binden, die CpG-Positionen enthalten, da diese sowohl methyliert als auch unmethyliert vorliegen können. Diese Cytosine wurden hierbei durch Thymin ersetzt, da sie nach der Bisulfit-Konversion als Uracil vorliegen und daher wie Thymin eine komplementäre Basenpaarung zu Adenin eingehen.

Outer-PCR:

Zuerst wurde der Master-Mix angelegt (siehe Tabelle 8). Davon wurden je 24,5 µl auf zwei PCR-Gefäße übertragen. Zu einem von diesen wurden dann 0,5 µl der cf BisDNA hinzugefügt. Das andere wurde als negative Kontrolle genutzt und enthielt nur den Master Mix. Die so angelegten PCR-Proben durchliefen 31 Zyklen im *Thermocycler*.

Der Master Mix hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl, inklusive der 0,5 µl cf BisDNA. Er bestand aus je 2,5 µl Puffer, 2 µl dNTP, 0,5 µl der jeweiligen *Reverse-* und *Forward-Primer*, 2 µl Standard-Taq-Polymerase (5 u/µl) und 17 µl H_2O .

Der Master-Mix bei Nutzung des „KAPA Taq PCR Kit“ von Roche, welcher für die Amplifikation der Genloci SCN9A1 und SCN9A2 der Probe P2 Biopsie genutzt wurde, bestand aus 10 µl des KAPA Taq PCR Kits, 0,8 µl der jeweiligen *Reverse-* und *Forward-Primer* sowie 7,4 µl H_2O . Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl, inklusive der DNA-Probe.

Tabelle 8: Master-Mix der *outer*-PCR

Reagenzien	Standard-Taq-Polymerase Master-Mix Mengen	KAPA PCR Kit Master-Mix Mengen
Puffer	2,5 µl	/
dNTP	2 µl	/
Primer Forward	0,5 µl	0,8 µl
Primer Reverse	0,5 µl	0,8 µl
Taq-Pol	2 µl	10 µl des KAPA PCR Kits
H₂O	17 µl	7,4 µl
Endvolumen:	24,5 µl	19 µl

Es wurden die folgenden DNA-Abschnitte amplifiziert: SCN9A1 (171 bp), SCN9A2 (151 bp), SCN10A2 (134 bp) und SCN11A1 (141 bp). Die entsprechenden *Annealing*-Temperaturen der Primer der jeweiligen DNA-Abschnitte sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Übersicht über die *Annealing*-Temperaturen der *outer*-PCR

DNA-Abschnitt	<i>Annealing</i> -Temperatur <i>Outer</i> -PCR
SCN9A1	55 °C
SCN9A2	55 °C
SCN10A2	52 °C
SCN11A1	55 °C

Tabelle 10: Programm des *Thermocyclers* zur PCR-Amplifikation der cfBisDNA im Rahmen der *outer-PCR*. Der Deckel des *Thermocyclers* wurde hier im 1. Schritt auf 95 °C und der Block auf 50 °C vorgeheizt.

Temperatur	Dauer	Vorgang
50 °C		Aufheizen
95 °C	30 s	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	Denaturierung
55/ 52 °C	30 s	<i>Annealing</i>
68 °C	30 s	Elongation
68 °C	4 min	
4 °C	Pause	Lagerung

Nach Schritt 5 wurde wieder mit Schritt 3 begonnen. Insgesamt liefen 31 Zyklen ab.

Inner-PCR:

Es wurde erneut ein Master-Mix angelegt. Davon wurden je 24 µl auf 3 PCR-Gefäße übertragen. Zu einem von diesen wurde 1 µl der cf BisDNA hinzugefügt. Zu einem der anderen wurde 1 µl der Negativ-Kontrolle aus der *outer-PCR* gegeben. Das Dritte wurde als neue Negativ-Kontrolle der *inner-PCR* genutzt und enthielt nur den Master-Mix der *inner-PCR*. Die so angelegten PCR-Proben durchliefen 38 Zyklen im *Thermocycler*.

Der Master-Mix hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl, inklusive der 1 µl cfBisDNA. Er bestand aus je 2,5 µl Puffer, 2 µl dNTP, 0,5 µl der jeweiligen *Reverse-* und *Forward-Primer*, 2 µl Standard-Taq-Polymerase (5 u/µl) und 16,5 µl H₂O.

Der Master-Mix bei Nutzung des „KAPA Taq PCR Kit“ von Roche, bestand wieder aus 10 µl des KAPA Taq PCR Kits, 0,8 µl der jeweiligen *Reverse-* und *Forward-Primer* sowie 7,4 µl H₂O. Es ergab sich erneut ein Gesamtvolumen von 20 µl, inklusive der DNA-Probe.

Tabelle 11: Master-Mix der *inner*-PCR

Reagenzien	Standard-Taq-Polymerase Master-Mix Mengen	KAPA PCR Kit Master-Mix Mengen
Puffer	2,5 µl	/
dNTP	2 µl	/
Primer Forward	0,5 µl	0,8 µl
Primer Reverse	0,5 µl	0,8 µl
Taq-Pol	2 µl	10 µl des KAPA PCR Kits
H₂O	16,5 µl	7,4 µl
Endvolumen:	24 µl	19 µl

Es wurden die folgenden DNA-Abschnitte amplifiziert: das *Inner*-PCR-Produkt von SCN9A1 (71 bp), das *Inner*-PCR-Produkt von SCN9A2 (113 bp), das *Inner*-PCR-Produkt von SCN10A2 (104 bp) und das *Inner*-PCR-Produkt von SCN11A1 (105 bp).

Tabelle 12: Übersicht über die *Annealing*-Temperaturen der *inner*-PCR

DNA-Abschnitt	<i>Annealing</i> -Temperatur <i>Inner</i> -PCR
SCN9A1	55 °C
SCN9A2	55 °C
SCN10A2	53 °C
SCN11A1	53 °C

Tabelle 13: Programm des *Thermocyclers* zur PCR-Amplifikation der *inner*-PCR. Der Deckel des *Thermocyclers* wurde hier im 1. Schritt auf 95 °C und der Block auf 50 °C vorgeheizt

Temperatur	Dauer	Vorgang
50 °C		Aufheizen
95 °C	30 s	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	Denaturierung
55/ 53 °C	30 s	<i>Annealing</i>
68 °C	30 s	Elongation
68 °C	4 min	
4 °C	Pause	Lagerung

Nach Schritt 5 wurde wieder mit Schritt 3 begonnen. Es gab insgesamt 38 Zyklen.

Die PCR-Produkte der *Inner*-PCR mussten anschließend direkt ligiert werden.

3.5.2 PCR zur Amplifikation der Klone

Es wurde erneut ein Master-Mix erstellt. Davon wurden je 49 µl mittels einer Multipette auf 96-Well-PCR-Platten (STARLAB) verteilt und jeweils 1 µl von den Proben auf den 96-Well-Bakterienplatten mit einer Kanalpipette (Costar) hinzugegeben. Es wurde jeweils 1 Negativ-Kontrolle pro PCR-Platte erstellt. Die PCR-Reaktion fand im *Thermocycler* statt.

Die genutzten *Primer* waren M13-Vektorrandprimer. Die hierfür genutzte *Annealing*-Temperatur betrug 52 °C (bei 36 Zyklen im *Thermocycler*). Sie dienten der Amplifikation des *Inserts* der Vektoren. Zu ihrer Nutzung war zuvor eine 1:10 Verdünnung der *Primer* mit destilliertem autoklaviertem Wasser nötig.

Der Master-Mix hatte ein Gesamtvolumen von 50 µl, inklusive der 1 µl Proben der Klone. Er bestand aus je 5 µl Puffer, 4 µl dNTP, 1 µl der jeweiligen *Reverse*- und *Forward-Primer*, 2 µl Standard-Taq-Polymerase (5 u/ µl) und 36 µl H₂O.

Tabelle 14: Master-Mix für die PCR der Einzelklone

Reagenzien	Menge
Puffer	5 µl
DNTP	4 µl
<i>Primer Forward</i>	1 µl
<i>Primer Reverse</i>	1 µl
Taq- Pol	2 µl
H₂O	36 µl
Endvolumen	49 µl

Tabelle 15: Programm des *Thermocyclers* zur PCR-Amplifikation der Einzelklone. Der Deckel des *Thermocyclers* wurde hier im 1. Schritt auf 95 °C und der Block auf 50 °C vorgeheizt.

Temperatur	Dauer	Vorgang
50 °C		Aufheizen
95 °C	30 s	Initiale Denaturierung
95 °C	30 s	Denaturierung
52 °C	30 s	<i>Annealing</i>
72 °C	1 min, 30 s	Elongation
72 °C	6 min	
4 °C	Pause	Lagerung

Insgesamt liefen 36 Zyklen ab.

3.6 Agarose- Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, die dazu dient, DNA-Fragmente ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen. Dies ist möglich, da die DNA eine negative Ladung hat und beim Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung des Plus-Pols läuft. Man lässt auch einen Standard, eine sogenannte *ladder* oder auch Basenpaarmarker mitlaufen, die Banden bestimmter Größen erzeugt, anhand derer die Größe des Molekulargewichts der DNA-Fragmente bestimmt werden kann. So lässt sich anhand der Größe feststellen, ob bei der PCR die gesuchten Abschnitte amplifiziert wurden. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ist von der Größe und der Ladung der Moleküle abhängig. So laufen kleine, negativ gelade-

ne Moleküle am schnellsten Richtung Plus-Pol. Agarosegele sind eher großporig und daher gut für die Auftrennung von DNA geeignet. Je nach Konzentration der Agarose im Gel ist die Distanz zwischen den DNA-Banden unterschiedlicher Länge verschieden. Höhere Konzentrationen bedeuten außerdem eine längere Laufzeit.

3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese der *Inner*-PCR

Es wurde ein 2 % Agarosegel erstellt, indem die entsprechende Menge Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und die korrelierende Menge an 1x TBE-Puffer dazugegeben wurde. Der Erlenmeyerkolben wurde leicht geschwenkt, damit sich die Agarose besser lösen konnte und dann in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die dadurch verdunstete Menge der Flüssigkeit wurde nun durch destilliertes Wasser ersetzt und das Gel gegossen. Während das Agarosegel polymerisierte, wurden die in die Geltaschen zu gebenden Proben vorbereitet.

Pro PCR-Probe wurden 4 µl *OrangeDye Ladepuffer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.) vorgelegt, die mit je 7 µl der PCR-Proben gemischt und mittels einer Pipette in die Geltaschen aufgetragen wurden. Es wurden ebenfalls je 4 µl *OrangeDye* mit 4 µl einer 100 bp Marker von NEB (Ipswich, Massachusetts, U.S.), welcher später als Längenstandard diente, gemischt und ebenfalls auf das Agarosegel aufgetragen. Dies erfolgte in einem Abstand, der es ermöglichte, dass die Größe der Proben später gut anhand des 100 bp Basenpaarmarkers festzustellen war.

Das Agarosegel wurde bei 95 V einlaufen gelassen. Waren die Proben in das Gel getreten, wurde auf 125 V erhöht.

Das Agarosegel konnte nun mittels Ethidiumbromid angefärbt werden.

Ethidiumbromidfärbung:

Für die Ethidiumbromidfärbung wurde eine 0,00015 % Ethidiumbromidlösung vorbereitet. Da sich Ethidiumbromid bei längerer Lichteinwirkung zersetzen kann, war es nötig den Behälter lichtdicht zu verschließen.

Das Agarosegel wurde in dem Ethidiumbromidbad auf dem Plattformschüttler positioniert. Nach ca. 10 min wurde es aus dem Ethidiumbromidbad genommen und für 1 min in einem Behälter mit destilliertem Wasser ausgewaschen, sodass das überschüssige Ethidiumbromid aus der *Matrix* entfernt wurde.

Nun wurde das Agarosegel in einer UV-Kamerabox unter UV-Licht-Anregung ausgewertet. Dies ist möglich, da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert. Es lagert sich zwischen den Basen und hat fluoreszierende Eigenschaften, sodass es durch UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Anhand dieses Bildes konnten nun die Proben identifiziert werden, bei welchen die PCR-Amplifikation erfolgreich war.

Ansetzen des 1x TBE-Puffers:

Für das Ansetzen von 5 l 10x TBE-Puffers wurden 540 g Tris, 275 g Borsäure und 46,5 g EDTA portionsweise in einer kleinen Menge destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde ein pH-Wert von 8,3 eingestellt. Dann wurde mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5 l aufgefüllt. Es erfolgte im Anschluss eine 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser, um 1x TBE-Puffer zu erhalten.

3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese der M13-PCR

Die Agarose-Gelelektrophorese der M13-PCR-Produkte lief nach dem gleichen Prinzip ab. Es wurde wieder ein 2 % Agarosegel erstellt, dieses Mal allerdings in größerem Format. Zusätzlich wurde z.T. noch ein weiteres kleines Gel gefahren, wenn die Anzahl der PCR-Proben es nötig machte (ebenfalls mit einer Konzentration von 2 %). Es wurden jeweils 4 µl *OrangeDye* mit einer Multipette in eine leere 96-Well-Bakterienplatte vorgelegt und jeweils 7 µl der PCR-Proben mit einer Kanalpipette (Costar) hinzugegeben. Mit dieser wurden die so erstellten Proben anschließend in die Geltaschen gegeben. Das Gel lief wieder bei 95 V ein und wurde dann auf 125 V hochgestellt. Es wurde ebenfalls im Ethidiumbromidbad gefärbt und mittels der UV-Kamerabox unter UV-Licht ausgewertet.

3.7 Klonierung

3.7.1 Ansetzen der Medien und des Agars

LB-Medium:

Es wurde eine kleine Menge destilliertes Wasser in einen Messbecher gegeben. Mittels eines Magnetrührers wurden die nachfolgenden Reagenzien fortwährend gemischt. Für 2,5 l LB-Medium wurden 25 g Bacto *Tryptone*, 12,5 g Bacto *Yeast Extract* und 25 g NaCl nach und nach in dem destillierten Wasser gelöst. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser

auf ca. 2 l aufgefüllt und ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Danach konnte mit destilliertem auf die ganzen 2,5 l aufgefüllt werden.

LB-Agar:

Für die Erstellung von 500 ml LB-Agar wurden 7,5 g Bacto Agar abgewogen. Daraufhin wurde mit dem o.g. LB-Medium auf eine Gesamtmenge von 500 ml aufgefüllt. Sowohl das LB-Medium als auch der LB-Agar mussten nach der Herstellung autoklaviert werden.

Um den LB-Agar als Nährmedium für die zur Transformation verwendeten Bakterien zu nutzen, wurde er aufgeköcht. Sobald er vollständig flüssig war, wurde er in ein Wasserbad (59 °C) gestellt und es wurden 24 mg IPTG in 5 ml Ampicillin (10 mg/ml) gelöst sowie 20 mg X-Gal in 1 ml Dimethylformamid gelöst, zu dem LB-Agar gegeben. Das Ganze wurde kurz gemischt und konnte anschließend auf die Petrischalen (Greiner) gegeben werden.

SOC-Medium:

Zuerst wurde SOB-Medium angesetzt. Dafür wurden 20 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extrakt und 0,5 g NaCl in 1 l destilliertem Wasser gelöst. Danach wurden 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ hinzugegeben. Zur Erstellung des SOC-Mediums wurden im Anschluss 20 mM Glucose-Lösung mit 100 ml SOB-Medium gemischt.

3.7.2 Ligation der PCR-Produkte

Die Ligation der PCR-Produkte der *inner-Primer* erfolgte immer direkt im Anschluss an die PCR. Genutzt wurde hierfür das Promega Kit mit einem pGEM-T-Vektor. Die pGEM-T-Vektoren haben einen 3'-Überhang, der verhindert, dass eine Rezirkularisierung des Vektors geschieht und bieten außerdem einen Überhang für die PCR-Produkte. Diese haben, durch eine thermostabile Polymerase synthetisiert, ein Adenosin-Nukleotid am 3'-Ende, was die Ligation durch die T4-DNA-Ligase begünstigt. Die T-Überhänge am 3'-Ende entstehen dadurch, dass der Vektor mit EcoR V geschnitten und ein 3'-terminales Thymidin an beide Enden gehängt wurde.

Zuerst wurde der T-Vektor kurz zentrifugiert und die Menge der einzusetzenden PCR-Produkte, hier 3 µl, bestimmt. Der *Ligation Buffer* musste jedes Mal vor Nutzung gevortext werden. Dann wurde folgender Ansatz erstellt:

Zuerst wurden 5 µl des *2X Rapid Ligation Buffers* in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurde 1 µl des pGEM-T-Vektors (50 ng) hinzu pipettiert. Ebenso je 3 µl des PCR-Produkts. Zum Schluss wurde T4-DNA-Ligase (3 Weiss *units*/ µl) hinzugegeben. Das Endvolumen betrug 10 µl.

Der Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alternativ wäre auch eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur möglich gewesen.

3.7.3 Transformation von Escherichia Coli (XL 10-Gold Bakterien)

Es wurden Petrischalen (Greiner) mit einem Durchmesser von 10 cm, die LB-Agar mit Ampicillin, IPTG, Dimethylformamid und X-Gal enthielten, verwendet.

Zur Transformation wurden XL 10-Gold-Bakterien genutzt. Zuerst wurde die Bakteriensuspension aufgetaut und 50 µl davon in ein vorgekühltes Transformationsröhrchen gegeben. Dann wurden 2 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Alle 2 min wurde das Transformationsröhrchen zur besseren Durchmischung leicht geschwenkt. Als nächstes wurden je 5 µl des jeweiligen pGEM-T-Ligationsansatzes dazugegeben. Es erfolgte erneut eine Inkubation auf Eis, nun für 30 min. Danach erfolgte der 30 s Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C, mit darauffolgender Inkubation auf Eis für 2 min.

Als nächstes wurden 500 µl des bereits vorgewärmten S.O.C.-Mediums hinzugefügt und der ganze Ansatz für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Es wurden je 50 µl und 150 µl eines Ansatzes auf den LB-Agar-Petrischalen (LB-Ampicillin/X-Gal/IPTG-Petrischalen) ausgestrichen und über Nacht bei 38 °C in dem Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

3.7.4 Blau-Weiß-Selektion

Die Methode der Blau-Weiß-Selektion wurde genutzt, um festzustellen, welche der Bakterienklone erfolgreich den Vektor mit enthaltenem DNA-Fragment übernommen hatten. Der besagte Vektor enthielt einen Replikationsursprung, *ori* genannt sowie ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Das bedeutet, dass nur Bakterien mit dem Vektor auf den LB-Agar-Petrischalen wachsen konnten, da diese Ampicillin enthielten. Außerdem enthielt der Vektor ein LacZ-Gen, welches für die β-Galactosidase kodierte. Darin lag eine MCS, eine sogenannte *Multiple Cloning Site*, an welcher mehrere Restriktionsendonukleasen schneiden können. Bakterien, die die β-Galactosidase exprimierten, setzten das farblose X-Gal, welches in den LB-Agar-Platten enthalten war, um, sodass eine Blaufärbung entstand (Knippers, 2018).

Bei einer erfolgreichen Ligation wird das PCR-Produkt aber innerhalb der *Multiple Cloning Site* einligiert und zerstört somit das LacZ-Gen, weshalb keine β-Galactosidase exprimiert

und somit auch das X-Gal nicht umgesetzt wird. Daher entstehen weiße Bakterienklone (Knippers, 2018). Das Ganze basiert auf dem Konzept der α -Komplementierung. Das bedeutet, das LacZ-Gen, welches ein sehr großes Polypeptid und nur als Homo-Tetramer funktionell ist, hat die für die Assemblierung seiner Untereinheiten zuständige Region im N-terminalen Bereich seines Proteins. Diese Region kann durch eine Deletion von bestimmten Aminosäuren zerstört werden und somit das komplette Enzym deaktivieren. Wird das sogenannte α -Fragment, ein Polypeptid, welches die deletierten Aminosäuren enthält, in das an entsprechender Stelle mutierte LacZ-Gen eingeführt, so vervollständigt es das Polypeptid wieder und das Enzym ist wieder aktiv. Dieses α -Fragment ist bei der Blau-Weiß-Selektion im Klonierungsvektor enthalten und enthält wiederum die besagte *Multiple Cloning Site*, an welcher das PCR-Produkt bei erfolgreicher Ligation einligiert wird und dadurch das α -Fragment zerstört, wodurch die β -Galactosidase deaktiviert wird (Mülhardt and Mülhardt, 2013).

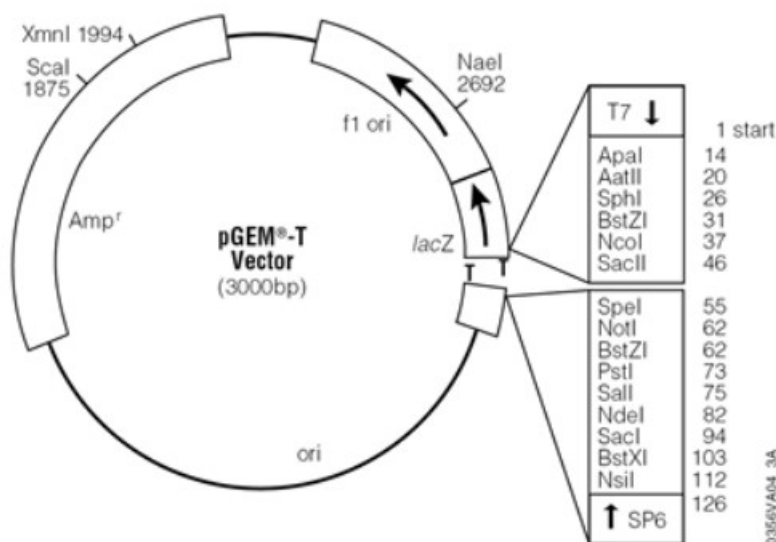


Abbildung 13: Aufbau des pGEM T-Vektors von Promega (Promega Corporation, 2021)

Am Tag nach der Transformation wurden die weißen Einzelklone mit einer Pipettenspitze aus den Platten selektiert, indem mit der Spitze leicht in die Ziel-Kolonie gestochen und diese dann für ca. 30 s in ein mit jeweils 150 μ l LB-Medium gefülltes Well einer 96-Well-Platte gestellt wurde. Danach wurde die 96-Well-Platte für 2-3 h im Brutschrank (Heraeus) inkubiert, damit anschließend die PCR mit den M13-Vektorrandprimern erfolgen konnte.

3.8 SAP-Aufreinigung der Klone

Nachdem die positiven Einzelklone mittels Gelelektrophorese identifiziert worden waren, wurden deren PCR-Proben mittels eines Ansatzes aus Exonuclease 1 und SAP (= *Shrimps-Alkalin-Phosphatase*) aufgereinigt. Es wurde ein Master-Mix erstellt, welcher aus je 0,2 µl Exonuclease 1, 0,8 µl SAP und 3 µl Wasser bestand. Dazu wurden jeweils 18 µl des Amplifikats gegeben.

Die so erstellten Proben wurden zunächst für eine halbe Stunde bei 37 °C im *Thermocycler* inkubiert, danach für 15 min bei 80 °C. Die Proben konnten bei -20 °C gelagert werden.

3.9 Sequenzierung:

3.9.1 Sequenzierreaktion:

Die aufgereinigten Amplifikate wurden nun einer Sequenzierreaktion unterzogen. Dafür wurde folgender Master-Mix erstellt: je 1 µl *BigDye*, 1 µl Sequenzierpuffer, 0,5 µl M13-*Reverse-Primer* und 2,5 µl H₂O. Es wurden immer jeweils 5 µl des Master-Mix und 5 µl des ExoSAP-Ansatzes pro Well einer 96-Well-Platte gegeben. Daraufhin durchliefen die Proben insgesamt 25 Zyklen des folgenden Programms im *Thermocycler*:

Tabelle 16: Programm des *Thermocyclers* für die Sequenzierreaktion.

Temperatur	Dauer	Vorgang
96°C	1 min	Initiale Denaturierung
96°C	10 s	Denaturierung
50°C	5 s	<i>Annealing</i>
60°C	4 min	Elongation
10°C	Pause	Lagerung

3.9.2 DNA-Fällung:

Für die Fällung wurde ein Master-Mix erstellt, der für eine 96-Well-Platte ausreichte, und 1,2 ml HPLC-H₂O, 240 µl NaAc mit einem pH zwischen 5,2 und 5,5 sowie 6 ml Ethanol (100 %) enthielt. Dieser Master-Mix musste gut gevortext werden. Anschließend konnten mit einer 8-Kanal-Pipette (Costar) je 62 µl des Master-Mixes pro Well zu den Proben in der 96-Well-Platte gegeben werden. Nun wurde die 96-Well-Platte wieder gut verschlossen und

eine Minute lang gevortext. Danach wurde die Platte für 45 min bei 3200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde die Flüssigkeit in der 96-Well-Platte verworfen und die Platte, ohne sie zu wenden, ausgeklopft.

Daraufhin wurden mittels einer 8-Kanal-Pipette je 200 µl Ethanol (70 %) in die Wells der Platte gegeben, um das Natriumacetat, welches sich an die DNA gelagert hatte, zu entfernen. Die Platte wurde wieder verschlossen und 4-5-mal invertiert, bevor sie erneut für 45 min bei 3200 rpm zentrifugiert wurde. Erneut wurde die Flüssigkeit verworfen und die Platte, ohne sie zu wenden, ausgeklopft. Nun wurde die 96-Well-Platte auf einem Heizblock ca. 15 min getrocknet und anschließend 15 µl Formamid pro Well dazugegeben. Dies musste mittels einer 8-Kanal-Pipette durchmischt werden und konnte dann mit einer Gummipatte abgedeckt und kurz bis 2000 rpm anzentrifugiert werden. Danach wurde sie im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, bis die Sequenzierung startete.

3.9.3 Sequenzierung:

Durch eine Sequenzierung ist es möglich, die Basenabfolge eines DNA-Fragments zu ermitteln (Siemens and Soppa, 2017). Verwendet wurde hierfür die Methode der Sanger-Sequenzierung, für die Walter Gilbert und Fred Sanger 1980 den Nobelpreis erhielten (Holinski-Feder, 2017). Angewendet auf die Analyse des Methylierungsmusters der hier untersuchten Fragmente bedeutet dies, zu jeder CpG-Position zu erfahren, ob sie methyliert vorliegt, das heißt auch nach der Bisulfit-Konversion noch als Cytosin, oder unmethyliert und durch die Bisulfit-Konversion modifiziert als Thymin. Bei der Methode der Sanger-Sequenzierung findet ein *Annealing* von Oligonukleotid-*Primern* an die amplifizierte DNA statt, woraufhin an diese von der DNA-Polymerase angeknüpft wird. Dieser stehen dabei die vier Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTP: dATP, dGTP, dCTP und dTTP) zur Verfügung, aber auch Didesoxynukleotid-Triphosphate (ddNTP: ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) (Crossley et al., 2020). Diese Didesoxynukleotid-Triphosphate können, nach Siemens and Soppa (2017), zwar durch die DNA-Polymerase eingebaut werden, weisen jedoch anders als die Desoxynukleotid-Triphosphate an dem 3'-C-Atom der Ribose keine OH-Gruppe auf, weshalb hier keine weitere Elongation erfolgen kann und es zu einem Kettenabbruch kommt. Die DNA-Polymerase katalysiert für die DNA-Synthese eine Kondensationsreaktion zwischen der 3'-OH-Gruppe des letzten Nukleotids des neu synthetisierten DNA-Strangs und der 5'-Phosphat-Gruppe des nächsten Nukleotids, hierbei wird Wasser freigesetzt und eine Phosphodiesterbindung entsteht. Dies ist hier durch die fehlende 3'-OH-Gruppe jedoch nicht möglich. Die ddNTP werden bei der Sanger-Sequenzierung in geringerer Konzentration als die dNTP verwendet und der Einbau dieser durch die DNA-Polymerase erfolgt nach den Gesetzen der Statistik. Werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet, bei welchen jedes in einer anderen Farbe markiert ist, ist eine Analyse der Basenabfolge anhand eines Chroma-

togramms möglich. Auskunft über die Qualität der Sequenzinformation gibt die entsprechende Höhe der jeweiligen Kurvengipfel (Siemens and Soppa, 2017).

Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte in der Abteilung Endokrinologie des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Mainz. Genutzt wurde hierfür ein *DNA-Sequencer* (3130-*Genetic-Analyzer*) sowie das schnelle Leseweiteprogramm (*fast-sequencing*) mit 250-300 bp Leseraster. Ausgewertet wurden die so erhaltenen Sequenzen anhand eines Chromatogramms mit dem *Software*-Programm *Sequencher*™ Version 5.10.1.

3.10 Isolation und *Purification* der Hautstanz-Biopsie-Proben

3.10.1 DNA-Isolation aus Hautstanzbiopsien

Die zuvor in der Neurologie entnommenen Proben der Hautstanzbiopsien wurden bei -80 °C gelagert. Sie wurden nun zusammen mit Flüssigstickstoff in einen Mörser gegeben und mittels eines Skalpells und einer Pinzette in kleinere Fragmente geteilt. Von diesen wurde je 0,5 µg Gewebe zur DNA-Isolation verwendet. Für die DNA-Isolation wurde das EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo Research) genutzt und es wurde nach dem entsprechenden Protokoll von Zymo Research vorgegangen. Die Biopsie-Proben wurden dazu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Master-Mix des Kits gegeben.

Dieser Master-Mix bestand aus 65 µl *M-Digestion*-Puffer, 59,5 µl H₂O und 5 µl Proteinase K. Für die Isolation wurde 0,5 µg Gewebe von der Hautstanzbiopsie genutzt.

Tabelle 17: Master-Mix von Zymo Research zur DNA-Isolation und die dafür verwendete Probenmenge

Reagenzien	Menge
Gewebeprobe	0,5 µg
M-Digestion-Puffer	65 µl
H₂O	59,5 µl
Proteinase K	5 µl

Die Proben wurden auf einem *Thermomixer* von Eppendorf bei 50 °C für ca. 4-5 h inkubiert, bis sie vollständig von der Proteinase K „verdaut“ waren. Anschließend wurde der Inhalt des

Reaktionsgefäßes gevortext und für 5 min. bei 10 000 x g zentrifugiert. 50 µl der Probe konnten nun zur *Purification* genutzt werden.

Es wurden 3 Biopsie-Proben von Patienten mit SFN bzw. V.a. SFN genutzt (P1, P2 und P3).

3.10.2 *Purification* der Proteinase-K-Gewebeproben

Für die *Purification* wurden je 50 µl der Proteinase-K verdauten Gewebeproben aus 3.10.1 verwendet. Genutzt wurde hierfür das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Zuerst fand die *Lyse* der Proben und Isolation der DNA statt. Hierfür wurden 50 µl der Proben jeweils mit 200 µl *Tissue Lysis* Puffer und 40 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gevortext. Anschließend wurde dies bei 55 °C für 30-60 min. auf einem *Thermomixer* von Eppendorf inkubiert. Nun wurden 200 µl *Binding* Puffer hinzugegeben, das Ganze wurde erneut gevortext und daraufhin bei 70 °C für 10 min. inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Isopropanol dazugegeben und das Ganze wieder gevortext. Anschließend wurde je ein *High Pure Filter Tube* in je ein *Collection Tube* gesetzt und der flüssige Überstand in das obere Pufferreservoir des *Filter Tubes* gegeben. Diese Röhrchen wurden nun für 1 min. bei 8000 x g zentrifugiert.

Daraufhin erfolgte das Waschen und die Elution der DNA. Die *Filter Tubes* konnten hierfür aus den *Collection Tubes* genommen werden. Die *Collection Tubes* sowie die darin enthaltene Flüssigkeit wurden verworfen. Die *Filter Tubes* wurden jeweils in einem neuen *Collection Tube* platziert und es wurden je 500 µl *Inhibitor Removal* Puffer hinzugegeben. Das Ganze wurde daraufhin erneut für 1 min. bei 8000 x g zentrifugiert und das *Collection Tube* mit dem jeweiligen Inhalt verworfen. Wieder wurden die *Filter Tubes* in einem neuen *Collection Tube* platziert. Nun wurden 500 µl des Wasch-Puffers hinzugegeben und das Prozedere wiederholt. In das *Filter Tube* wurden erneut 500 µl des Wasch-Puffers gegeben und erneut wurde das Ganze bei 8000 x g für 1 min. zentrifugiert. Der Durchfluss sowie das *Collection Tube* wurden jeweils wieder verworfen, es wurde wieder je ein neues *Collection Tube* genutzt und erneut bei voller Geschwindigkeit für nun 10 s zentrifugiert. Zur DNA-*Elution* wurden die *Filter Tubes* je in ein neues, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und je 200 µl vorgewärmter *Elution* Puffer dazugegeben. Anschließend wurde das Ganze für 1 min. bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die gelöste DNA und konnte für die Bisulfit-Konversion genutzt werden.

4 Material:

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	StarLab
BigDye	Star SEQ GmbH
Big Dye Puffer	GENterprise GmbH
dNTPs (10 mM)	New England BioLabs® Inc.
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu
Ethidiumbromid	Roth, Q-Bio
Ethanol	Merck
Exonuklease	New England BioLabs® Inc.
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystem
KAPA Taq ReadyMix	Roche
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
NaOH	Roth
Shrimp Alkaline Phosphatase (rSAP)	New England BioLabs® Inc.
Standard-Taq-Polymerase	
Wasser (H ₂ O bidest.)	Braun
pGEM-T-Vektor	Promega
pGEM-T 2x Rapid Ligation Buffer	Promega
T4-Ligase	Promega
XL-10-Gold® Ultracompetent Cells	Stratagene®
β-Mercaptoethanol	Sigma

4.2 Lösungen und Puffer

Agarosegel (2 %)	x g Agarose/ x ml TBE Puffer
Ethidiumbromidlösung	5 µg/ml, 100 µl/ 500 ml H ₂ O
LB-Agar	Bacto Agar, LB-Medium, Ampicillin, X-Gal, IPTG
LB-Medium	Bacto Tryptone, Bacto Yeast Extract, NaCl, Aqua bidest
OrangeDye (5x)	30 % Sucrose 0,35 % Orange G (Sigma)
SOB-Medium	Bacto Tryptone, Bacto yeast extract, NaCl, Ampicillin
SOC-Medium	SOB-Medium, Glucose
TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1,25 mM Na ₂ EDTA
PCR-Puffer	500 mM KCl, 100 mM TrisHCL pH 8,3, 15 mM MgCl ₂ , H ₂ O

4.3 Molekulargewichtstandards

Quick-Load 100 bp-DNA-Ladder	New England Biolabs®Inc.
------------------------------	---------------------------------

4.4 Primer

Tabelle 18: Überblick über die Sequenz, die Anzahl der Basen, die Anzahl der C/G sowie A/T und die Temperatur der Primer für die untersuchten DNA-Abschnitte.

Primer-Name	Sequenz: 5' zu 3'	Basen-anzahl	G/C	A/T	Annealing-Temp.
B-SCN9A-1-oF	AGG TGG GGA TTA ATG GTA AAG	21	9	12	55°C
B-SCN9A-1-oR	ACC AAT TCC CAA CCT AAA CTC	21	9	12	55°C
B-SCN9A-2-oF	GAA TAT GTT ATT AGT TAT ATG GG	23	6	17	55°C
B-SCN9A-2-oR	ATT CAA CCC TAT TTC CAT TAT TC	23	7	16	55°C
B-SCN10A-2-oF	TTT TTA AGA GTT GAG AGT AGA	21	6	15	52°C
B-SCN10A-2-oR	CAA CCA ACT ACC CAA ATT C	19	8	11	52°C
B-SCN11A-1-oF	GTT GAG TTT AGG AAT AAG TGA G	22	8	14	55°C
B-SCN11A-1-oR	TTT AAA CCA TAT AAC CAC TTA CC	23	7	16	55°C
B-SCN9A-1-iF	GAG TTT GGG GTA GTG GTT G	19	10	9	55°C
B-SCN9A-1-iR	AAC CTA AAC TCT TCA AAA CCC	21	8	13	55°C
B-SCN9A-2-iF	GTT TTG AAT TTT AGA GTT GGT AG	23	7	16	55°C
B-SCN9A-2-iR	ATT ATT CTT CCT CCC AAA CTA C	22	8	14	55°C
B-SCN10A-2-iF	GAG AGT AGA TAT TTT TAT TAG TAG	24	6	18	53°C
B-SCN10A-2-iR	CTA TAA TAA ACT CCC AAC AAA AC	23	7	16	53°C
B-SCN11A-1-iF	ATA AGT GAG TAG AAG AAG TTT AG	23	7	16	53°C
B-SCN11A-1-iR	TAC TAC TTA CAA ATC CCA CTT C	22	8	14	53°C

Tabelle 19: Übersicht über die Sequenz und Temperatur der M13-Vektorrandprimer (pGEM-T-Insert-Kontrolle).

Primer-Name	Sequenz: 5' zu 3'	Temperatur
M13-Forward-Primer	GTT TTC CCA GTC ACG AC	52°C
M13-Reverse-Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC	52°C

4.5 Geräte

12-Kanal-Pipette

Costar®

DNA-Sequencer (3130-Genetic-Analyzer)

ThermoFisher

SCIENTIFIC

Eismaschine

Ziegra

Elektrophorese-Spannungsgerät	Electrophoresis Power Supply GPS200/400 (Pharmacia)
Elektrophoresekammer	Easy- Cast™ Electrophoresis System Model #B1
Finnpipette® F2 (0,2-2 µl)	Thermo Scientific
Finnpipette®F2 (1-10 µl)	Thermo Scientific
Finnpipette®F2 (5-50 µl)	Thermo Scientific
Finnpipette®F2 (20-200 µl)	Thermo Scientific
Finnpipette®F2 (100-1000 µl)	Thermo Scientific
Geldetektionsgerät	(Peqlab)
Gelkammer	Mini-Protean Tetra Cells (Bio-RAD)
Inkubator	Heraeus
Mikrowelle	Siemens
Mini Gasbrenner	Blue Flame
Multipette®plus	Eppendorf
Plattformschüttler	Heidolph (Polymax 1040)
Pipette (20-200 µl)	VWR® Single Channel
Pipette (100-1000 µl)	VWR® Single Channel
Thermocycler (PCR)	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifugen	Fresco 21 Centrifuge (Heraeus) Hettich Zentrifugen EBA 12R (Hettich Lab Technologie)

Transferpette®-8 (20-200 µl)	Brand
Transferpette®-8 (5-50 µl)	Brand
Vortexer	Janke & Kunkel (StarLab)
Vortex Mixer	IKA-Model MS3
Waagen	Sartorius laboratory
Wasserbad	Kottemann Labortechnik
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
42-Well Kamm 1,5 mm	peqlab
12-Well Kamm 1,5 mm	peqlab

4.6 Verbrauchsmaterial

96-Well-PCR-Platten	StarLab
96-Well-Bakterien-Platten	Costar®; Greiner
96-Well-Sequenzier-Platten	Biozym
12-Strip PCR Caps, flat	StarLab
Flat Optical 8-Cap Strip, farblos, knickbar	Biozym
Gefäß (50 ml)	Falcon®
Gefäß (15 ml)	Falcon®
Handschuhe Nitril	VWR
Handschuhe	Peha-soft®
Laboratory Film	Parafilm®
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt
Petrischalen 10 cm Durchmesser	Greiner
Pipettenspitzen (gestopft, steril, 10 µl, 200 µl, 1000 µl)	TipOne (StarLab)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Greiner

Transformationsröhrchen

BD Falcon™

4.7 verwendete Kits

High Pure PCR Template Preparation Kit

Roche

EZ DNA Methylation-Direct™ Kit

Zymo Research

KAPA Taq PCR Kit

Roche

QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit

QIAGEN

Zur Untersuchung, ob Methylierungsunterschiede in der Promotorregion gesunder und an SFN erkrankter Menschen bestehen, wurden die Gene SCN9A (*Sodium channel protein type 9 subunit alpha*) auf Chromosom 2 (2q24.3), SCN10A (*Sodium channel protein type 10 subunit alpha*) auf Chromosom 3 (3p22.2) sowie SCN11A (*Sodium channel protein type 11 subunit alpha*) auf Chromosom 3 (3p22.2) untersucht. Diese drei Gene codieren für Proteine, die die Untereinheiten der spannungsgesteuerten Natriumkanälen Na_v1.7, 1.8 und 1.9 bilden, welche spezifisch in C-Nervenfasern exprimiert werden (Sopacua et al., 2019). Für diese Untersuchung standen Blutplasma-Proben sowohl von drei gesunden Kontrollen als auch von zwei an SFN erkrankten Patienten zur Verfügung. Die Isolation der DNA aus den Plasma-Proben erfolgte mittels „QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit“ (QIAGEN), die anschließende Bisulfit-Konversion wurde mittels „EZ DNA Methylation-Direct™ Kit“ (Zymo), je nach entsprechendem Protokoll, durchgeführt. Außerdem standen drei Biopsie-Proben von an SFN erkrankten Patienten zur Verfügung, welche als weitere Kontrolle dienten und die Methylierungsverhältnisse der epidermalen und dermalen Zellen darstellen sollten. Die Isolation der DNA aus diesen Proben und deren Bisulfit-Konversion erfolgten mittels „EZ DNA Methylation-Direct™ Kit“ (Zymo). Pro Gen sollten zwei, für SCN11A1 drei Regionen auf C-Faser spezifische Methylierungsmuster untersucht werden. Teils wurden sogenannte *nested*-PCRs durchgeführt, teils einfache PCRs. Die untersuchten DNA-Sequenzen hatten, je eine Größe, zwischen 71 bp und 151 bp und eine Anzahl zwischen 1 und 16 CpG-Dinukleotiden (siehe Tabelle 20). Jedes dieser CpG-Dinukleotide stellt hierbei eine potenzielle Methylierungsstelle dar. Da zellfreie, aus dem Blutplasma gewonnene DNA durchschnittlich meist eine Länge von ca. 147-167 bp hat, war es wichtig, die Länge der zu untersuchenden Sequenzen so abzustimmen, dass diese nicht über die Größe des zellfreien DNA-Materials hinausgeht (Worm Ørntoft et al., 2017). Die Länge der zu amplifizierenden Sequenzen sollte aber auch wegen der folgenden Bisulfit-Konversion nicht größer als 150-300 bp sein (Zymo Research, n.d.).

Tabelle 20: Übersicht über die untersuchten Genloci und deren jeweiligen Anzahl an CpG-Stellen sowie deren Sequenzgröße.

CpG- Anzahl	Gen/ Sequenz	Sequenzgröße der <i>Outer-PCR</i>	Sequenzgröße der <i>Inner-PCR</i>
3	SCN9A1	117 bp	71 bp
3	SCN9A2	151 bp	113 bp
1	SCN10A1	/	87 bp (einfache PCR)
3	SCN10A2	134 bp	104 bp
16	SCN11A1	141 bp	105 bp
1	SCN11A2	/	151 bp (einfache PCR)
4	SCN11A3	160 bp	108 bp

5.1 PCR-Amplifikation von Bisulfit-konvertierter DNA der Blutplasma-Proben

Damit die PCR-Amplifikation der jeweiligen Sequenzen erfolgreich und effizient ablaufen kann, müssen die ausgewählten *Primer* bestimmte Kriterien erfüllen. Sie dürfen u.a. keine CpG-Dinukleotide enthalten, da diese potenzielle Methylierungssequenzen darstellen und somit sowohl methyliert als auch unmethyliert vorliegen können. Sie sollten des Weiteren keine zu langen T-Nukleotid-Repetitionen aufweisen und eine Länge von ca. 26 bp haben (Zymo Research, n.d.). Bei den *Forward-Primern* wurden die Cytosine des Originalstranges durch Thymin-Nukleotide ersetzt, um eine Bisulfit-Konversion zu simulieren und so die jeweilige Sequenz der Primer zu erhalten. Bei den *Reverse-Primern* wurden die Guanin- durch Adenin-Nukleotide ersetzt.

TTGTTTTTTTAGATTGGGATTCGATTATTTG(167233271)AATATGT
 TATTAGTTATATGGGTTTTGAATTTTAGAGTTGGTAG(167233315)GA
 GCGATTGTGAAAATAAATTTTTTAAAAATTTATTTTGTGTGGAGTGTGTG
 CGTGCGTTTTTTTATAG(167233384)TAGTTTGGGAGGAAGAAATAATG
 GAAATAGGGTTGAAT(167233421)TATTTTTTTTAAAGAGAAATAGGA
 AATTTTTTATTAAGGG

Detailed description: The diagram shows a DNA sequence with several features highlighted. Yellow arrows point to the start (G at position 167233271) and end (GAAT at position 167233421) of the sequence. Light blue highlights represent the outer-PCR-primers: TTTAGAGTTGGTAG (167233315) and GAAATAGGGTTGAAT (167233421). Light green highlights represent the inner-PCR-primers: TTTGAATTTTAGAGTTGGTAG (167233315) and TAGTTTGGGAGGAAGAAATAATG (167233384). Dark green and dark blue highlights show the overlap of these primers. Purple highlights mark CpG sites (C in CGATTATTT, C in CGTGCG, C in GCGATTGT, C in CGTTT, and C in GAAATAGGGTTGAAT). The sequence is presented in a single line with line breaks for readability.

Abbildung 14: Exemplarische Darstellung für die Auswahl der *Primer* anhand der in dieser Arbeit SCN9A2 genannten Sequenz des Gens SCN9A nach der Bisulfit-Konversion: Die gelben Pfeile markieren Anfang und Ende der Sequenz, hellblau hinterlegt finden sich die *outer-PCR-Primer*, hellgrün hinterlegt die *inner-PCR-Primer*. Diese überlappen sich, hier dunkelgrün und -blau dargestellt. Die Zahlen in den Klammern dahinter zeigen die entsprechende Position im Gen SCN9A aus den Daten des Genome Browser GRCh37/hg19 an. Lila markiert sind die Cytosine der CpG-Dinukleotide. Doppelt unterstrichen finden sich Anfang und Ende der untersuchten Sequenz.

Die sieben Sequenzabschnitte wurden mittels PCR-Verfahren amplifiziert, für die die Standard-Taq-Polymerase genutzt wurde, und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Überprüfung, ob die korrekten Sequenzen amplifiziert wurden, wurde zusätzlich zu den PCR-Proben auch ein 100 bp DNA-Leiter-Größenmarker auf das Gel aufgetragen, anhand dessen die Größe der amplifizierten Fragmente bestimmt werden konnte.

Mit Ausnahme der SC11A3-Region (exemplarisch in Abbildung 16 dargestellt) konnten alle *nested-PCRs* erfolgreich amplifiziert und reproduziert werden, wohingegen bei keiner der einfachen PCR-Amplifikationen entsprechende PCR-Amplifikationsprodukte der jeweiligen Größe nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 15). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Untersuchungen nur noch die folgenden Sequenzen eingeschlossen: SCN9A1, SCN9A2, SCN10A2 und SCN11A1.

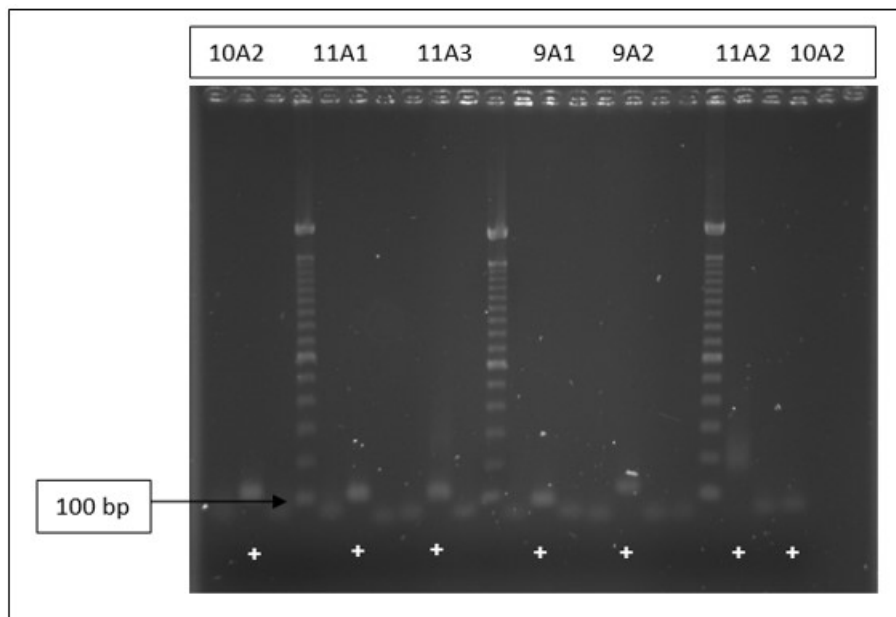


Abbildung 15: Bild der Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten und Bisulfit-konvertierten Plasma-DNA-Proben. Die DNA-Proben sind mit + gekennzeichnet, bei den nicht gekennzeichneten Proben handelt es sich um die genannten Negativ-Kontrollen, die nur den Master-Mix enthalten. Die Reihenfolge der Sequenzen lautet: SCN10A2, SCN11A1, SCN11A3, SCN9A1, SCN9A2, SCN11A2 und SCN10A2. Bei den letzten beiden Proben handelte es sich um die einfachen PCRs, welche sich hier als einzige nicht erfolgreich amplifiziert zeigten. Bei dem Gel handelte es sich um das o.g. 1,5 % Agarosegel. Zusätzlich zu den Proben wurde der DNA-Leiter-Größenmarker aufgetragen, die entsprechende 100 bp-ladder findet sich am linken Bildrand gekennzeichnet. Die Banden der *ladder* werden in 100er Schritten gezählt.

Zu jeder PCR-Probe wurde außerdem die jeweilige Negativ-Kontrolle sowohl der *outer*- als auch der *inner*-PCR auf das Gel aufgetragen, welche lediglich den entsprechenden Master-Mix enthielt.

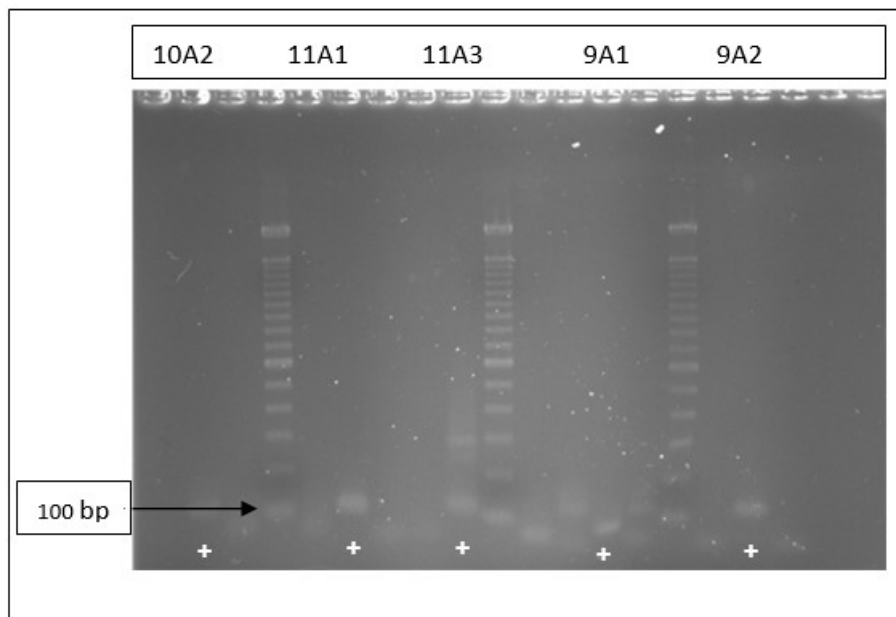


Abbildung 16: Bild der Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten und Bisulfit-konvertierten Plasma-DNA-Proben mit uneindeutigem Ergebnis für die Probe 11A3. Die DNA-Proben sind mit + gekennzeichnet, bei den nicht gekennzeichneten Proben handelt es sich um die entsprechende Position im Gen SCN9A aus den Daten des *Genome Browser* hg19 an. Lila markiert sind die Cytosine der CpG-Dinukleotide. Doppelt unterstrichen finden sich Anfang und Ende der untersuchten Sequenz.

5.2 PCR zur Amplifikation der Klone der Blutplasma-Proben

Die PCR-Amplifikate der o.g. vier Bisulfit-konvertierten DNA-Sequenzen der Gene SCN9A, SCN10A und SCN11A wurden nach der PCR-Amplifikation mittels spezifisch erstellter *Primer* in einen T-Vektor ligiert und in *E. coli*-Bakterien transformiert. Dabei diente die Blau-Weiß-Selektion zum Nachweis der eingebauten DNA-Sequenz (siehe Abschnitt 3.6.3 Blau-Weiß-Selektion). Es erfolgte daraufhin eine PCR mittels M13-*Primer*, welche die Zielsequenz nachweisen sollten und zur Amplifikation des Inserts des Vektors mit PCR-Produkten von nahezu der gleichen Größe dienten. Anhand der Größe der PCR-Produkte, welche in einer Gelelektrophorese bestimmt wurde, konnten die Klone, bei welchen die Klonierung korrekt verlaufen war, selektiert werden und deren PCR-Amplifikate weiter sequenziert werden. Die Größe des Plasmids ohne *Inserts* belief sich auf 236 bp. Waren die Klonierung und Transformation erfolgreich, so ergaben sich folgende Größen für die jeweiligen PCR-Produkte der Einzelklone: 307 bp für SCN9A1, 349 bp für SCN9A2, 340 bp für SCN10A2 und 341 bp für SCN11A1. In der folgenden Abbildung (Abbildung 17) ist exemplarisch ein Ausschnitt des Bildes einer Gelelektrophorese von SCN9A2 der Kontrolle K1 dargestellt.

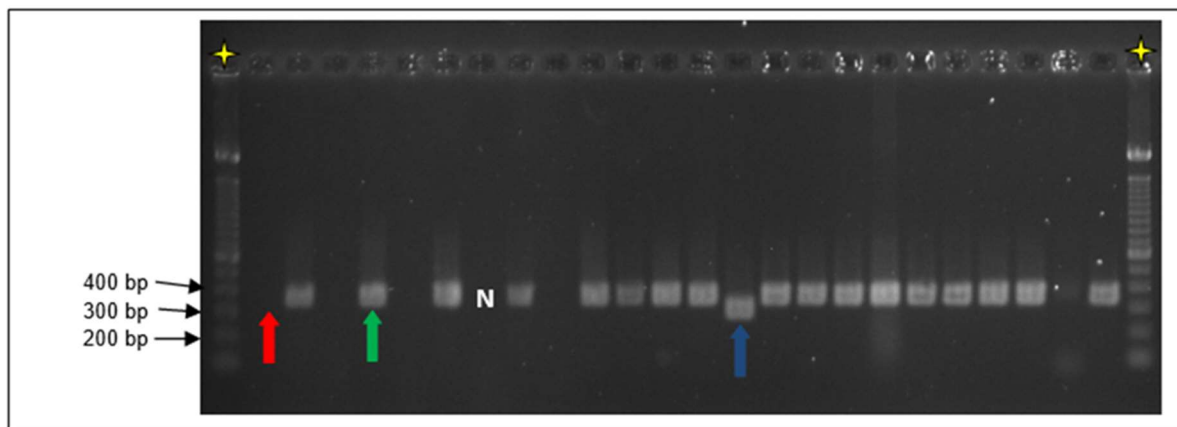


Abbildung 17: Exemplarischer Bildausschnitt einer Gelelektrophorese von SCN9A2 der Kontrolle K1. Genutzt wurde ein 1,5 % iges Agarosegel. Der 100 bp DNA-Leiter-Größenmarker wurde im Bild mit einem gelben Stern markiert. Die Größe der Banden des Größenmarkers sind am linken Bildrand aufgeführt. Waren Klonierung und Transformation erfolgreich so ergaben sich für SCN9A2 PCR-Amplifikate einer Größe von 349 bp. Ein solches wurde exemplarisch mit einem grünen Pfeil markiert. Mit einem roten Pfeil wurde exemplarisch ein nicht amplifizierter Einzelklon markiert, mit einem blauen Pfeil ein Plasmid ohne *Insert*. Das weiße N zeigt die Negativ-Kontrolle an.

Die folgende Übersicht (siehe Tabelle 21) führt für die Proben der Kontrollen (K1, K2 und K3) auf, welche Anzahl an Klonen bei der Blau-Weiß-Selektion das entsprechende Insert enthielten und daher selektiert wurden. Die Klonierung des Locus SCN11A1 brachte stets eine große Anzahl an Klonen hervor, bei welchen die Ligation des Inserts erfolgreich war. Die Loci SCN9A1 und SCN9A2 hingegen erforderten zum Teil Wiederholungen der Blau-Weiß-Selektion, um eine ausreichende Anzahl an weißen Klonen zu erhalten. Je Locus wurden mindestens 109 Klone selektiert und in der anschließenden M13-PCR amplifiziert. Für den Locus SCN11A1 wurden bei allen drei Kontrollen je über 200 Klone für die Amplifikation ausgewählt. Generell wurden je zwischen 100 und 300 Klone der Amplifikation mittels M13-PCR zugeführt, um schlussendlich in der Sanger-Sequenzierung eine Anzahl von je über 50 auswertbaren Sequenzen und somit ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis bezüglich des Methylierungsstatus zu erhalten.

In der M13-PCR-Amplifikation zeigten einige der selektierten Klone nicht das PCR-Produkt der bei erfolgreicher Ligation korrekten Größe, sodass diese für die nachfolgende Sequenzierungsreaktion nicht verwendet werden konnten. Vor allem bei dem Locus SCN9A2 zeigte sich bei allen Kontroll-Proben eine relativ große Anzahl nicht verwendbarer PCR-Proben. Der Locus SCN10A2 hingegen zeigte, abgesehen von der Probe K2, mit je 3 (K1) und 11 (K3) PCR-Proben ohne PCR-Amplifikationsprodukt der entsprechend korrekten Größe, eine sehr hohe Anzahl an für die Sequenzierungsreaktion verwertbaren PCR-Proben.

Im Rahmen der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wiesen die Sequenzen Unterschiede in der Qualität des *base callings* auf, d.h. die Eindeutigkeit der Zuordnung einer

Base zu einem Signal anhand der jeweiligen Kurvengipfel variierte. Die meisten Sequenzen wiesen diesbezüglich eine gute Qualität von über 80 % auf und ließen sich präzise auswerten, manche jedoch zeigten nur eine geringe Qualität von ca. 20-40 %, teils schlechter, sodass diese nicht ausgewertet werden konnten. Vor allem die Probe K3 wies im Verhältnis zu den anderen beiden Kontrollen eine große Anzahl an Sequenzen auf, die aufgrund ihrer geringen Qualität nicht ausgewertet werden konnten. Die Loci SCN9A1 und SCN9A2 zeigten in den Proben K2 und K3 je die größte Anzahl an nicht auswertbaren Sequenzen. Der Locus SCN10A2 hingegen zeigte in allen drei Kontroll-Proben eine gute Quote an verwertbaren Sequenzen, bei der Probe K2 waren sogar alle 88 Sequenzen von guter Qualität.

Tabelle 21: Übersicht über die Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion selektierten und daraufhin in der M13-PCR amplifizierten Klone, die Anzahl sequenzierter M13-PCR-Amplifikate und ausgewerteter Sequenzen für die Kontrollen K1, K2 und K3.

	9A1 K1	9A2 K1	10A2 K1	11A1 K1	9A1 K2	9A2 K2	10A2 K2	11A1 K2	9A1 K3	9A2 K3	10A2 K3	11A1 K3
selektiert & amplifiziert	109	193	156	279	156	156	170	264	150	186	146	228
sequenziert	78	121	153	203	124	94	88	166	98	90	135	204
auswertbar	70	119	146	195	114	82	88	161	69	73	128	197

Die entsprechenden Daten für die Blutplasma-Proben der Patienten (P1 und P2) finden sich in der nachfolgenden Übersicht (siehe Tabelle 22). Hier wurde der Locus SCN9A1 nicht mehr in die Untersuchungen mit einbezogen, da sich dieser in der Auswertung der Sequenzen nur gering methyliert bis vollständig unmethyliert zeigte (siehe Abschnitt 5.6).

Die Anzahl an Klonen, die bei der Blau-Weiß-Selektion das entsprechende *Insert* enthielten und daher selektiert wurden, betrug bei allen Loci beider Proben mindestens 182 (siehe Tabelle 22). Da der Locus SCN9A2 der Kontroll-Proben mehrfach der Blau-Weiß-Selektion unterzogen wurde und ferner die zumeist geringste Quote an schlussendlich auswertbaren Sequenzen zeigte, wurden bei den Proben P1 und P2 präventiv ebenfalls die Blau-Weiß Selektion wiederholt und deutlich mehr Klone der M13-PCR-Amplifikation zugeführt als bei den anderen beiden Loci (siehe Tabelle 22).

In der M13-PCR-Amplifikation zeigten auch bei den Patienten-Proben einige der selektierten Klone nicht das PCR-Produkt der bei erfolgreicher Ligation korrekten Größe, sodass diese für die nachfolgende Sequenzierreaktion nicht verwendet werden konnten. Dies zeigte sich vor allem wieder für den Locus SCN9A2 (siehe Tabelle 22). Die Loci SCN10A2 und

SCN11A1 hingegen zeigten je Probe eine ähnlich große Anzahl an PCR-Produkten der entsprechend korrekten Größe.

Im Rahmen der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse wiesen die Sequenzen der Patienten-Proben ebenfalls Unterschiede in der Qualität des *base callings* auf. Insgesamt zeigten die Sequenzen aller drei Loci bei beiden Patienten eine sehr gute Qualität. Es konnten maximal 12 (9A2 P1) nicht ausgewertet werden, deutlich weniger als bei den Kontroll-Proben, bei welchen maximal 29 (9A1 K3) eine zu geringe Qualität aufwiesen und nicht ausgewertet werden konnten (vgl. Tabelle 21 und 22). Der Locus SCN9A2 der Probe P1 wies hierbei die größte Anzahl an nicht auswertbaren Sequenzen auf.

Tabelle 22: Übersicht über die Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion selektierten und daraufhin in der M13-PCR amplifizierten Klone, die Anzahl sequenzierter M13-PCR-Amplifikate und ausgewerteter Sequenzen für die Patientenproben P1 und P2.

	9A1 P1	9A2 P1	10A2 P1	11A1 P1	9A1 P2	9A2 P2	10A2 P2	11A1 P2
selektiert & amplifiziert		444, davon amplifiziert: 337	192	182		384, davon amplifiziert: 368	192	192
sequenziert		126	150	146		140	136	140
auswertbar		114	150	143		137	134	136

5.3 Bestimmung der Effizienz der Bisulfit-Konversion

Die Bestimmung der Effizienz der Bisulfit-Konversion erfolgte, zur Prüfung, wie erfolgreich die Umwandlung der unmethylierten Cytosin-Nukleotide in die Thymin-Nukleotide war. Dies war nötig, um festzustellen, ob die Ergebnisse bezüglich des Methylierungsstatus der CpG-Stellen valide waren, oder die Ergebnisse durch in der Bisulfit-Konversion fehlerhafterweise nicht in Thymidin umgewandelte Cytosin-Nukleotide verfälscht wurden. Aus diesem Grund und, weil diese sowohl in methyliertem als auch in unmethyliertem Zustand vorliegen können, wurden die besagten CpG-Dinukleotide nicht in die Analyse miteingeschlossen. Analysiert wurden sämtliche Sequenzen aller Loci von jeder Blutplasma-Probe, die mittels des *Software-Programmes Sequencher™* Version 5.10.1 ausgewertet wurden. Die unterschiedlichen Genloci wiesen je eine unterschiedliche Anzahl an Positionen auf, an welchen die Konversion von Cytosin zu Thymin auftreten sollte. Bei SCN9A1 gab es 23 solcher Positionen, bei SCN9A2 gab es 13, bei SCN10A2 gab es 26 und bei SCN11A1 gab es 22 Positionen. Die Effizienz der Bisulfit-Konversion lag bei den Blutplasma-Kontroll-Proben bei mindestens 98,76 % (Probe K1, Locus SCN9A1), die restlichen Werte betrugen alle über 99 % (siehe

Abbildung 18). Bei den Patienten-Proben lag sie bei mindestens 99,48 % (Probe P2, Locus SCN10A2, siehe Abbildung 19). Für eine Methylierungsanalyse ist eine Umwandlungsrate von 95-98 % ausreichend (Warnecke et al., 2002). Somit zeigte sich sowohl bei den Kontroll-Proben als auch bei den Plasma-Patienten-Proben eine sehr gute und für die Methylierungsanalyse geeignete Effizienz der Bisulfit-Konversion. Es wurden jeweils nahezu alle Cytosin-Nukleotide in Thymin-Nukleotide umgewandelt. Daher ist bei den Ergebnissen der Methylierungsanalyse davon auszugehen, dass als unmethyliert gewertete Cytosine mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich unmethyliert vorliegen und nicht auf einer fehlerhaften Bisulfit-Konversion begründet sind.

Die Umwandlungseffizienz der Patientenproben der Hautstanz-Biopsien war, vermutlich aufgrund der geringeren Qualität der Sequenzen, nicht ermittelbar.

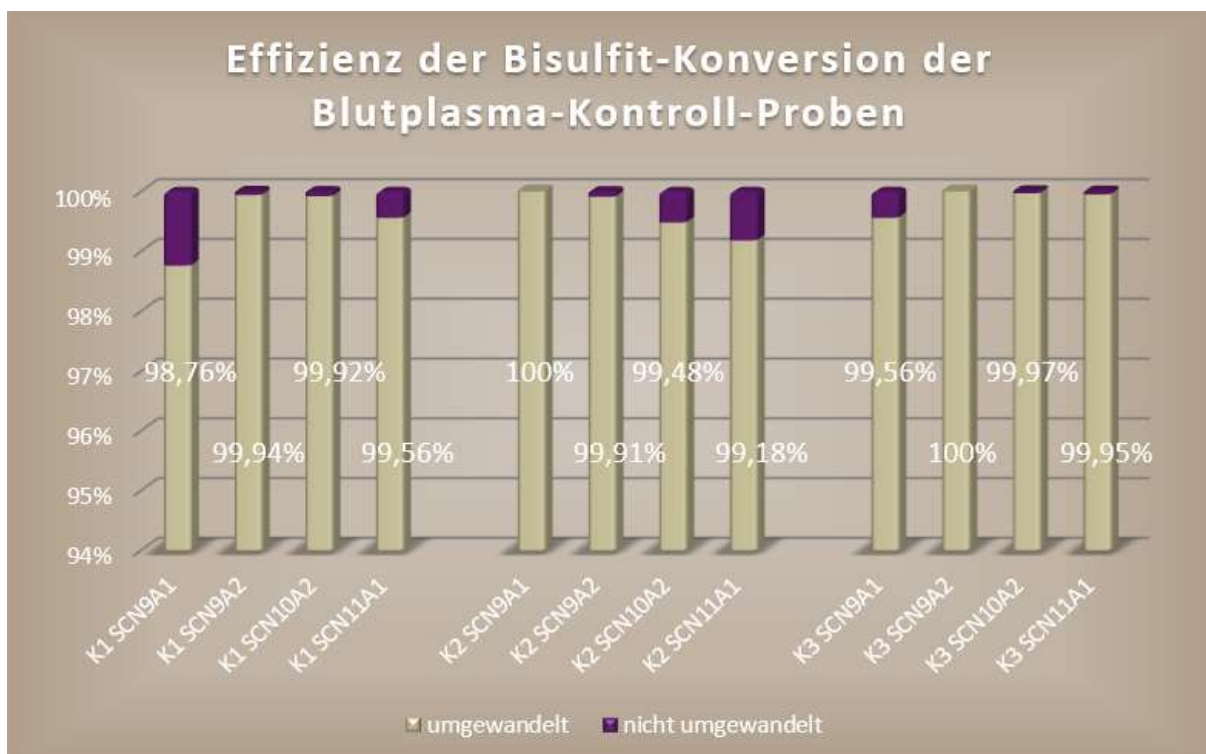


Abbildung 18: Effizienz der Bisulfit-Konversion der drei Blutplasma-Kontroll-Proben. Auf der Y-Achse findet sich in einer Skalierung von 94-100 % die Häufigkeit der umgewandelten Cytosin-Nukleotide in Prozent. Auf der X-Achse finden sich die Loci der drei Kontroll-Proben. In Beige dargestellt ist die Häufigkeit der erfolgreich umgewandelten Cytosin-Nukleotide in Prozent, welche auch auf den jeweiligen Balken beziffert ist, in Lila die der nicht erfolgreich umgewandelten Cytosin-Nukleotide.

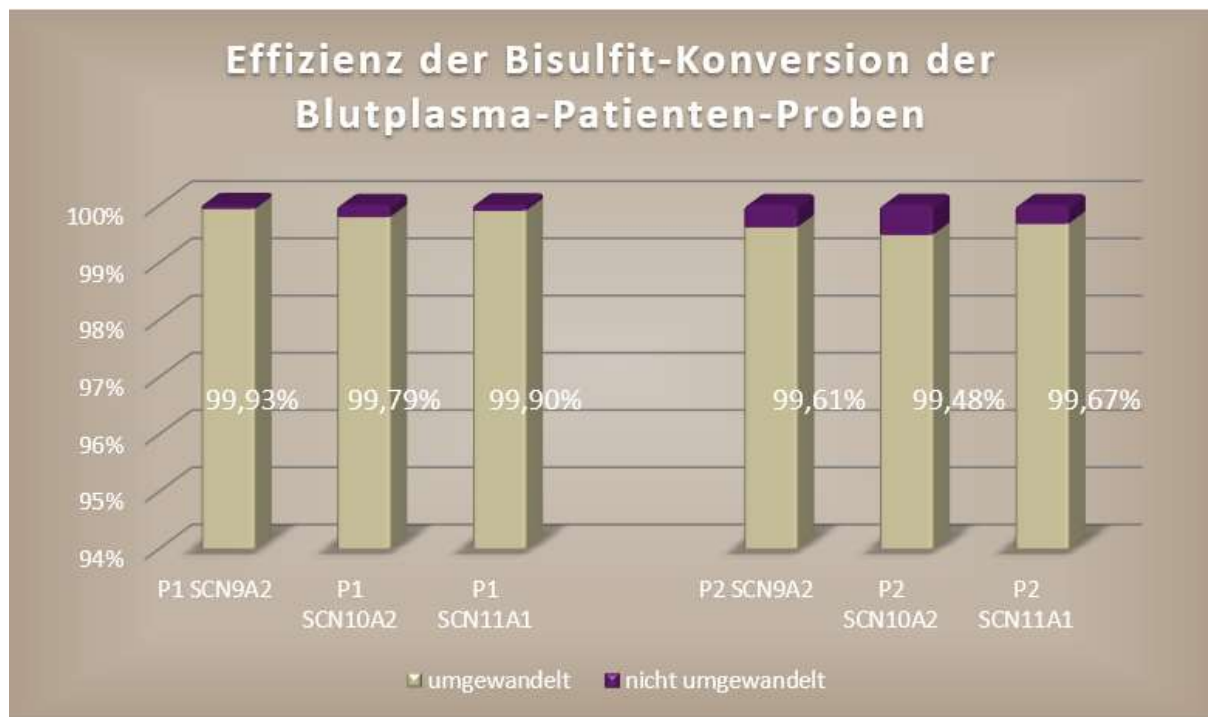


Abbildung 19: Effizienz der Bisulfit-Konversion der Blutplasma-Patientenproben. Auf der Y-Achse findet sich in einer Skalierung von 94-100 % die Häufigkeit der umgewandelten Cytosin-Nukleotide in Prozent. Auf der X-Achse finden sich die Loci der zwei Patienten-Proben. In Beige dargestellt ist die Häufigkeit der erfolgreich umgewandelten Cytosin-Nukleotide in Prozent, welche auch auf den jeweiligen Balken beziffert ist, in Lila die der nicht erfolgreich umgewandelten Cytosin-Nukleotide.

5.4 PCR zur Amplifikation der Klone der Biopsie-Proben

Die PCR-Amplifikation der Genloci anhand der Hautstanz-Biopsie-Proben (P1, P2 und P3) zeigte sich mit unterschiedlichen Taq-Polymerasen bzw. PCR-Kits erfolgreich. Allerdings war die Amplifikation der Loci SCN9A1 und SCN9A2 der Biopsie-Probe P3 mit keiner der genutzten Methoden möglich (siehe Abbildung 20).

Die zur PCR-Amplifikation der Biopsie-Proben genutzten Taq-Polymerasen waren zum einen die Standard-Taq-Polymerase, zum anderen das „KAPA Taq PCR Kit“ von Roche. Mittels des KAPA PCR Kits wurden die Genloci SCN9A1 und SCN9A2 der Probe P2 erfolgreich amplifiziert, die restlichen Genloci wurden mit der Standard-Taq-Polymerase amplifiziert. Zu Anfang wurde die PCR der Biopsie-Proben direkt mit der mittels des „EZ DNA Methylation-Direct™ Kits“ (Zymo) isolierten und anschließend Bisulfit-konvertierten DNA durchgeführt. Hierbei zeigte sich, auch nach wiederholten bezüglich der Temperatur und des Master-Mixes modifizierten Durchgängen, allerdings nur die PCR von SCN10A2 und SCN11A1 der Probe P2 Biopsie erfolgreich. Daher wurden die mittels des „EZ DNA Methylation-Direct™ Kits“ (Zymo) isolierten DNA-Proben schließlich noch einer Aufbereitung durch das „High Pure PCR Template Preparation Kits“ (Roche) unterzogen. Hiernach zeigten sich die PCR-Ergebnisse deutlich verbessert. Die Loci SCN9A1 und SCN9A2 von P2 waren mit der KAPA-

Taq-Polymerase und die Loci SCN10A2 und SCN11A1 der Biopsie-Proben P1 und P3 sowie die Loci SCN9A1 und SCN9A2 von P1 mittels der Standard-Taq-Polymerase erfolgreich amplifizierbar. Insgesamt gestaltete sich die PCR der Biopsie-Proben dennoch schwieriger als bei den Blutplasma-Proben und erforderte z.T. mehrere Durchgänge.

Für die PCR der Biopsie-Proben wurden die gleichen *Primer* wie bei der PCR der Blutplasma-Proben verwendet sowie auch das gleiche 1,5 % Agarosegel zur gelelektrophoretischen Auftrennung und auch der gleichen 100-bp-DNA-Leiter-Größenmarker.

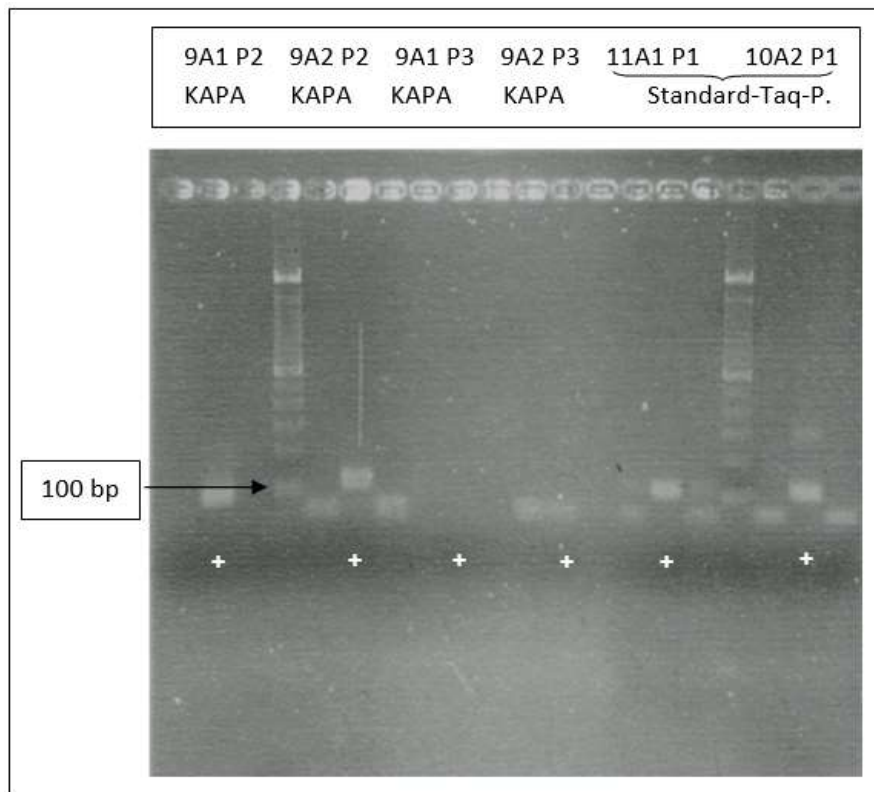


Abbildung 20: Bild der Gelelektrophorese der PCR-amplifizierten und Bisulfit-konvertierten Biopsie-Proben der Loci 9A1 P2 Biopsie, 9A2 P2 Biopsie, 9A1 P3 Biopsie, 9A2 P3 Biopsie, 11A1 P1 Biopsie und 10A2 P1 Biopsie. Die DNA-Proben sind mit + gekennzeichnet, bei den nicht gekennzeichneten Proben handelt es sich um die entsprechenden Negativ-Kontrollen, die nur den Master-Mix enthalten. Die Reihenfolge der Sequenzen ist der Beschriftung oberhalb des Gelbildes zu entnehmen. Die Loci 9A1 und 9A2 der Proben P2 und P3 Biopsie wurden jeweils mit dem KAPA-PCR-Kit amplifiziert, die Loci 11A1 und 10A2 der Probe P1 Biopsie mit der Standard-Taq-Polymerase. Positive Ergebnisse fanden sich bei den Loci 9A1 und 9A2 der Probe P2 Biopsie sowie den Loci 11A1 und 10A2 der Probe P1 Biopsie. Die beiden Loci der Probe P3 Biopsie zeigten kein entsprechendes PCR-Produkt. Bei dem Gel handelte es sich um das genannte 1,5 % ige Agarosegel. Zusätzlich zu den Proben aufgetragen wurde der DNA-Leiter-Größenmarker, die entsprechende 100 bp-ladder findet sich am linken Bildrand bezeichnet.

Die Übersicht (siehe Tabelle 23) dokumentiert die Anzahl der erfolgreich aus der Blau-Weiß-Selektion hervorgegangenen und amplifizierten Bakterienklone, der in der M13-PCR positiven Proben sowie der in der Sanger-Sequenzierung auswertbaren Sequenzen.

Es wurde je mindestens 92 selektierte Klone mittels der M13-PCR amplifiziert, bei dem Locus SCN9A1, dem Locus SCN9A2 und SCN11A2 der Probe P2 Biopsie wurden je 184 Klone amplifiziert (siehe Tabelle 23). Ähnlich zu den Blutplasma-Proben wurde hier eine etwas größere Anzahl an Klonen amplifiziert, damit jeweils ausreichend Sequenzen bei der Sequenzierung auswertbar waren. Die Loci SCN9A1 und SCN9A2 der Probe P2 Biopsie zeigten in der gelelektrophoretischen Analyse der M13-PCR die geringste Anzahl an PCR-Proben der korrekten Größe. Von den M13-PCR-Produkten wurden zur besseren Übersicht je 52 Amplifikate sequenziert, ausgenommen Locus SCN9A2 P2, da von diesem nur 48 PCR-Proben eine erfolgreiche Ligation zeigten.

Da die Sequenzen im Rahmen der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse Unterschiede in der Qualität des *base callings* aufwiesen, d.h. die Eindeutigkeit der Zuordnung einer Base zu einem Signal anhand der jeweiligen Kurvengipfel variierte, konnten jene mit einer zu schlechten Qualität nicht ausgewertet werden. Insgesamt waren je mindestens 38 Sequenzen auswertbar, ausgenommen der Sequenzen der Loci SCN9A1 und SCN9A2 der Probe P1 Biopsie, welche eine sehr schlechte Qualität zeigten und daher nicht auswertbar waren.

Tabelle 23: Übersicht über die Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion gepickten und daraufhin in der M13-PCR amplifizierten Klone, die Anzahl sequenzierter M13-PCR-Amplifikate und ausgewerteter Sequenzen für die Biopsieproben P1, P2 und P3.

	9A1 P1 B.	9A2 P1 B.	10A2 P1 B.	11A1 P1 B.	9A1 P2 B.	9A2 P2 B.	10A2 P2 B.	11A1 P2 B.	10A2 P3 B.	11A1 P3 B.
selektiert & amplifiziert	192, davon amplifiziert: 92	144, 92	192, 92	192, 92	192, 184	192, 184	192, 92	196, 184	96, 92	96, 92
sequenziert	52, von 67 Mögli- chen	52, von 57	52, von 63	52, von 82	52, von 65	48, von 48	52, von 83	52, von 166	52, von 72	52, von 84
auswertbar	Nicht auswertbar		41	38	50	46	51	52	42	52

5.5 Analysemöglichkeiten von DNA-Methylierung

Es gibt verschiedene Herangehensweisen an die Analyse von DNA-Methylierungen. Der gesamte Gehalt an DNA-Methylierung, auch *methylation content*, repräsentiert die quantitati-

ve Bestimmung des Methylierungsgrades der DNA einer Probe (Siegmund and Laird, 2002). Dieser spielt vor allem als molekularer Marker in der Karzinogenese und bei der Beurteilung von Tumorzellen eine Rolle. Des Weiteren können das Methylierungslevel sowie das Methylierungsmuster untersucht werden. Das Methylierungslevel beschreibt die Häufigkeit von Methylierungen an individuellen CpG-Dinukleotiden, ohne diese direkt in Kontext mit dem Methylierungsstatus benachbarter CpGs zu bringen. Die Analyse des Methylierungslevels wird u.a. zur Quantifizierung von Unterschieden in regulatorischen Sequenzen genutzt (Laird, 2003). Der Begriff Methylierungsmuster wird einerseits genutzt, um den komplexen Informationsgehalt bezüglich des Methylierungsstatus von multiplen miteinander verknüpften Genloci innerhalb eines DNA-Stranges zu beschreiben. Der Begriff bezieht sich aber häufiger auf das lineare Muster von verschiedenen CpG-Dinukleotiden von Bisulfit-konvertierten DNA geklonter Moleküle (Siegmund and Laird, 2002). Ebendies wird bei der Sequenzierung von Bisulfit-behandelten PCR-Amplifikaten genutzt, um detaillierte Informationen bezüglich der Verteilung von 5-Methylcytosin entlang der Sequenz eines DNA-Einzelstranges zu erhalten (Laird, 2003). Der Begriff „Methylierungsprofil“ beschreibt die (semi-/) quantitative Analyse von multiplen CpG-Dinukleotiden an verschiedenen Loci im Genom. Somit kann sowohl zu Methylierungsleveln als auch zu Methylierungsmustern ein Methylierungsprofil erstellt werden (Siegmund and Laird, 2002). Im Folgenden soll sowohl das Methylierungslevel als auch das Methylierungsmuster der Loci SCN9A1, SCN9A2, SCN10A2 und SCN11A1, einerseits der Kontrollen K1, K2 und K3 sowie andererseits der Patienten-Proben P1, P2 und auch der Biopsie-Proben P1, P2 und P3 untersucht werden. In Abbildung 21 findet sich eine schematische Darstellung des Methylierungsmusters, -levels sowie von deren Methylierungsprofilen.

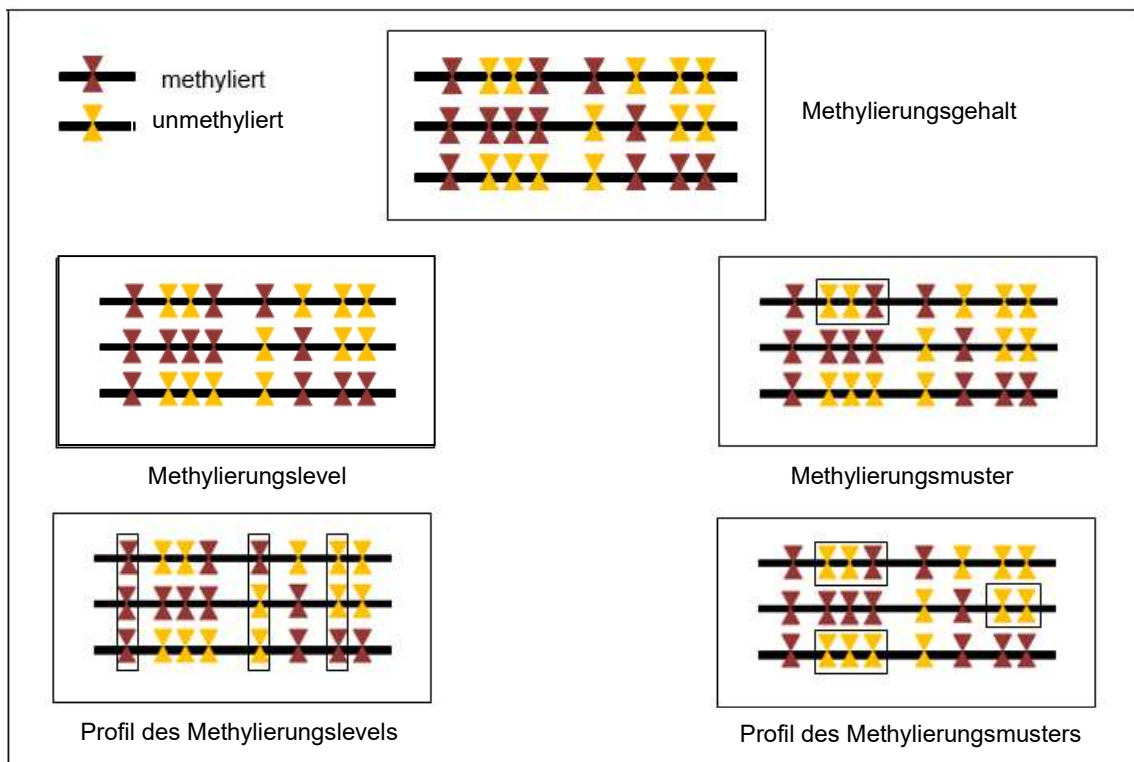


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Analysemöglichkeiten der DNA-Methylierung (Siegmund and Laird, 2002). Die schwarzen horizontalen Balken repräsentieren den DNA-Einzelstrang, die dunkelroten Symbole stehen für die methylierten CpG-Dinukleotide, die gelben Symbole für die unmethylierten CpGs. Der Methylierungsgehalt beschreibt den Gesamtgehalt an methylierten CpGs (Siegmund and Laird, 2002). Das Methylierungslevel bezieht sich auf den Durchschnitt des Status der DNA-Methylierung einer bestimmten CpG-Position. Das Methylierungsmuster beschreibt die Verteilung von methylierten CpGs innerhalb eines DNA-Stranges. Das Profil jeweils des Methylierungslevels und -musters steht für die quantitative Analyse von multiplen CpG-Dinukleotiden an verschiedenen Genloci (Laird, 2003).

5.6 Methylierungs-content

Der *Methylierungs-content* gibt den Gesamtgehalt der Methylierungsinformation an (Siegmund and Laird, 2002). Betrachtete man den *Methylierungs-content* aller potenziellen Methylierungsstellen aller Proben bei den jeweiligen Loci, so zeigte sich der Locus SCN9A1 mit 1,99 % deutlich geringer methyliert als die restlichen Loci (siehe Tabelle 24). Bei der ersten Einschätzung der Methylierungsverhältnisse anhand der Daten des *Methylierungscontents* konnte man bei SCN9A1 aufgrund des niedrigen Werts vermuten, dass dieser Locus bei den untersuchten Proben weitestgehend unmethyliert vorlag und die Eignung als epigenetischer Biomarker eher unwahrscheinlich ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, erfolgte die genauere Analyse der Methylierung anhand des Methylierungslevels (siehe Abschnitt 5.7). Der Locus SCN11A1 mit 92,92 % war am stärksten methyliert, dicht gefolgt von Locus SCN10A2 mit 90,56 % (siehe Tabelle 24). Zur Interpretation dieser Werte wurde zudem der *content* der Kontroll-Proben und der Plasma-Patienten-Proben der beiden Loci hinzugezogen. Anhand derer zeigten sich bei SCN10A2 die Plasma-Patienten-Proben in ihrer

Gesamtheit mit einem *content* von 98,71 % stärker methyliert als die Kontroll-Proben, welche einen *content* von 85,17 % aufwiesen (siehe Tabelle 24). Ein Verhältnis, das nicht der Hypothese dieser Arbeit entsprechen würde, welche besagt, dass bei an SFN erkrankten Patienten die C-Faser spezifischen Gene im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen hypomethyliert vorliegen sollten, da bei ihnen vermehrt C-Fasern untergehen und somit ihre DNA vermehrt als cfDNA in das Blut gelangt. Allerdings ist die Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben bei SCN10A2 nur eine Vermutung, welche sich aus den Daten des Methylierungs-*contents* ergibt und muss erst durch die Untersuchung von Methylierungslevel und -mustern geprüft werden. Erst dann lässt sich eine Aussage diesbezüglich tätigen. Zudem war bei der genaueren Betrachtung der einzelnen *contents* der drei Methylierungsstellen auffällig, dass der *content* der Plasma-Patienten-Proben an allen drei CpG-Positionen mit ca. 98 % auf einem ähnlichen Niveau war, wohingegen die Kontrollen erhebliche Schwankungen in ihrem *content* aufwiesen (siehe Tabelle 24). Letztere zeigten an der zweiten CpG-Stelle lediglich einen Wert von 59,94 %, an den anderen beiden Positionen jedoch 100 % (1. CpG-Stelle) und 95,58 % (2. CpG-Stelle) (siehe Tabelle 24). Auch hier war eine genauere Betrachtung interessant. Bei SCN11A1 hingegen zeigte sich bei der Analyse des *contents* der Kontroll-Proben und der Plasma-Patienten-Proben eine geringfügige Hypomethylierung der Patienten-Proben mit einem *content* von 91,04 % im Vergleich zu den Kontrollen mit 94,94 % (siehe Tabelle 24). Die Untersuchung von Methylierungsleveln und -mustern sollte klären, ob diese Hypomethylierung aussagekräftig ist. Der Locus SCN9A2, welcher mit einem *content* aller Proben von 60,95 % deutlich geringer methyliert war als SCN10A2 und 11A1, zeigte mit einem *content* von 63,35 % ebenfalls eine leichte Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben im Vergleich zu den Kontrollen (68,98 %) (siehe Tabelle 24). Auch hier waren Schwankungen in den Werten der *contents* der einzelnen Methylierungsstellen zu finden, sowohl bei den Plasma-Patienten- als auch bei den Kontroll-Proben. Es war jeweils die erste Methylierungsstelle am geringsten und die dritte am stärksten methyliert. Um näheren Aufschluss über die vorliegenden Methylierungsverhältnisse zu erhalten, war folglich auch bei diesem Locus eine intensivere Untersuchung durch Analyse der Methylierungslevel und -muster wichtig.

Bei der Betrachtung des *contents* der Biopsie-Proben fiel auf, dass diese sowohl bei SCN9A1 als auch bei SCN9A2 jeweils zu 0 % methyliert waren, wobei hier auch nur eine Biopsie-Probe untersucht wurde (P2 Biopsie) (siehe Tabelle 24). Die Loci SCN10A2 und SCN11A1 hingegen, welche bei allen drei Biopsie-Proben analysiert wurden, zeigten mit 87,81 % und 88,73 % einen sehr ähnlichen Wert, SCN11A1 war mit knapp 1 % mehr am stärksten methyliert (siehe Tabelle 24). Auch bei den Biopsie-Proben waren bei SCN10A2 größere Schwankungen in den Werten der *contents* der drei Methylierungsstellen auffällig.

Beim Vergleich des *contents* der Kontroll-Proben mit dem der Biopsie-Proben zeigten sich bei SCN9A1 die Kontrollen mit einem *content* von 2,38 % geringfügig stärker methyliert als die Biopsie-Proben mit 0 %. Beim Locus SCN9A2 wiesen die Kontrollen einen *content* von 68,98 % auf, die Plasma-Patienten-Proben zeigten hingegen mit 63,35 % einen etwas geringeren Wert und die Biopsie-Proben stachen erneut mit 0 % heraus. Der *content* der Kontrollen des Locus SCN10A2 betrug 85,17 % und war somit deutlich geringer als der der Plasma-Patienten-Proben mit 98,71 %. Die Biopsie-Proben zeigten hierbei mit 87,57 % einen Wert, der zwischen dem der Kontroll- und Plasma-Patienten-Proben rangierte, sich aber auf einem ähnlichen Niveau wie die Kontroll-Proben befand. Der *content* Kontrollen bei Locus SCN11A1 war mit 94,95 % geringfügig größer als der der Plasma-Patienten-Proben mit 91,04 %, während die Biopsie-Proben mit 88,73 % den geringsten *content* aufwiesen. Somit waren die Werte des *contents* der Biopsie-Proben nur bei SCN9A1 und SCN10A2 auf einem ähnlichen Niveau wie der der Proben aus dem Blutplasma der gesunden Kontroll-Personen. Die Biopsie-Proben dienten als Kontrolle und stellten den Methylierungsstatus der epidermalen und dermalen Zellen dar. Zur richtigen Einordnung der Ergebnisse war auch hier eine exaktere Analyse der Methylierungsverhältnisse anhand der Methylierungslevel und -muster nötig.

Tabelle 24: Übersicht über den Methylierungs-*content* aller Loci bei allen Proben, den Kontrollen, den Plasma-Patienten-Proben und den Biopsie-Proben sowie deren jeweiligen potenziellen Methylierungsstellen (MS).

	SCN9A1	SCN9A2	SCN10A2	SCN11A1
content aller Proben	1,99 %	60,95 %	90,56 %	92,92 %
content aller Kontrollen	2,38 %	68,98 %	85,17 %	94,94 %
content 1. MS der Kontrollen	0,79 %	49,64 %	100 %	/
content 2. MS der Kontrollen	3,57 %	72,26 %	59,94 %	/
content 3. MS der Kontrollen	2,78 %	85,04 %	95,58 %	/
content aller Patienten-Plasma-Proben	/	63,35 %	98,71 %	91,04 %
content 1. MS der Patienten-Plasma-Proben	/	52,19 %	98,59 %	/
content 2. MS der Patienten-Plasma-Proben	/	65,74 %	97,89 %	/
content 3. MS der Patienten-Plasma-Proben	/	72,11 %	99,65 %	/
content aller Biopsie-Proben	0 %	0 %	87,81 %	88,73 %
content 1. MS der Biopsie-Proben	0 %	0 %	86,57 %	/
content 2. MS der Biopsie-Proben	0 %	0 %	81,34 %	/
content 3. MS der Biopsie-Proben	0 %	0 %	95,52 %	/

5.7 Methylierungslevel und Profil der Methylierungslevel

Bei der Analyse des Methylierungslevels wird die Häufigkeit von Methylierungen an individuellen CpG-Dinukleotiden betrachtet, ohne diese direkt in Kontext mit dem Methylierungsstatus benachbarter CpGs zu bringen (Laird, 2003). Im Folgenden soll auf die einzelnen CpG-Stellen der jeweiligen Genloci SCN9A1, SCN9A2, SCN10A2 und SCN11A1 nacheinander eingegangen werden. Bei allen Loci gab es an jeder potenziellen Methylierungsstelle jeweils zwischen 1 und 11 Sequenzen, welche bezüglich des Methylierungsstatus kein eindeutiges Ergebnis zeigten. Das bedeutet, sie hatten weder eine Cytosin- noch eine Thymin-Base an der jeweiligen potenziellen Methylierungsstelle, sondern z.B. ein Adenin. Sie waren somit nicht klar methyliert und wurden im Rahmen der Auswertung des Methylierungslevels daher mit den unmethylierten Sequenzen zusammengelegt. Unter dem Abschnitt 5.8 findet sich eine genaue Aufschlüsselung über die jeweilige Anzahl dieser Sequenzen und der Proben sowie CpG-Stellen, an denen sie vorkamen.

Die Kontroll-Proben zeigten bei diesen Analysen das Methylierungslevel der untersuchten Genloci in der cfDNA gesunder Personen, die Plasma-Patienten-Proben hingegen zeigten das Methylierungslevel bei den an SFN erkrankten Patienten. Die Biopsie-Proben fungierten als Kontrolle und repräsentierten den Methylierungsstatus der epidermalen und dermalen Zellen. Es wurden 3 Biopsie-Proben von Patienten mit Small Fiber Neuropathie genutzt (P1, P2 und P3), dabei entsprach P1 der Plasma-Proben dem gleichen Patienten wie P2 der Biopsie-Proben, die Plasma-Probe P2 entsprach dem Patienten der Biopsie-Probe P3. Bei dem Patienten der Biopsie-Probe P1 wurde keine Analyse der Plasma-Probe durchgeführt, da hier die Diagnose der Small Fiber Neuropathie nicht gestellt werden konnte und keine reduzierte IENFD vorlag.

Der Locus SCN9A1 hatte drei CpG-Dinukleotide und somit drei potenzielle Methylierungsstellen. Diese wurden bei allen drei Kontrollen (K1, K2 und K3) und bei der Probe P2 der Biopsie-Proben untersucht.

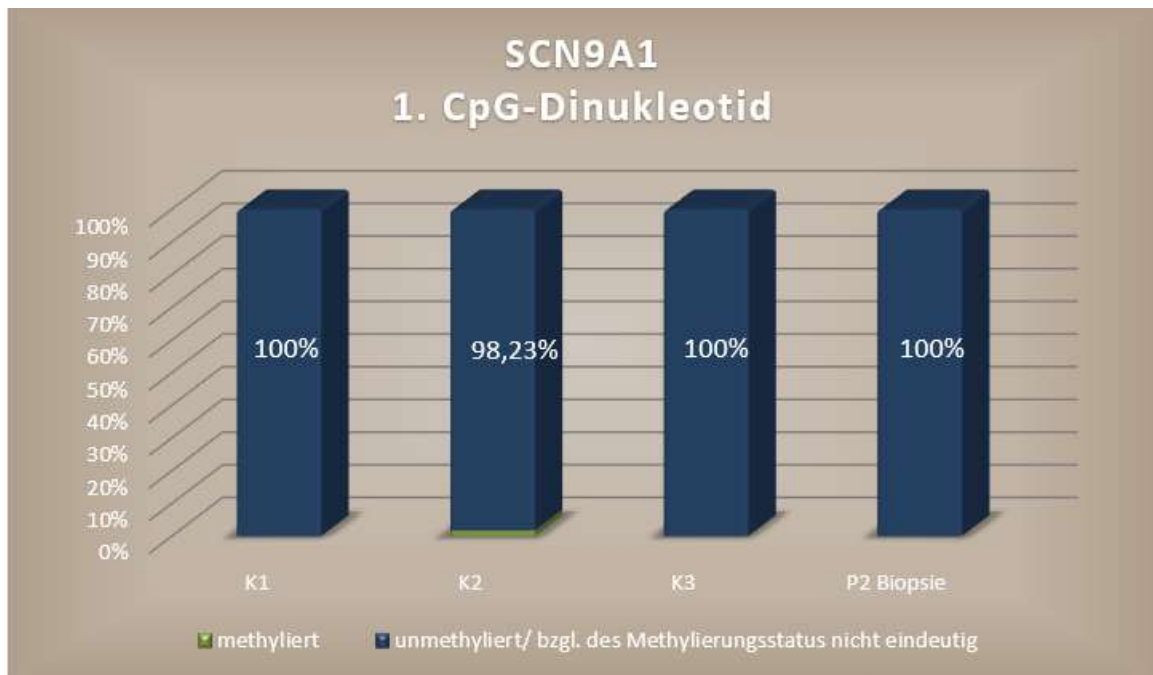


Abbildung 22: Übersicht über das Methylierungslevel des 1. CpG-Dinukleotids von SCN9A1 der Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (grüne Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Betrachtete man das erste CpG-Dinukleotid, so zeigte sich bei drei der vier Proben, K1, K3 und P2 Biopsie, keine der Sequenzen methyliert (siehe Abbildung 22). Lediglich bei der Probe K2 ergab sich ein Anteil von 1,77 % methylierten Sequenzen (siehe Abbildung 22). Das heißt, die erste potenzielle Methylierungsstelle zeigte sich sowohl bei den Kontrollen-Proben als auch bei der Biopsie-Probe P2, kaum bis gar nicht methyliert.

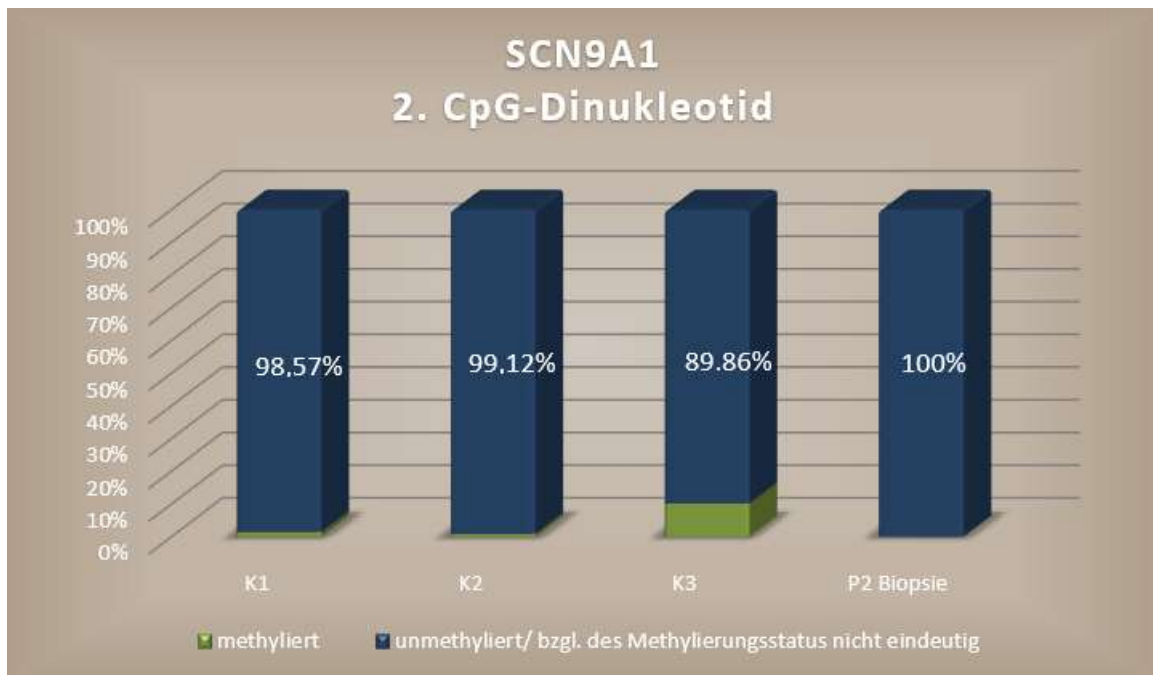


Abbildung 23: Übersicht über das Methylierungslevel des 2. CpG-Dinukleotids von SCN9A1 der Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (grüne Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Auch bei der Analyse des zweiten und dritten CpG-Dinukleotids von SCN9A1 zeigte sich nur ein geringer Anteil der untersuchten Sequenzen methyliert und die Biopsie-Probe P2 erneut gänzlich unmethyliert (siehe Abbildung 23 und 24). Den größten Anteil methylierter Sequenzen wies jeweils die Probe K3 mit je 10,14 % auf (siehe Abbildung 23 und 24).

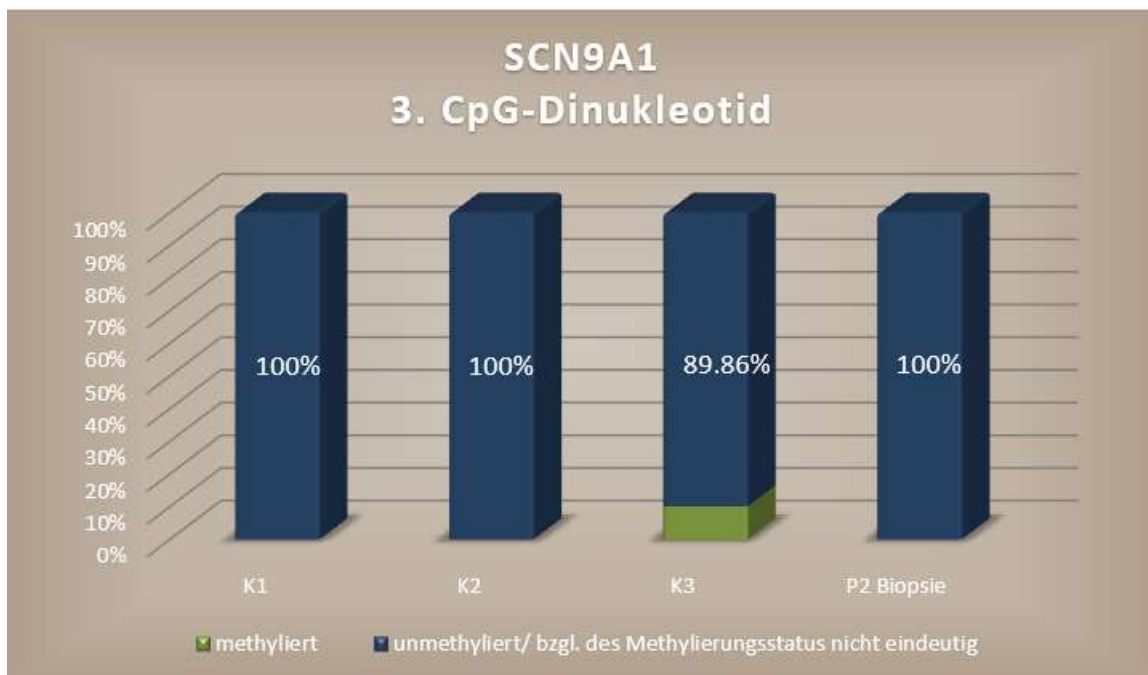


Abbildung 24: Übersicht über das Methylierungslevel des 3. CpG-Dinukleotids von SCN9A1 der Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (grüne Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Zusammenfassend lässt sich bei der Untersuchung des Methylierungslevels aller drei CpG-Dinukleotide von SCN9A1 feststellen, dass insgesamt nur eine geringe, bis keine Methylierung vorlag. Die einzige Ausnahme bildete die Kontrolle K3, die sich zwar an der ersten CpG-Stelle ebenfalls zu 100 % unmethyliert zeigte, aber an den letzten beiden CpG-Dinukleotiden je eine Methylierung von 10,14 % aufwies. Die Biopsie-Probe zeigte sich auch anhand der Informationen der Methylierungslevel-Analyse auf einem ähnlichen Niveau wie die Blutplasma-Kontroll-Proben. Da die Biopsie-Proben und die Blutplasma-Kontroll-Proben beide Kontrollen darstellen, entsprach dies der initialen Erwartung, dass sich diese annähern sollten. Dies war zudem mit den Ergebnissen der Untersuchung des Methylierungs-*contents* übereinstimmend.

Da sich schon bei den Kontroll-Proben nur eine sehr geringe bis keine Methylierung zeigte, wurde der Locus SCN9A1 nicht mehr in die Untersuchungen der Plasma-Patienten-Proben mit einbezogen. Eine relevante Hypomethylierung dieser im Vergleich zu den Kontrollen war nicht mehr möglich. Dies hätte nach der der aufgestellten Hypothese und bei einem geeigneten epigenetischen Biomarker jedoch gegeben sein sollen.

Der Locus SCN9A2 hatte ebenfalls drei CpG-Dinukleotide und somit ebenfalls drei potenzielle Methylierungsstellen. Diese wurden bei allen drei Kontrollen (K1, K2 und K3), bei den Blutplasma-Proben P1 und P2 sowie bei der Probe P2 der Biopsie-Proben untersucht.

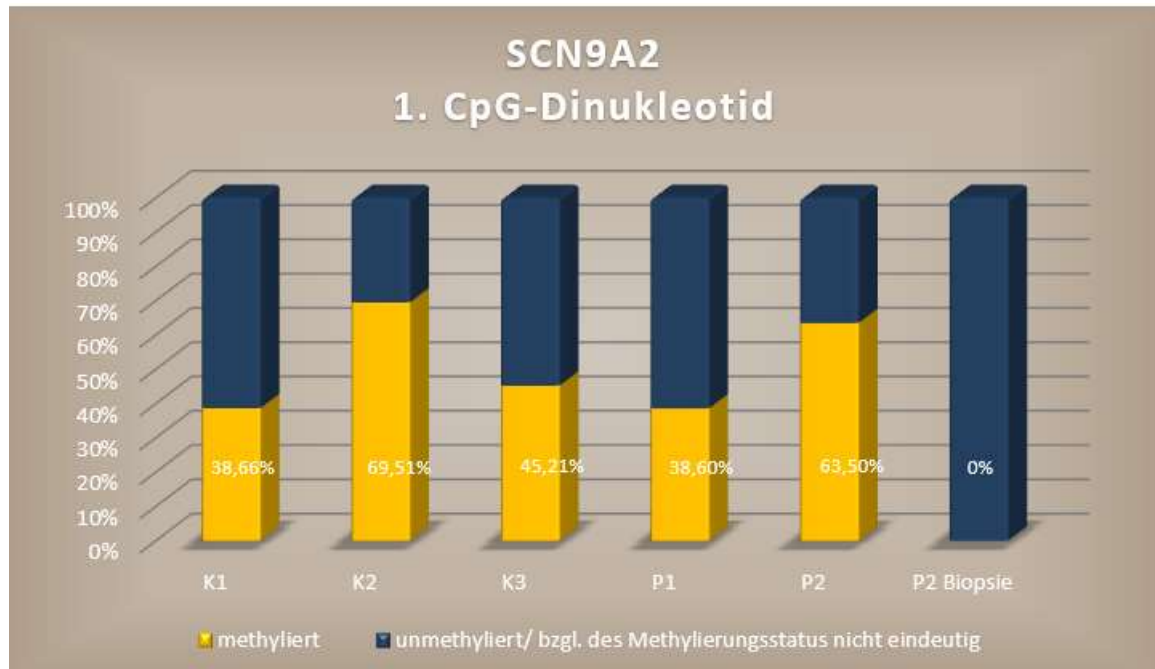


Abbildung 25: Übersicht über das Methylierungslevel des 1. CpG-Dinukleotids von SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (gelbe Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei Betrachtung des ersten CpG-Dinukleotids zeigte sich P2 der Biopsie-Proben vollständig unmethyliert und bildete somit einen starken Kontrast zu den restlichen Proben (siehe Abbildung 25). Auch bei den anderen beiden CpG-Positionen des Locus SCN9A2 war die Biopsie-Probe immer zu 100 % unmethyliert. Dies stand im Einklang zu den Informationen, die aus der Untersuchung des Methylierungs-*contents* gewonnen wurden. Insgesamt war jedoch in beiden Analysen auffällig, dass sie sich, obwohl sie ebenfalls eine Kontrolle darstellte, am ganzen Locus stark von den drei Blutplasma-Kontrollen unterschied.

Die Kontroll-Proben wiesen an der ersten CpG-Stelle von SCN9A2 eine deutliche *Heterogenität* in ihren Methylierungsleveln auf. Am stärksten methyliert zeigte sich die Probe K2 mit 69,51 %, welche von allen Proben das höchste Methylierungslevel aufwies, am geringsten methyliert war die Probe K1 mit 38,66 % (siehe Abbildung 25). Die Plasma-Patienten-Proben zeigten ebenfalls einen starken Unterschied in ihrem Methylierungslevel. So war die Probe P1 mit 38,60 % von allen Proben am geringsten methyliert, jedoch auf einem ähnlichen Level

wie die Probe K1 (siehe Abbildung 25). Die Probe P2 hingegen zeigte sich stark methyliert (63,50 %) und ähnelte in ihrem Methylierungslevel somit der Probe K2 (siehe Abbildung 25).

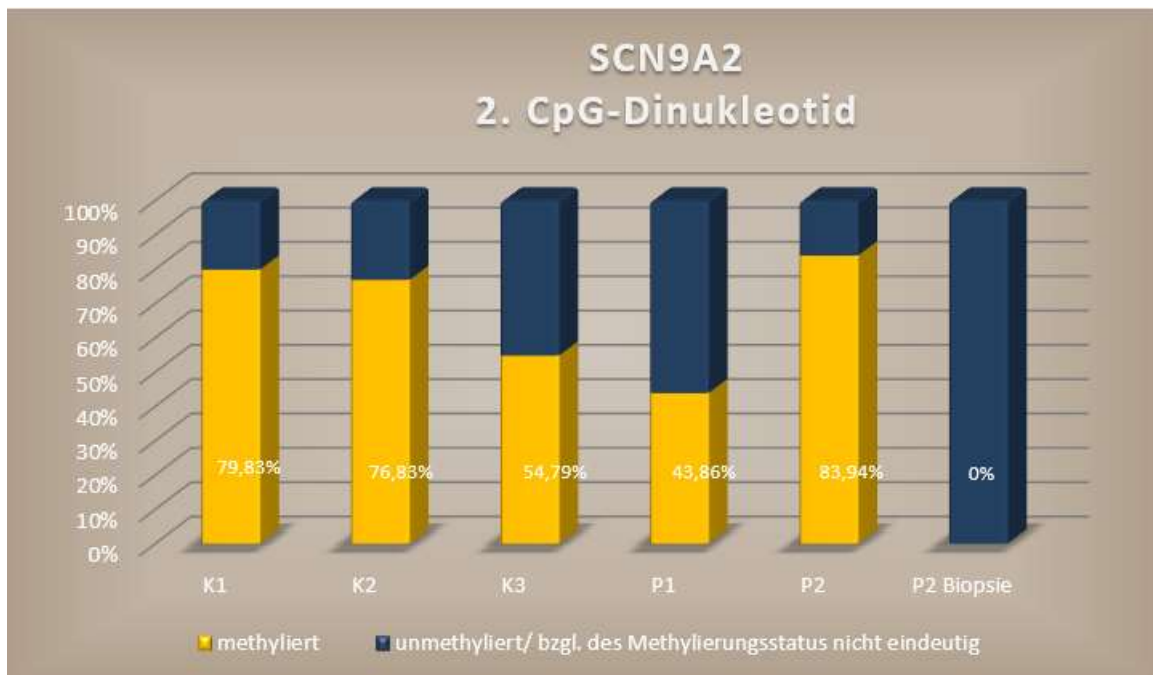


Abbildung 26: Übersicht über das Methylierungslevel des 2. CpG-Dinukleotids von SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (gelbe Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei der Analyse des zweiten CpG-Dinukleotids des Locus SCN9A2 wies die Probe P1, abgesehen von der gänzlich unmethylierten Probe P2 Biopsie, mit 43,86 % erneut den deutlich geringsten Anteil methylierter Sequenzen auf (siehe Abbildung 26). Die Probe P2 hingegen war mit 83,94 % von allen Proben am stärksten methyliert, sodass sich wieder ein großer Unterschied in der Methylierung der beiden Plasma-Patienten-Proben zeigte (siehe Abbildung 26). Die Kontroll-Proben K1 (79,83 %) und K2 (76,83 %) waren beide eher stark methyliert und zeigten sich mit der Probe P2 auf einem ähnlichen Methylierungslevel. Die Kontroll-Probe K3 (54,79 %) war jedoch deutlich geringer und nur um ca. 11 % stärker methyliert als die Probe P1 (siehe Abbildung 16). Somit zeigte sich mit P1 bei einer der beiden Plasma-Patienten-Proben dieser CpG-Position, konträr zu SCN9A1, ein deutlicher Unterschied zu den Kontroll-Proben. Dies war bei der ersten CpG-Position von SCN9A2 ähnlich, ebenfalls die Probe P1 der Plasma-Patienten-Proben betreffend, aber wesentlich geringer ausgeprägt.

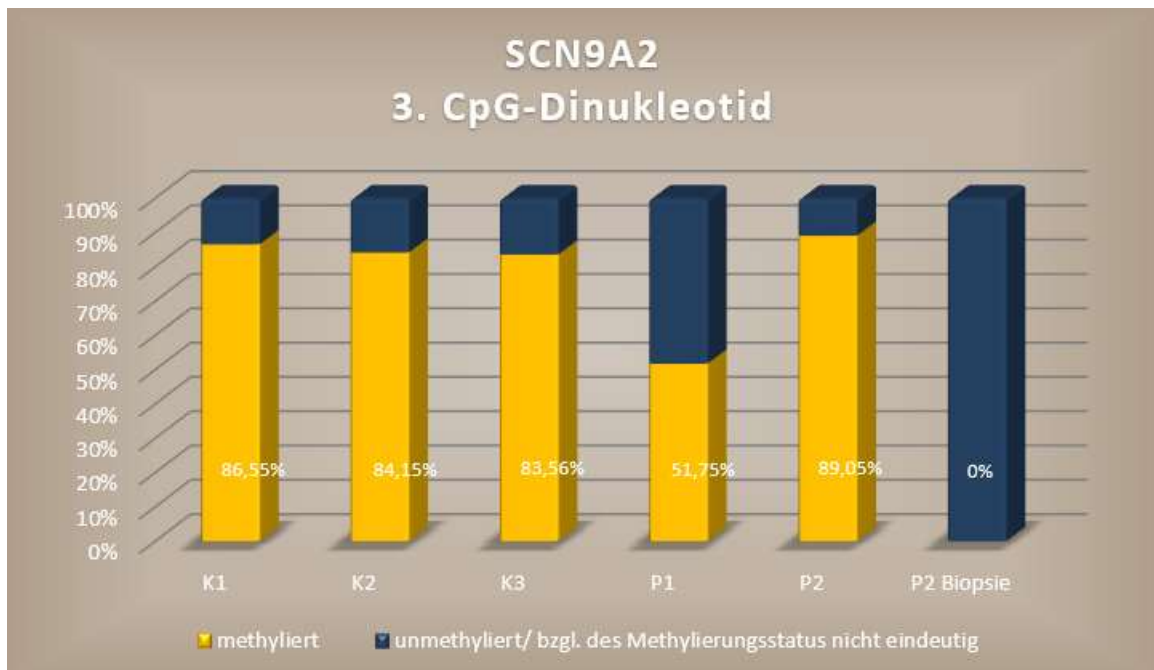


Abbildung 27: Übersicht über das Methylierungslevel des 3. CpG-Dinukleotids von SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (gelbe Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei der Betrachtung des dritten CpG-Dinukleotids von SCN9A2 war, ähnlich dem Methylierungslevel der zweiten CpG-Stelle, P1 mit 51,75 % wieder die Probe mit dem geringsten Anteil methylierter Sequenzen (siehe Abbildung 27). Zudem zeigte sich erneut ein deutlicher Unterschied in der Methylierung der beiden Plasma-Patienten-Proben, da die Probe P2 wieder, hier mit 89,05 %, am stärksten methyliert war (siehe Abbildung 27). Die Kontroll-Proben waren ebenfalls sehr stark methyliert und zeigten sich alle mit Werten zwischen 83,56 % und 86,55 % mit P2 auf einem annähernd gleichen Methylierungslevel (siehe Abbildung 27). Wie bei der zweiten CpG-Position, ließ sich an dieser Stelle ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen der Plasma-Patienten-Probe P1 im Vergleich zu den Kontroll-Proben feststellen. Der Unterschied war hier von allen drei CpG-Positionen am auffälligsten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Locus SCN9A2 an allen drei CpG-Stellen deutlich stärker methyliert zeigte als der Locus SCN9A1. Die Proben K1, K2 und P2 zeigten an den letzten beiden CpG-Stellen je einen Anteil von über 76 % methylierter Sequenzen. Die Probe P2 war zudem bei den letzten beiden CpG-Dinukleotiden die am stärksten methylierte Probe und unterschied sich somit deutlich von der Probe P1. Die Probe P1 zeigte an allen drei CpG-Dinukleotiden den jeweils geringsten Anteil methylierter Sequenzen, ausgenommen der Biopsie-Probe, und wies damit vor allem an den beiden letzten CpG-Positionen

einen deutlichen Unterschied zu den stärker methylierten Kontrollen auf. Dieser Unterschied betrug bei der zweiten CpG-Position mindestens 10,93 % und bei der dritten CpG-Stelle mindestens 31,81 %. Der Unterschied zwischen den Kontroll-Proben und der Plasma-Patienten-Probe P1 entsprach somit einer Hypomethylierung dieser Patienten-Probe. Das stand somit im Einklang zu der eingangs in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese, dass sich bei an SFN erkrankten Patienten aufgrund des Niedergangs von C-Fasern vermehrt C-Faser DNA im Blut findet und somit bei diesen im Vergleich zu gesunden Kontroll-Personen eine Hypomethylierung C-Faser-spezifischer Gene zu erwarten wäre. Die Biopsie-Probe war bei SCN9A2 stets vollständig unmethyliert, was den Informationen entsprach, die bereits in der Analyse des Methylierungs-contents gewonnen wurden. Dies stand allerdings auch im Kontrast zu der initialen Erwartung, dass sie sich als weitere Kontrolle den Werten der drei Blut-plasma-Kontrollen annähern sollte.

Der Locus SCN10A2 hatte ebenfalls drei CpG-Dinukleotide und somit auch drei potenzielle Methylierungsstellen. Diese wurden bei allen drei Kontrollen (K1, K2 und K3), bei den Proben P1 und P2 sowie bei allen drei Biopsie-Proben (P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie) untersucht. Dieser Locus und der Locus SCN11A1 waren somit die einzigen beiden Loci, die bei allen verfügbaren Proben untersucht werden konnten.

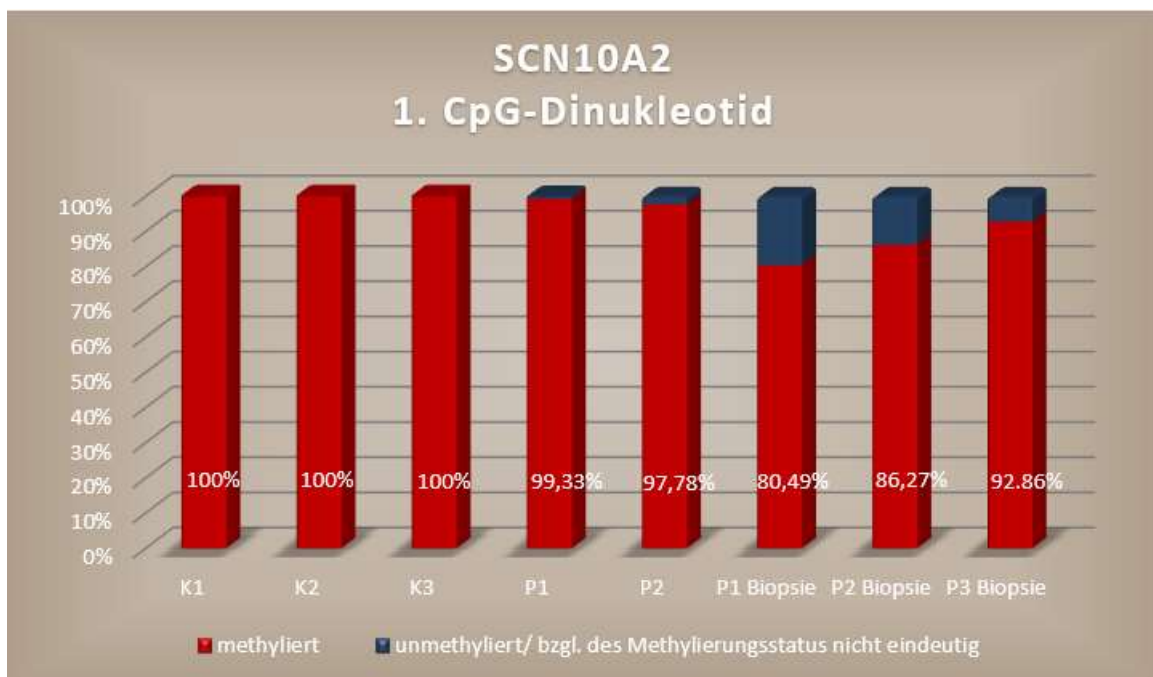


Abbildung 28: Übersicht über das Methylierungslevel des 1. CpG-Dinukleotids von SCN10A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (rote Balkenanteile) an

der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei Betrachtung des ersten CpG-Dinukleotids von SCN10A2 war auf den ersten Blick ein insgesamt hoher Anteil methylierter Sequenzen auffällig (siehe Abbildung 28). Die Kontroll-Proben waren mit je 100 % auf dem gleichen Methylierungslevel. Die Plasma-Patienten-Proben zeigten sich im Vergleich dazu nur geringfügig weniger methyliert, P1 um 0,67 % und P2 um 2,22 %. Dies war anhand der Informationen aus der Analyse des Methylierungs-*contents*, bei welchem die Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen hypermethyliert waren, nicht ersichtlich und trat erst bei der Untersuchung der Methylierungslevel zu Tage. Von allen Proben wies P1 Biopsie mit 80,49 % den geringsten Anteil methylierter Sequenzen auf. Generell zeigten sich an diesem CpG-Dinukleotid alle Biopsie-Proben geringer methyliert als die restlichen Proben (siehe Abbildung 28). Dies entsprach nicht der Erwartung, dass sich die Biopsie-Proben, welche als weitere Kontrolle fungierten, den Werten der Kontroll-Proben aus dem Blutplasma annähern sollten. Durch die Ergebnisse des Methylierungs-*contents* war zwar eine Annäherung der Proben vermutet worden, durch die Analyse der Methylierungslevel konnte dies aber nicht bestätigt werden.

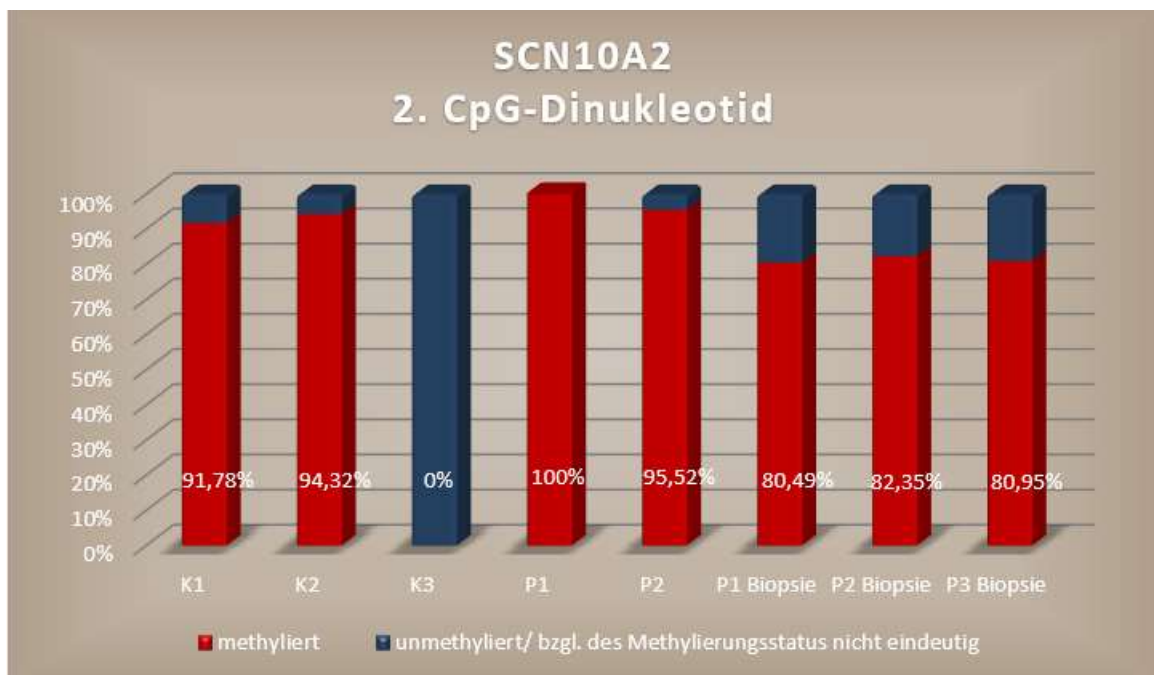


Abbildung 29: Übersicht über das Methylierungslevel des 2. CpG-Dinukleotids von SCN10A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (rote Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei der Analyse des zweiten CpG-Dinukleotids des Locus SCN10A2 fiel ebenfalls eine starke Methylierung auf, auch wenn diese insgesamt geringer ausfiel als bei der ersten CpG-Position (siehe Abbildung 29). Markant war hierbei, dass die Probe K3 gegensätzlich zu der ersten CpG-Stelle vollständig unmethyliert war (siehe Abbildung 29). Die Plasma-Patienten-Proben zeigten sich hier mit 100 % methylierten Sequenzen bei P1 und 95,52 % bei P2 sogar etwas stärker methyliert als die Kontroll-Proben. Die Biopsie-Proben waren, wie bei der ersten CpG-Position, deutlich geringer methyliert als die restlichen Proben, ausgenommen die gänzlich unmethylierte Probe K3 (siehe Abbildung 29). Es fand sich damit an dieser Stelle keine Annäherung der Werte von Biopsie- und Blutplasma-Proben. Allerdings erklärte sich durch die 0 % Methylierung der Kontrolle K3, der Wert für den Methylierungs-*content* der Kontroll-Proben und somit auch, warum laut der Informationen aus der Analyse des *contents* die Biopsie-Proben und die Kontroll-Proben aus dem Blutplasma auf einem ähnlichen Methylierungs-Niveau waren. Der 0 % Wert bei K3 führte zu einer Verzerrung des Werts des *contents* der Blutplasma-Kontrollen.

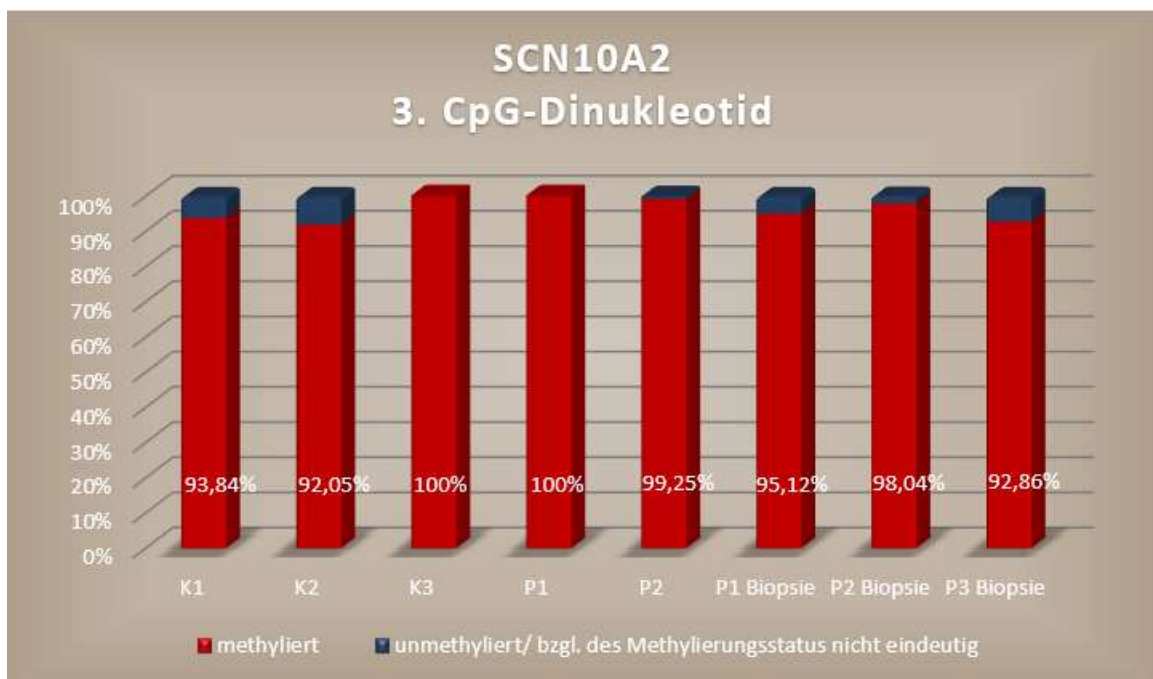


Abbildung 30: Übersicht über das Methylierungslevel des 3. CpG-Dinukleotids von SCN10A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (blaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (rote Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei Untersuchung des dritten CpG-Dinukleotids des Locus SCN10A2 zeigte sich dieses von allen drei CpG-Stellen am stärksten methyliert (siehe Abbildung 30). Auch hier fanden sich,

ähnlich zu der zweiten CpG-Position, die Plasma-Patienten-Proben mit 100 % (P1) und 99,25 % (P2) eher stärker methyliert vor als die Kontroll-Proben, welche zu 93,84 % (K1), 92,05 % (K2) und 100 % (K3) methyliert waren (siehe Abbildung 30). Zudem zeigte sich hier im Gegensatz zu den anderen beiden Methylierungsstellen kein starker Unterschied in der Methylierung der Biopsie-Proben im Vergleich zu den Plasma-Kontroll-Proben (siehe Abbildung 30).

Zusammenfassend war festzustellen, dass der Locus SCN10A2 insgesamt an allen drei potenziellen Methylierungsstellen eine deutlich stärkere Methylierung als die Loci SCN9A1 und SCN9A2 aufwies. Die Probe K3 zeigte an diesem Locus eine markante Verteilung der Methylierung, da sie an der ersten und an der letzten CpG-Position zu je 100 % und an der zweiten CpG-Position zu 0 % methyliert war. Die Plasma-Patienten-Proben waren an der ersten CpG-Stelle nur geringfügig weniger stark methyliert als die Kontroll-Proben und an den anderen beiden CpG-Positionen sogar eher stärker methyliert. Eine laut Hypothese dieser Arbeit vermutete Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben im Vergleich zu den Kontrollen war somit nicht gegeben. Die Biopsie-Proben, die als Kontrolle den Methylierungsstatus des epidermalen und dermalen Gewebes abbildeten, waren an diesem Genlocus, v.a. an den ersten beiden CpG-Stellen, deutlich geringer methyliert als die drei Kontroll-Proben, insbesondere die Probe P1 Biopsie. Lediglich bei der dritten CpG-Position waren die Biopsie-Proben mit den Kontroll-Proben auf einem ähnlichen Niveau.

Der Locus SCN11A1 hatte als einziger nur ein CpG-Dinukleotid und somit auch nur eine potenzielle Methylierungsstelle. Diese wurde bei allen drei Kontrollen (K1, K2 und K3), bei den Proben P1 und P2 sowie bei allen drei Biopsie-Proben (P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie) untersucht. Das heißt auch hier wurde der Locus, bei allen verfügbaren Proben untersucht.



Abbildung 31: Übersicht über das Methylierungslevel des CpG-Dinukleotids von SCN11A1 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie. Die Y-Achse des Balkendiagramms zeigt die Prozentverteilung auf einer Skala von 0-100. Die X-Achse präsentiert die Proben mit ihren jeweiligen Anteilen an unmethylierten/ bezüglich des Methylierungsstatus nicht eindeutigen (dunkelblaue Balkenanteile) sowie methylierten Sequenzen (hellblaue Balkenanteile) an der Gesamtanzahl der Proben. Die exakten Daten der methylierten Anteile in Prozent stehen zusätzlich in weißer Schrift auf den Balken der Balkendiagramme.

Bei der Analyse dieses CpG-Dinukleotids stach eine starke Methylierung hervor (siehe Abbildung 31). Die Kontroll-Proben waren mit mindestens 91,79 % (K1) durchgängig sehr stark methyliert, die Probe K3 wies dabei mit 100 % die stärkste Methylierung auf (siehe Abbildung 31). Die Plasma-Patienten-Proben zeigten hingegen erneut einen deutlichen Unterschied in ihrem Methylierungslevel. So war die Probe P1 mit 85,31 % von allen Proben die am geringsten methylierte, die Probe P2 jedoch war mit 97,06 % die am zweitstärksten methylierte Probe und zeigte sich wieder auf einem annähernd gleichen Methylierungslevel wie die Kontroll-Proben (siehe Abbildung 31). Ein deutlicher Unterschied von mindestens 6,48 % bis maximal 14,69 % war beim Vergleich der Plasma-Patienten-Probe P1 zu den Kontrollen zu erkennen. Somit zeigte sich eine Hypomethylierung dieser Plasma-Patienten-Probe verglichen mit den Kontroll-Proben, was der Hypothese dieser Arbeit entsprach und zudem die Ergebnisse des Methylierungs-*contents* von SCN11A1 bestätigte. Durch die hohe Methylierung der Probe P2 erschien in der Analyse des Methylierungs-*contents* die Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben (P1 betreffend) jedoch geringer, als sie tatsächlich war, was erst durch die Level-Analyse ersichtlich wurde.

Die Biopsie-Proben wiesen ein Methylierungslevel auf, das mit Werten von 88,47 % (P2 Biopsie), 88,46 % (P3 Biopsie) und 89,47 % (P1 Biopsie) zwischen dem der Plasma-Patienten-

Proben und dem der Kontrollen rangierte (siehe Abbildung 31). Sie zeigten nur einen geringfügigen Unterschied von 2,32 % und 4,09 % zu den Kontrollen K1 und K2. Die Probe K3 wies mit 100 % einen extremen Wert auf und war bis zu 11,54 % stärker methyliert als die Biopsie-Proben. Diese Kontrolle zeigte schon bei SCN10A2 extreme Werte und stach auch bei SCN9A1 durch von den anderen beiden Kontroll-Proben abweichende Werte hervor. Daher wurde bezüglich des Verhältnisses der Biopsie-Proben zu den Kontrollen an diesem Locus der Fokus auf die beiden Proben K1 und K2 gelegt. Verglichen mit diesen zeigte sich eine Annäherung der Werte der Biopsie-Proben an die Kontrollen. Damit entsprachen die Biopsie-Proben hier der Erwartung, dass sie als weitere Kontrollen Methylierungswerte auf einem ähnlichen Niveau wie die Blutplasma-Kontrollen aufweisen sollten. Diese Ergebnisse stimmten weitestgehend mit jenen aus der Analyse des Methylierungs-*contents* überein. Dieser zeigte jedoch keine deutliche Annäherung der Biopsie-Proben an die Kontrollen, da deren *content* durch den extremen Wert von K3 (100 %) nach oben verzerrt wurde.

Zusammengefasst ließen sich folgende Tendenzen erkennen: der Locus SCN9A1 war nur gering bis gar nicht methyliert, einzig die Probe K3 wies bei den letzten beiden CpG-Dinukleotiden mit 10,14 % eine abweichende Methylierung auf. Da sich schon bei den Kontroll-Proben an diesem Genlocus nur eine sehr geringe, bis keine Methylierung zeigte, wurde SCN9A1 bei den Plasma-Patienten-Proben nicht mehr untersucht. Denn eine relevante Hypomethylierung dieser im Vergleich zu den Kontrollen war nicht zu erwarten. Dies widersprach der eingangs aufgestellten Hypothese und hätte zudem bei einem geeigneten epigenetischen Biomarker gegeben sein müssen, war hier jedoch nicht möglich. Die Biopsie-Probe zeigte sich bei SCN9A1 auf einem ähnlichen Level, wie die restlichen drei Kontrollen, was den Informationen aus der Analyse des Methylierungs-*contents* entsprach.

Der Locus SCN9A2 zeigte im Vergleich die *heterogenste* Methylierungsverteilung. Auffällig waren hier zum einen die stets zu 100 % unmethylierte Probe P2 Biopsie, welche sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Analyse des Methylierungs-*contents* stark von den anderen Kontrollen unterschied, und zum anderen die Probe P1, welche durchgehend bei allen CpG-Stellen den geringsten Anteil methylierter Sequenzen zeigte. Diese wies somit v.a. an den letzten beiden CpG-Positionen einen relevanten Unterschied zu den z.T. deutlich stärker methylierten Kontrollen auf. Die Kontrollen waren bei der zweiten CpG-Position um mindestens 10,93 % und bei der dritten CpG-Stelle sogar um mindestens 31,81 % stärker methyliert als die Plasma-Patienten-Probe P1. Somit war eine relevante Hypomethylierung von P1 zu den Kontrollen gegeben, was im Einklang mit der eingangs in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese stand. Diese besagte, dass sich bei an SFN erkrankten Patienten aufgrund des Niedergangs von C-Fasern vermehrt C-Faser DNA im Blut finden

sollte und somit bei diesen im Vergleich zu gesunden Kontroll-Personen eine Hypomethylierung C-Faser-spezifischer Gene zu erwarten wäre.

Bei Locus SCN10A2 stach vor allem die insgesamt sehr starke Methylierung ins Auge, ebenso wie die markanten 0 % methylierten Sequenzen der Probe K3 beim zweiten CpG-Dinukleotid und deren extremen Werte an allen drei potenziellen Methylierungsstellen. Ferner waren die Biopsie-Proben an den ersten beiden CpG-Stellen geringer methyliert als die restlichen Kontroll-Proben, was erst bei der Untersuchung der Methylierungslevel ersichtlich wurde. V.a. die Probe P1 Biopsie war mit mindestens 80,49 % an diesen ersten beiden CpG-Stellen von SCN10A2 deutlich geringer methyliert. An der dritten CpG-Position näherten sich die Biopsie-Proben hingegen den Kontrollen an. Die Plasma-Patienten-Proben waren an der ersten CpG-Position nur geringfügig weniger stark methyliert als die Kontroll-Proben und an den anderen beiden CpG-Stellen eher stärker methyliert. Somit war keine Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben im Vergleich zu den Kontrollen gegeben.

Der Locus SCN11A1 wies ebenfalls eine starke Methylierung auf, zudem war die erneut am geringsten methylierte Probe P1 auffällig. Bei einem Vergleich dieser zu den Kontrollen zeigte sich ein Unterschied zwischen 6,48 % und 14,69 %. Somit war eine Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Probe P1 verglichen mit den Kontroll-Proben gegeben, was der Hypothese dieser Arbeit entsprach. Die Biopsie-Proben waren zwar insgesamt etwas geringer methyliert als die anderen drei Kontrollen, näherten sich aber den Werten dieser an.

Es zeigten sich bei den Loci SCN9A2 und auch SCN11A1 jeweils deutliche Unterschiede in der Methylierung der Plasma-Patienten-Proben. So war die Probe P1 stets am geringsten methyliert, die Probe P2 hingegen zeigte sich eher stark methyliert und war häufig mit den Kontroll-Proben auf einem annähernd gleichen Methylierungslevel. Weiterhin lässt sich sagen, dass sich bei der Analyse der Methylierungslevel der jeweiligen CpG-Dinukleotide der verschiedenen Loci insgesamt sehr viele extreme Werte mit 0 % oder 100 % fanden.

5.8 Methylierungsmuster und Profil der Methylierungsmuster

Das Methylierungsmuster wurde für alle vier Genloci, SCN9A1, SCN9A2, SCN10A2 und SCN11A1 bei allen jeweils untersuchten Proben analysiert. Die Genloci SCN9A1, SCN9A2 und SCN10A2 hatten jeweils drei potenzielle Methylierungsstellen, der Locus SCN11A1 hingegen nur eine.

Zur besseren Übersicht werden im Folgenden bei Nennung der Methylierungsmuster die unmethylierten CpG-Positionen mit „U“ und methylierte mit „M“ bezeichnet, „X“ steht für die CpG-Positionen, die kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus zeigten. Der Fokus bei der Analyse der Methylierungsmuster wurde v.a. auf die jeweils am häufigsten vorkommenden Muster gelegt, vereinzelt vorkommende Methylierungsmuster sind den Tabellen und Grafiken zu entnehmen.

Die Methylierungsmuster-Analyse bietet die Möglichkeit weitergehende Informationen zu erhalten, die aus der Untersuchung der Methylierungslevel nicht hervorgehen oder über diese hinausgehen. Bei der Untersuchung der Methylierungslevel wurden die einzelnen CpG-Positionen isoliert betrachtet, wohingegen die Untersuchung der Methylierungsmuster diese miteinander in Kontext setzt und als Einheit wertet. Zudem können der Musteranalyse auch die Anzahl und Verteilung an Sequenzen entnommen werden, die an einer der CpG-Stellen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihrer Methylierung zeigten, sondern anstelle einer Cytosin- bzw. einer Thymin-Base an der jeweiligen potenziellen Methylierungsstelle z.B. ein Adenin aufwiesen.

Der Locus SCN9A1 wurde bei den Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie untersucht. Somit gab es, alle Sequenzen der genannten Proben addiert, eine Anzahl von 302 ausgewerteten Sequenzen.

Tabelle 25: Übersicht über die Methylierungsmuster des Genlocus SCN9A1 der Proben K1, K2, K3, P1 Biopsie und P2 Biopsie. In der linken Spalte findet sich der Genlocus, in der Spalte daneben die Anzahl, mit welcher Häufigkeit das jeweilige Methylierungsmuster vorkam, anschließend folgen die drei potenziellen Methylierungsstellen (MS) und in der rechten Spalte ist die jeweilige Probe aufgeführt. In Dunkelblau sind die unmethylierten CpG-Stellen der Sequenzen gehalten (U), die methylierten sind grün hinterlegt (M). Mit einem X gekennzeichnet und grau hinterlegt sind die CpG-Positionen der Sequenzen, an denen sich kein eindeutiges Ergebnis bezüglich des Methylierungsstatus fand.

Genlocus:	Anzahl:	1. MS	2. MS	3. MS	Probe:
9A1	65x	U	U	U	K1
	2x	U	X	X	
	1x	U	M	U	
	1x	X	U	X	
	1x	U	U	X	
9A1	110x	U	U	U	K2
	2x	M	U	U	
	1x	U	M	U	
9A1	59x	U	U	U	K3
	7x	U	M	M	
	3x	U	U	X	
9A1	52 insg.	Nicht möglich	Nicht möglich	Nicht möglich	P1 Biopsie
9A1	50x	U	U	U	P2 Biopsie

Die Analyse der Methylierungsmuster bestätigte die aus der Untersuchung der Methylierungslevel gewonnenen Informationen. Wie auch bei Letzterer schon auffallend, war dieser Locus an allen drei CpG-Positionen hauptsächlich unmethyliert. Insgesamt zeigten 94,04 % der 302 ausgewerteten Sequenzen das eindeutig dominierende Methylierungsmuster U-U-U (siehe Tabelle 25). Die Biopsie-Probe wies sogar bei allen 50 ausgewerteten Sequenzen dieses Muster auf (siehe Tabelle 25). Lediglich die Probe K3 zeigte eine geringfügige Diversität und wies mit 10,14 % in sieben der Sequenzen das Methylierungsmuster U-M-M auf.

Aus der Methylierungsmuster-Analyse ging hervor, dass sich CpG-Positionen mit uneindeutigem Ergebnis in Bezug auf ihren Methylierungsstatus an diesem Locus ausschließlich bei den Proben K1 und K3 fanden (siehe Tabelle 25). Die Biopsie-Probe hingegen zeigte in allen Sequenzen an allen drei potenziellen Methylierungsstellen ein eindeutiges, unmethyliertes Ergebnis.

Eine Analyse dieses Genlocus bei den Plasma-Patienten-Proben wurde aufgrund der klaren Dominanz des Methylierungsmusters U-U-U, welche mit den Erkenntnissen aus der Analyse der Methylierungslevel in Einklang steht, nicht durchgeführt. Da bei diesen das Muster U-U-U nicht relevant häufiger vorkommen und somit auch keine Hypomethylierung im Vergleich zu den Kontroll-Proben vorliegen konnte, was der Hypothese dieser Arbeit folgend jedoch der Fall hätte sein sollen.

Der Locus SCN9A2 wurde bei den Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie in insgesamt 571 Sequenzen untersucht.

Tabelle 26: Übersicht über die Methylierungsmuster des Genlocus SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie und P2 Biopsie. In der linken Spalte findet sich der Genlocus, in der Spalte daneben die Anzahl, mit welcher Häufigkeit das jeweilige Methylierungsmuster vorkam, anschließend folgen die drei potenziellen Methylierungsstellen (MS) und in der rechten Spalte ist die jeweilige Probe aufgeführt. In Dunkelblau sind die unmethylierten CpG-Stellen der Sequenzen gehalten (U), die methylierten sind gelb hinterlegt (M). Mit einem X gekennzeichnet und grau hinterlegt sind die CpG-Stellen der Sequenzen, an denen sich kein eindeutiges Ergebnis bezüglich des Methylierungsstatus fand.

Genlocus:	Anzahl:	1. MS	2. MS	3. MS	Probe:
9A2	61x	U	M	M	K1
	31x	M	M	M	
	10x	M	U	M	
	7x	U	U	U	
	5x	M	U	U	
	2x	U	M	U	
	1x	X	U	U	
	1x	U	M	X	
	1x	U	X	M	
9A2	55x	M	M	M	K2
	10x	U	U	U	
	7x	U	M	M	
	4x	U	U	M	
	1x	M	U	U	
	1x	U	X	U	
	1x	U	X	M	
	1x	X	X	X	
	1x	X	M	M	
	1x	M	X	M	
9A2	26x	M	M	M	K3
	14x	U	M	M	
	13x	U	U	M	
	10x	U	U	U	
	7x	M	U	M	
	2x	U	X	U	
	1x	U	X	M	
9A2	42x	U	U	U	P1
	33x	M	M	M	

	13x	U	M	M	
	9x	M	U	M	
	6x	U	M	U	
	3x	X	M	M	
	3x	X	U	U	
	2x	U	U	X	
	1x	M	U	U	
	1x	M	X	M	
	1x	X	M	X	
9A2	73x	M	M	M	P2
	38x	U	M	M	
	7x	M	U	U	
	5x	M	U	M	
	5x	U	U	M	
	3x	U	M	U	
	3x	U	U	U	
	1x	M	M	U	
	1x	M	X	U	
	1x	U	X	M	
9A2	52 insg.	Nicht möglich	Nicht möglich	Nicht möglich	P1 Biopsie
9A2	46x	U	U	U	P2 Biopsie

Bei Untersuchung der Kontroll-Proben gab es für die Probe K1 insgesamt 119 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 21). Davon zeigte sich bei 61 Sequenzen (51,26 %) das bei dieser Probe deutlich dominierende Methylierungsmuster U-M-M (siehe Abbildung 32). Mit 31 Sequenzen (26,05 %) fanden sich als zweithäufigstes Muster alle drei potenziellen Methylierungspositionen methyliert vor (siehe Tabelle 26). Nur bei sieben der Sequenzen waren alle drei CpG-Positionen unmethyliert (siehe Tabelle 26). Damit entsprachen ca. 5,88% der Sequenzen dem Methylierungsmuster U-U-U (siehe Abbildung 32).

Die Probe K2 hatte insgesamt 82 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 21). Davon zeigten sich 55 Sequenzen an allen drei CpG-Dinukleotiden methyliert (siehe Tabelle 26). Somit war mit 67,07 % der Sequenzen das Methylierungsmuster M-M-M bei dieser Probe klar vorherrschend und bei der Probe K2 damit auch deutlich häufiger vertreten als bei der Probe K1. Zehn der Sequenzen zeigten sich an allen drei CpG-Stellen unmethyliert (siehe Tabelle 26). Das bedeutet, ca. 12,20 % der Sequenzen wiesen das Muster U-U-U auf, etwas mehr als der doppelte Anteil verglichen mit der Probe K1 (siehe Abbildung 32). Mit sieben Sequenzen fanden sich am dritthäufigsten nur die letzten beiden der drei potenziellen Methylierungsstellen methyliert und somit zeigten 8,54 % das Methylierungsmuster U-M-M, ein we-

sentlich geringerer Anteil als bei der Probe K1, bei welcher dieses das häufigste Methylierungsmuster war (siehe Abbildung 32).

Bei der Probe K3 gab es insgesamt 73 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 21). Mit 26 Sequenzen (35,62 %) zeigten sich hierbei am häufigsten alle drei CpG-Dinukleotide methyliert, ebenso wie bei der Probe K2 (siehe Tabelle 26). Vierzehn der Sequenzen zeigten sich lediglich an den letzten beiden der drei potenziellen Methylierungsstellen methyliert (siehe Tabelle 26). Somit fand sich bei 19,18 % der Sequenzen das Muster U-M-M, häufiger als bei der Probe K2 aber dennoch mit wesentlich geringerem Anteil als bei der Probe K1, bei welcher dieses das häufigste Muster war (siehe Abbildung 32). Am dritthäufigsten fand sich mit 17,81 % der Sequenzen nur die letzte der drei CpG-Stellen methyliert vor und somit das Muster U-U-M (siehe Tabelle 26). Der Anteil der Sequenzen mit dem Methylierungsmuster U-U-U lag bei zehn Sequenzen und 13,70 % (siehe Tabelle 26). Die Proben K2 und K3 hatten daher einen annähernd gleichen Anteil an Sequenzen, die an allen drei CpG-Positionen unmethyliert waren.

Konträr zu den Kontroll- und Plasma-Patienten-Proben waren bei der Biopsie-Probe P2 alle 46 Sequenzen, 100 %, an allen drei CpGs unmethyliert (siehe Tabelle 26). Die Biopsie-Probe war somit wieder vollkommen *homogen* und vollständig unmethyliert, wie auch bei dem Locus SCN9A1, und zeigte damit einen deutlichen Unterschied zu den anderen zuvor genannten Proben. Als Kontrolle, die die Methylierungsverhältnisse der epidermalen und dermalen Zellen darstellt, hätte sie sich der Methylierung der Kontrollen annähern sollen, dies war hier jedoch nicht der Fall.

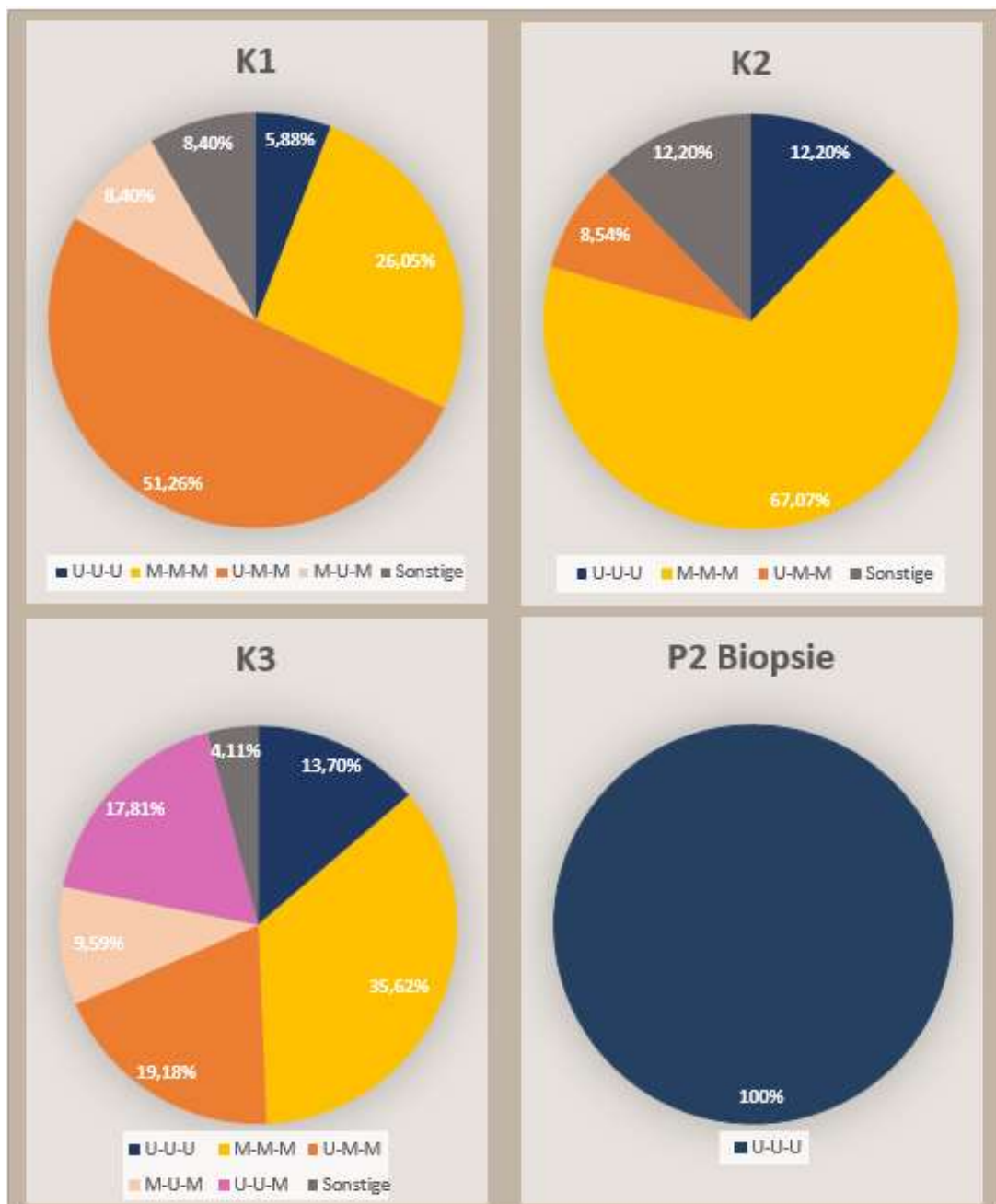


Abbildung 32: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Kontroll-Proben und der Biopsie-Probe des Locus SCN9A2. Oben mittig befindet sich jeweils die Beschriftung der Probe des entsprechenden Kreisdiagramms. Vereinzelt vorkommende Methylierungsmuster wurden nicht dargestellt und sind u.a. unter Sonstige zusammengefasst sowie der o.g. Tabelle zu entnehmen. Unterhalb der Kreisdiagramme befindet sich die jeweilige Legende. In Dunkelblau gehalten ist das Muster U-U-U, in Gelb das Muster M-M-M, in Orange das Muster U-M-M, in Apricot das Muster M-U-M, in Pink das Muster U-U-M und in Grau der Anteil an Sequenzen mit Methylierungsmustern, die nur in geringer Häufigkeit auftraten sowie Sequenzen, die an einer oder mehreren CpG-Stellen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus aufwiesen.

Die Blutplasma-Probe P1 hatte insgesamt 114 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 22). Hiervon zeigten sich 42 Sequenzen an allen drei potenziellen Methylierungsstellen unmethyliert (siehe Tabelle 26). Daher fand sich bei 36,84 % der Sequenzen das bei dieser Probe

deutlich dominierende Methylierungsmuster U-U-U (siehe Abbildung 33). Dies bildete einen starken Kontrast zu den drei Kontroll-Proben, bei welchen dieses Methylierungsmuster nur eine untergeordnete Rolle spielte. Bei 33 der Sequenzen (28,95 %) hingegen waren alle drei CpGs methyliert (siehe Tabelle 26). Das bedeutet, der zweithäufigste Anteil der Sequenzen wies das Muster M-M-M auf (siehe Abbildung 33). Dreizehn der Sequenzen zeigten sich lediglich an den letzten beiden CpG-Dinukleotiden methyliert und wiesen somit mit 11,40 % das Muster U-M-M auf (siehe Abbildung 33).

Für die Blutplasma-Probe P2 gab es insgesamt 137 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 22). Am häufigsten fanden sich hierbei mit 73 Sequenzen alle drei potenziellen Methylierungsstellen methyliert vor (siehe Tabelle 26). Somit ergab sich für 53,28 % der Sequenzen das Methylierungsmuster M-M-M (siehe Abbildung 33). Dies war ähnlich zu den Proben K2 und K3 und zeigte einen auffälligen Unterschied zu der Plasma-Patienten-Probe P1. Bei 38 der Sequenzen und somit 27,74 % zeigten sich die letzten beiden CpG-Dinukleotide methyliert (siehe Tabelle 26). Dieses Muster war somit häufiger als bei den Proben K2 und K3 und auch häufiger als bei der Blutplasma-Probe P1. Das Methylierungsmuster U-U-U, welches bei P1 noch das häufigste Muster war, fand sich hier jedoch nur bei drei der Sequenzen und machte lediglich einen Anteil von 2,19 % aus (siehe Abbildung 33). Diesbezüglich wies P2 somit eher Ähnlichkeiten zu den Kontroll-Proben auf, welche dennoch je einen größeren Anteil dieses Methylierungsmusters zeigten.

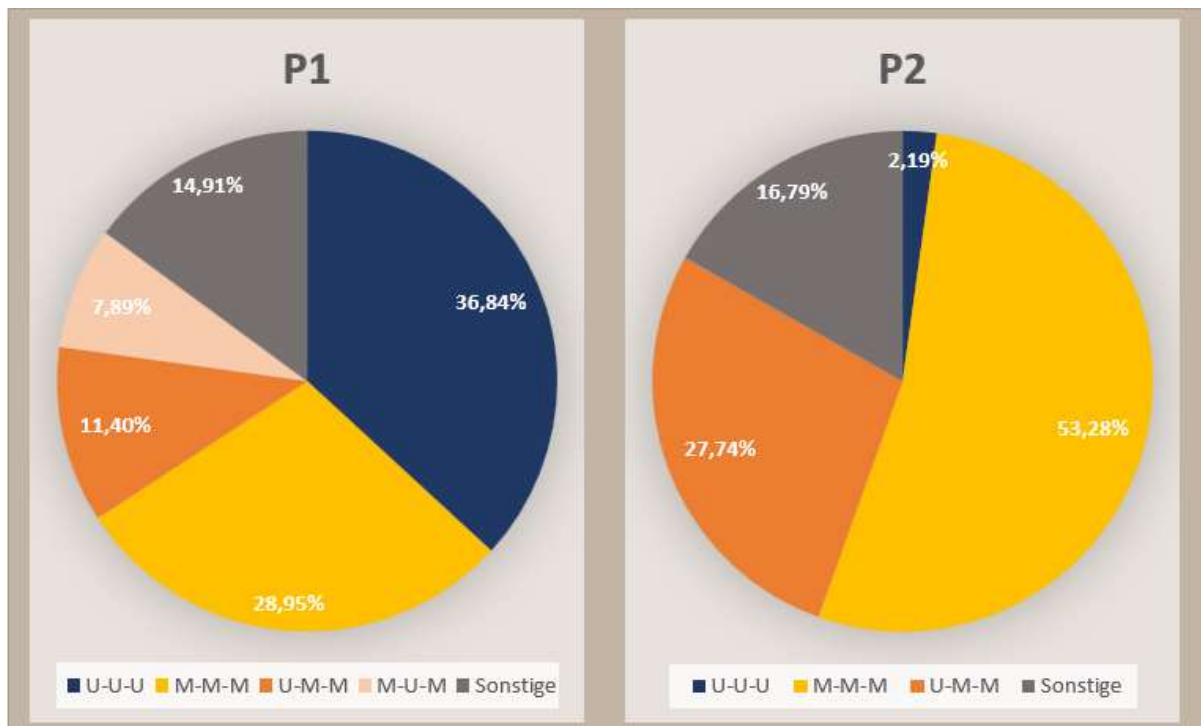


Abbildung 33: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Patienten-Proben des Locus SCN9A2. Oben mittig befindet sich jeweils die Beschriftung der Probe des entsprechenden Kreisdiagramms. Das Kreisdiagramm unten mittig zeigt die die Anzahl der häufigsten Sequenzen aller Patienten-Proben zusammengerechnet. Vereinzelt vorkommende Methylierungsmuster wurden nicht dargestellt und sind u.a. unter Sonstige zusammengefasst sowie der o.g. Tabelle zu entnehmen. Unterhalb der Kreisdiagramme befindet sich die jeweilige Legende. In Dunkelblau gehalten ist das Muster U-U-U, in Gelb das Muster M-M-M, in Orange das Muster U-M-M, in Apricot das Muster M-U-M, in Pink das Muster U-U-M und in Grau der Anteil an Sequenzen mit Methylierungsmustern, die nur in geringer Häufigkeit auftraten sowie Sequenzen, die an einer oder mehreren CpG-Stellen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus aufwiesen.

Der Genlocus SCN9A2 zeigte im Vergleich zu SCN9A1 eine deutlich heterogenere Verteilung an Methylierungsmustern. Bei Betrachtung der Kontroll-Proben fielen v.a. zwei Muster auf, welche insgesamt sehr häufig vorkamen. Bei diesen handelte es sich um die Methylierungsmuster M-M-M und U-M-M. Letzteres zeigte sich insbesondere bei der Kontrolle K1 gehäuft. Das Muster U-U-U spielte bei den Kontroll-Proben hingegen insgesamt eher eine untergeordnete Rolle. Bei einer direkten Gegenüberstellung mit den Patienten-Proben zeigte sich das Methylierungsmuster U-U-U jedoch bei der Probe P1 mit 36,84 % eindeutig dominant und gegenüber den Kontrollen stark gehäuft. Zudem machte das Muster M-M-M mit 28,95 % im Vergleich zu den Kontroll-Proben auch einen deutlich geringeren Anteil aus. Dieser Unterschied war bei der Untersuchung der Methylierungslevel lediglich bei der Betrachtung der letzten CpG-Position so ausgeprägt feststellbar. Erst bei Analyse der Methylierungsmuster trat deutlich zu Tage, dass jedoch alle drei CpG-Positionen bei P1 hypomethyliert waren. Der bei der Auswertung der Ergebnisse der Methylierungslevel zuvor schon deutlich gewordene Unterschied zwischen den beiden Plasma-Patienten-Proben wurde bei der Betrachtung der Methylierungsmuster bestätigt. Die Probe P2 zeigte das Muster U-U-U nur

bei 2,19 % der Sequenzen und wies dafür mit 53,28 % das Muster M-M-M auf. Letzteres näherte sich somit dem prozentualen Anteil von M-M-M bei den Kontrollen an. Das Methylierungsmuster U-U-U hingegen kam damit bei der Probe P2 sogar noch seltener als bei den Kontrollen vor. Auch das Methylierungsmuster U-M-M zeigte sich mit 27,74 % bei P2 sehr häufig. Somit konnte die Vermutung, dass sich die Methylierungsverhältnisse der Probe P2 und die der Kontrollen ähneln, welche sich bereits aus der Untersuchung der Methylierungslevel ergab, durch die Ergebnisse der der Musteranalyse bestätigt werden. Insgesamt war der Unterschied der Probe P1 zu den Kontrollen in Bezug auf die Häufigkeit des Musters U-U-U hier so groß, dass er vermuten lässt, dass sich SCN9A2 als epigenetischer Biomarker für SFN eignet.

Der Locus SCN10A2 wurde bei den Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie und insgesamt 780 Sequenzen untersucht.

Tabelle 27: Übersicht über die Methylierungsmuster des Genlocus SCN9A2 der Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie. In der linken Spalte findet sich der Genlocus, in der Spalte daneben die Anzahl, mit welcher Häufigkeit das jeweilige Methylierungsmuster vorkam, anschließend folgen die drei potenziellen Methylierungsstellen (MS) und in der rechten Spalte ist die jeweilige Probe aufgeführt. In Dunkelblau sind die unmethylierten CpG-Stellen der Sequenzen gehalten (U), die methylierten sind rot hinterlegt (M). Mit einem X gekennzeichnet und grau hinterlegt sind die CpG-Stellen der Sequenzen, an denen sich kein eindeutiges Ergebnis bezüglich des Methylierungsstatus fand.

Genlocus:	Anzahl:	1. MS	2. MS	3. MS	Probe:
10A2	125x	M	M	M	K1
	12x	M	U	M	
	9x	M	M	U	
10A2	76x	M	M	M	K2
	5x	M	M	U	
	5x	M	U	M	
	2x	M	M	X	
10A2	128x	M	U	M	K3
10A2	149x	M	M	M	P1
	1x	U	M	M	
10A2	126x	M	M	M	P2
	4x	M	U	M	

	2x	U	U	M	
	1x	M	M	U	
	1x	U	M	M	
10A2	27x	M	M	M	P1 Biopsie
	5x	M	U	M	
	3x	U	M	M	
	2x	U	U	M	
	1x	X	M	M	
	1x	M	M	X	
	1x	U	M	X	
	1x	U	X	M	
10A2	37x	M	M	M	P2 Biopsie
	7x	M	U	M	
	5x	U	M	M	
	1x	U	U	U	
	1x	U	U	M	
10A2	31x	M	M	M	P3 Biopsie
	4x	M	U	M	
	2x	M	M	U	
	2x	U	U	M	
	1x	M	X	U	
	1x	X	M	M	
	1x	M	X	M	

Für die Probe K1 gab es insgesamt 146 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 21). Davon zeigten sich 125 Sequenzen an allen drei CpG-Dinukleotiden methyliert (siehe Tabelle 27). Das bedeutet, dass 85,62 % der Sequenzen das bei diesem Locus deutlich dominierende Methylierungsmuster M-M-M aufwiesen (siehe Abbildung 34). Bei 12 der Sequenzen waren nur das erste und das letzte CpG methyliert (siehe Tabelle 27). Somit zeigte sich bei 8,22 % der Sequenzen das Muster M-U-M. Zuletzt wiesen neun Sequenzen (6,16 %) das Methylierungsmuster M-M-U auf (siehe Abbildung 34).

Bei der Probe K2 gab es insgesamt 88 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 21). Hiervon fand sich bei 76 Sequenzen (86,36 %) das Methylierungsmuster M-M-M, sehr ähnlich zu der Probe K1 (siehe Abbildung 34). Je fünf der Sequenzen zeigten sich lediglich an den ersten beiden CpGs oder an dem ersten und letzten CpG-Dinukleotid methyliert (siehe Tabelle 27). Das bedeutet, je 5,68 % der Sequenzen wiesen zum einen das Muster M-M-U und zum anderen das Muster M-U-M auf. Somit zeigten sich bei der Probe K2 die gleichen Methylierungsmuster wie bei der Probe K1, mit jeweils sehr ähnlichen Verteilungen.

Für die Probe K3 gab es insgesamt 128 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 21). Diese wiesen mit 100 % der Sequenzen das Methylierungsmuster M-U-M auf (siehe Abbildung 34). Dies war deutlich konträr zu den anderen beiden Kontroll-Proben, bei welchen das Muster M-U-M zwar auch zu finden war, aber jeweils mit einem sehr geringen Anteil von unter 9 % und bei welchen das Methylierungsmuster M-M-M klar führte. Ferner zeigte sich einzig bei Probe K3 keinerlei Variation bezüglich der Methylierungsmuster.

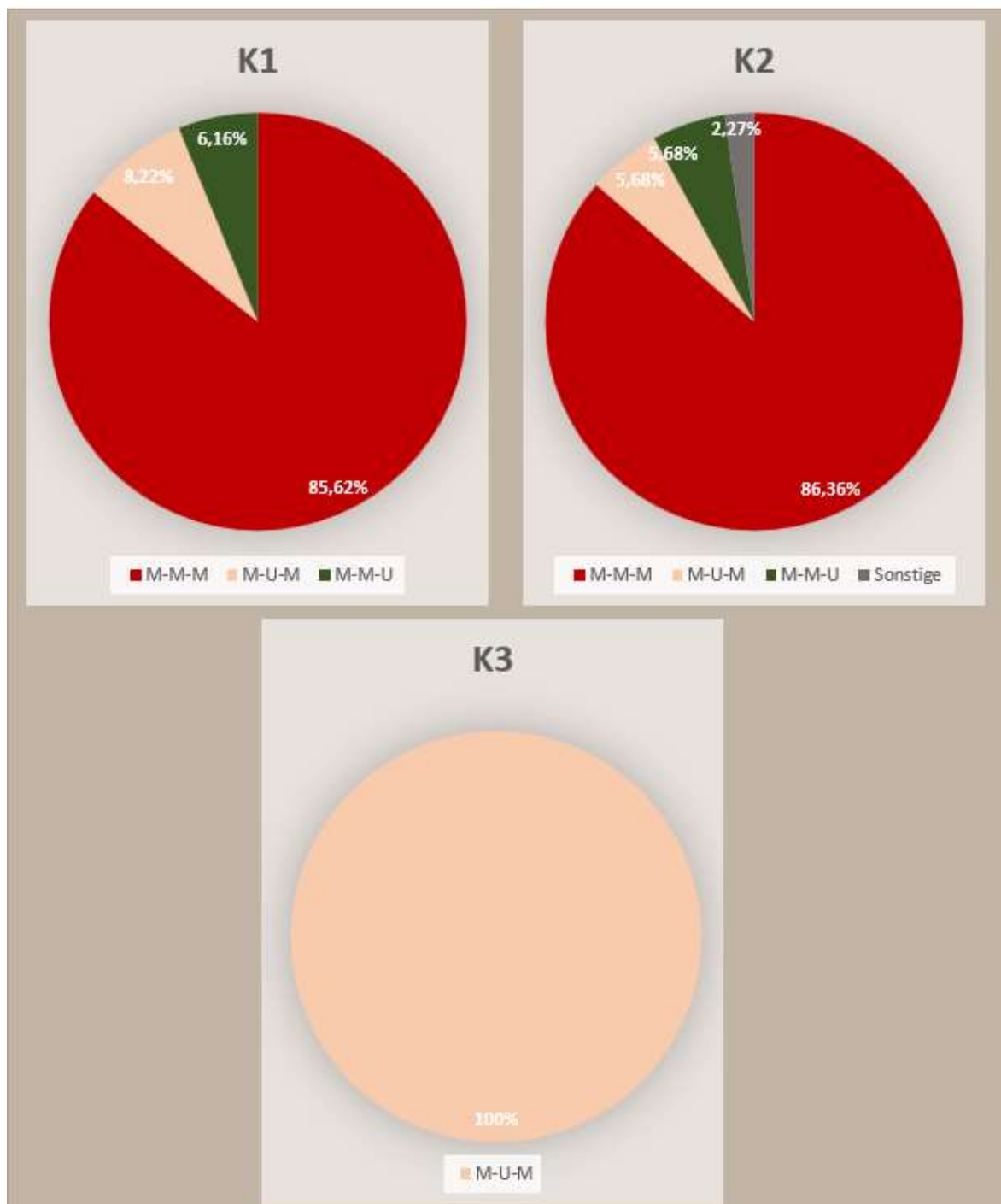


Abbildung 34: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Kontroll-Proben des Locus SCN10A2. Oben mittig befindet sich jeweils die Beschriftung der Kontroll-Probe des entsprechenden Kreisdiagramms. Das Kreisdiagramm unten rechts zeigt die Anzahl der häufigsten Sequenzen aller Kontroll-Proben zusammengerechnet. Vereinzelt vorkommende Methylierungsmuster wurden nicht dargestellt und sind u.a. unter Sonstige zusammengefasst sowie der o.g. Tabelle zu entnehmen. Unterhalb der Kreisdiagramme befindet sich die jeweilige Legende. In Rot gehalten ist das Muster M-M-M, in Apricot das Muster M-U-M, in Dunkelgrün das Muster M-M-U und in Grau der Anteil an Sequenzen mit Methylierungsmustern, die nur in geringer Häufigkeit auftraten sowie Sequenzen, die an einer oder mehreren CpG-Stellen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus aufwiesen.

Für die Biopsie-Probe P1 gab es insgesamt 41 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 23). Davon zeigten 27 Sequenzen (65,85 %) an allen drei CpG-Positionen Methylierungen (siehe

Abbildung 35). Bei fünf der Sequenzen waren das erste und das letzte der drei CpG-Dinukleotide methyliert (siehe Tabelle 27). Damit zeigten 12,20 % der Sequenzen das Methylierungsmuster M-U-M (siehe Abbildung 35)

Für die Biopsie-Probe P2 gab es insgesamt 51 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 23). Hierbei fanden sich bei 37 Sequenzen (72,55 %) alle drei CpG-Stellen methyliert vor (siehe Abbildung 35). Bei sieben der Sequenzen (13,73 %) lag das Muster M-U-M vor (siehe Abbildung 35). Zuletzt fand sich bei fünf Sequenzen (9,80%) das Muster U-M-M (siehe Abbildung 35).

Bei der Biopsie-Probe P3 gab es insgesamt 42 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 23). Von diesen waren 31 Sequenzen an allen drei CpG-Dinukleotiden methyliert (siehe Tabelle 27). Das bedeutet, dass bei 73,81 % der Sequenzen das Methylierungsmuster M-M-M vorlag (siehe Abbildung 35). Das Muster M-M-M kam daher bei der Probe P3 Biopsie ebenso wie bei den anderen beiden Biopsie-Proben, zu welchen es einen vergleichbaren Wert zeigte, deutlich seltener vor als bei den Kontrollen K1 und K2. Bei vier der Sequenzen (9,52 %) zeigten sich das erste und das letzte CpG methyliert (siehe Abbildung 35).

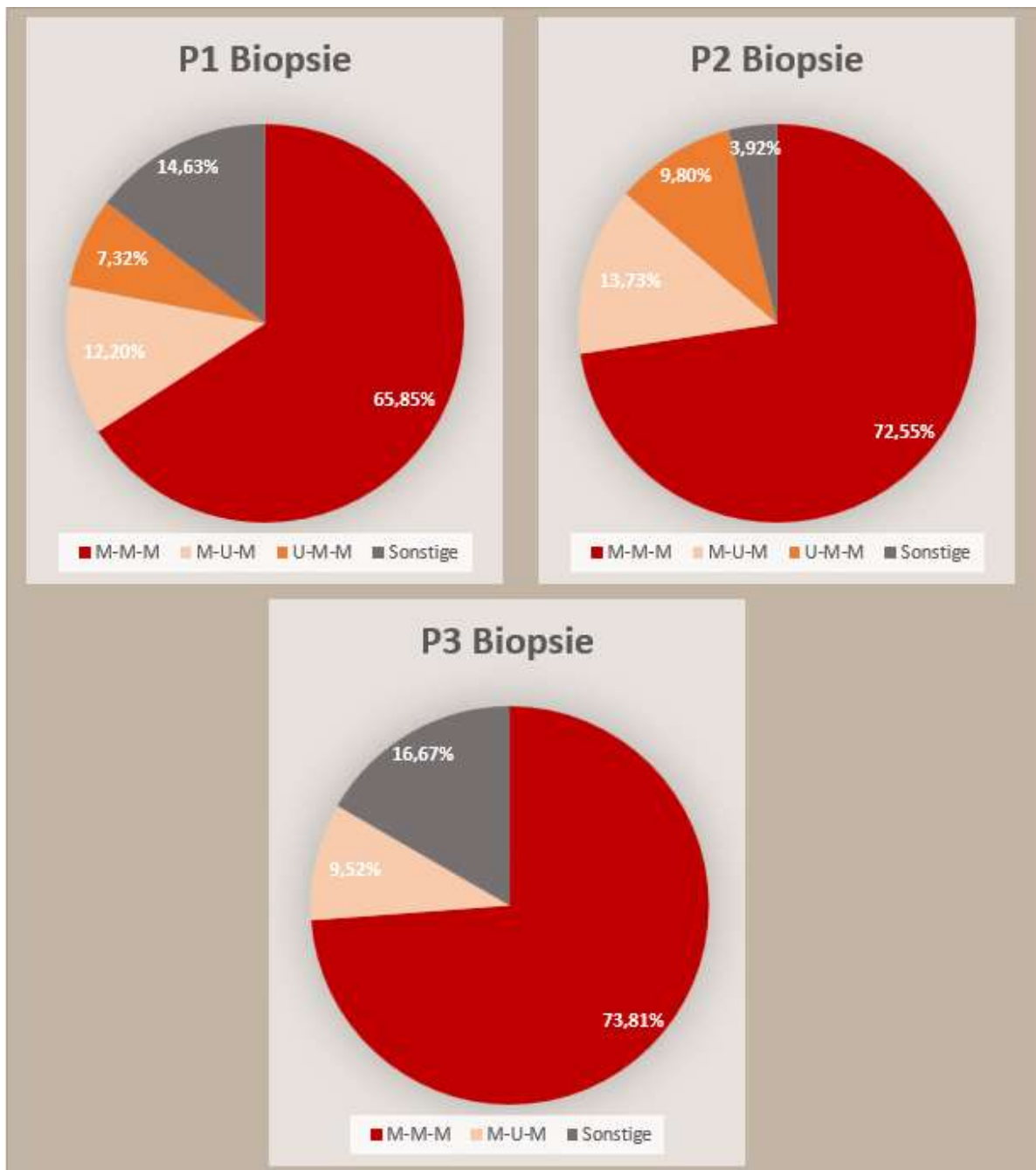


Abbildung 35: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Biopsie-Proben des Locus SCN10A2. Oben mittig befindet sich jeweils die Beschriftung der Probe des entsprechenden Kreisdiagramms. Das Kreisdiagramm unten rechts zeigt die Anzahl der häufigsten Sequenzen aller Biopsie-Proben zusammengerechnet. Vereinzelt vorkommende Methylierungsmuster wurden nicht dargestellt und sind u.a. unter Sonstige zusammengefasst sowie der o.g. Tabelle zu entnehmen. Unterhalb der Kreisdiagramme befindet sich die jeweilige Legende. In Rot gehalten ist das Muster M-M-M, in Apricot das Muster M-U-M, in Orange das Muster U-M-M und in Grau der Anteil an Sequenzen mit Methylierungsmustern, die nur in geringer Häufigkeit auftraten sowie Sequenzen, die an einer oder mehreren CpG-Stellen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus aufwiesen.

Bei der Blutplasma-Probe P1 gab es insgesamt 150 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 22), davon zeigten sich 149 an allen drei CpG-Stellen methyliert (siehe Tabelle 27). Damit ergab sich für 99,33 % der Sequenzen das Methylierungsmuster M-M-M (siehe Abbildung

36). Dieses Muster kam bei P1 somit deutlich häufiger vor als bei den Kontroll-Proben K1 und K2. Das Muster M-U-M trat gar nicht auf. Auch hier war nur eine geringe Varianz an Methylierungsmustern zu finden.

Bei der Blutplasma-Probe P2 gab es insgesamt 134 ausgewertete Sequenzen (siehe Tabelle 22). Hiervon wiesen 126 Sequenzen (94,03%) das Muster M-M-M auf (siehe Tabelle 27). Auch hier war damit ein größerer Anteil des Musters als bei den Kontroll-Proben K1 und K2 gegeben. Andere Methylierungsmuster traten nur vereinzelt auf (siehe Tabelle 27).

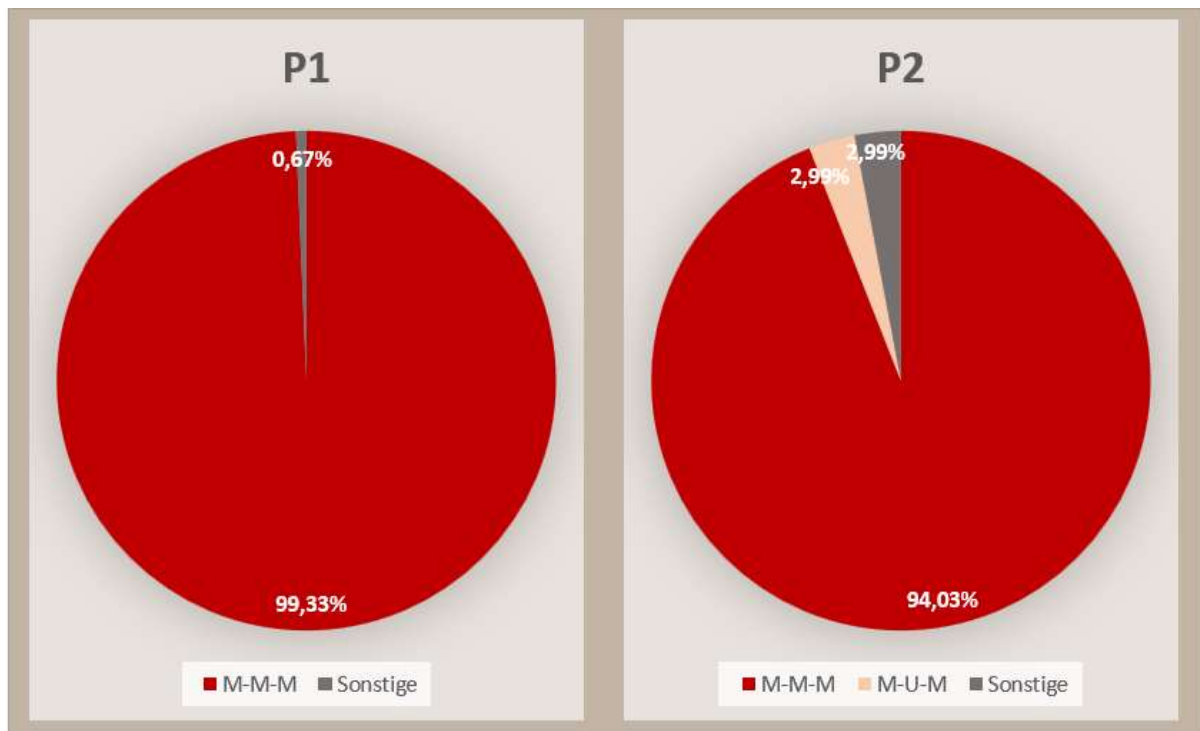


Abbildung 36: Übersicht über die prozentualen Anteile der häufigsten Methylierungsmuster der Patienten-Proben des Locus SCN10A2. Oben mittig befindet sich jeweils die Beschriftung der Probe des entsprechenden Kreisdiagramms. Das Kreisdiagramm unten mittig zeigt die Anzahl der häufigsten Sequenzen aller Patienten-Proben zusammengerechnet. Vereinzelt vorkommende Methylierungsmuster wurden nicht dargestellt und sind u.a. unter Sonstige zusammengefasst sowie der o.g. Tabelle zu entnehmen. Unterhalb der Kreisdiagramme befindet sich die jeweilige Legende. In Rot gehalten ist das Muster M-M-M, in Apricot das Muster M-U-M, in Dunkelgrün das Muster M-M-U und in Grau der Anteil an Sequenzen mit Methylierungsmustern, die nur in geringer Häufigkeit auftraten sowie Sequenzen, die an einer oder mehreren CpG-Stellen kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus aufwiesen.

Der Locus SCN10A2 zeigte sich insgesamt verglichen mit den vorigen Loci deutlich stärker methyliert. Das Methylierungsmuster U-U-U kam bei 780 Sequenzen nur ein einziges Mal vor (P2 Biopsie). Insgesamt zeigte sich das Muster M-M-M bei den Kontrollen K1 und K2 je mit ca. 86 %, bei den Plasma-Patienten-Proben mit 99,33 % (P1) und 94,03 % (P2) und bei den Biopsie-Proben mit Werten zwischen 65,85 % (P1 Biopsie) und 73,81 % (P3 Biopsie). Die Plasma-Patienten-Proben zeigten somit im Vergleich zu den Kontrollen sogar einen

deutlich größeren Anteil des Musters M-M-M und demnach eine Hypermethylierung. Eine Hypermethylierung war der Hypothese dieser Arbeit gemäß nicht zu erwarten. Laut dieser wäre im Gegenteil sogar eine Hypomethylierung erwartet worden. Ferner zeigten die beiden Plasma-Patienten-Proben an diesem Genlocus, anders als bei SCN9A2 (und SCN11A1), keinen so deutlichen Unterschied untereinander. Die Biopsie-Proben hingegen zeigten sich gegenüber den Blutplasma-Kontrollen insgesamt bis zu 20,51 % hypomethyliert. Bei der Analyse des Methylierungslevels der Biopsie-Proben hatte sich diese Hypomethylierung nur an der ersten und zweiten CpG-Position gezeigt. An der letzten CpG-Stelle befand sich das Methylierungslevel der Biopsie-Probe mit denen der Kontrollen auf einem ähnlichen Niveau. Somit bestätigte die Muster-Analyse die generelle Hypomethylierung der Biopsie-Proben zu den Kontrollen, die Level-Analyse hatte jedoch gezeigt, dass sich diese dennoch an der letzten CpG-Stelle in ihrem Methylierungsgrad annähern. Bei der Analyse der Methylierungslevel hatte sich die Probe P1 Biopsie von allen Biopsie-Proben am geringsten methyliert gezeigt, was durch die Untersuchung der Methylierungsmuster bestätigt wurde. Die Biopsie-Proben stellten als Kontrollen den Methylierungsstatus des epidermalen und dermalen Gewebes dar, deshalb wurde eine Annäherung der Werte dieser an die der Blutplasma-Kontrollen erwartet. Dies war hier jedoch, ausschließlich die Muster-Analyse betrachtet, nicht der Fall. Auffällig war bei SCN10A2 zudem die Probe K3, die ohne jegliche Varianz an allen Sequenzen das Methylierungsmuster M-U-M aufwies.

Der Locus SCN11A1 wurde bei allen Proben, K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie und insgesamt bei 974 ausgewerteten Sequenzen untersucht. Hier gab es nur ein CpG-Dinukleotid. Daher entsprach das Methylierungsmuster bei den Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie dem Methylierungslevel der genannten Proben.

Bei den Biopsie-Proben P1 und P3 gab es im Unterschied zu den Kontroll- und Plasma-Patienten-Proben zudem Sequenzen, die in Bezug auf ihren Methylierungsstatus kein eindeutiges Ergebnis zeigten, bei P1 der Biopsie-Proben waren es insgesamt vier Sequenzen, bei P3 der Biopsie-Proben eine.

Zusammenfassend konnten anhand der Analyse der Methylierungsmuster viele der Informationen, die aus der Untersuchung der Methylierungslevel gewonnen wurden, bestätigt werden. So konnte die potenzielle Eignung des Locus SCN9A2 als epigenetischer Biomarker für SFN anhand der Methylierungsmuster bekräftigt werden, ebenso wie der deutliche Unterschied zwischen den beiden Plasma-Patienten-Proben und die Ähnlichkeit der Probe P2 zu den Kontrollen. Zudem wurde die Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen bei SCN10A2 durch die Muster-Analyse bestätigt. Auch die Hypomethyl-

ierung der Biopsie-Proben zu den Kontroll-Proben bei SCN10A2 wurde bestätigt, jedoch ohne die Annäherung der Werte der beiden Proben an der letzten CpG-Stelle, wie sie bei der Untersuchung der Methylierungslevel gefunden wurde. Hier war es somit nötig die Informationen aus beiden Analyse-Ebenen zusammenzubringen, eine Hypomethylierung lag vor, aber ebenso eine Annäherung der Methylierungsverhältnisse an der dritten CpG-Position. Bei den beiden Loci SCN9A1 und SCN11A1 brachte eine Untersuchung der Methylierungsmuster keine neuen Informationen bzw. sie entsprach bei SCN11A1 der Analyse des Methylierungslevels, da es hier nur eine CpG-Position gab.

In der Epigenetik sind Prozesse zusammengefasst, bei welchen die Sequenz der DNA selbst unverändert bleibt, jedoch Veränderungen auf der Ebene der Chromatinstruktur und -aktivität geschehen, welche von einem Individuum an das nächste vererbt werden können (Walter, 2018). Durch jene epigenetischen Veränderungen ist es möglich, Gene einer Zelle zu aktivieren oder stillzulegen (Koolman and Röhm, 2019).

Eine Möglichkeit der epigenetischen Modifikation stellt die DNA-Methylierung dar. Diese findet postreplikativ an sogenannten CpG-Dinukleotiden der DNA-Sequenz statt (Walter, 2018). Durch u.a. diesen Mechanismus werden in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Gene exprimiert, obwohl sie das gleiche genetische Material enthalten (Chatterjee and Vinson, 2012). Es gibt Gene, welche in nahezu allen Zelltypen exprimiert werden, sogenannte Haushaltsgene, andere wiederum werden spezifisch nur in bestimmten Zelltypen exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gene ausgewählt, welche spezifisch in C-Fasern exprimiert werden. Diese sollten somit in der DNA von Zellen jener C-Fasern aus epigenetischer Sicht aktiv vorliegen, wohingegen sie in Zellen anderer Herkunft stillgelegt sein sollten. Für diese Arbeit wurden die Gene SCN9A, SCN10A und SCN11A ausgewählt, welche für Untereinheiten von spannungsgesteuerten Natriumkanälen kodieren.

Die Transkription eines Gens wird v.a. über die Promotorregion reguliert, epigenetische Modifikationen im Sinne einer DNA-Methylierung sollten somit vorwiegend in diesem Bereich stattfinden. Demnach sollte die Promotorregion dieser ausgewählten Gene (SCN9A, SCN10A, SCN11A) in Zellen der C-Fasern eher hypomethyliert und somit aktiv und in Zellen anderen Ursprungs vermehrt methyliert vorliegen.

Täglich gehen im menschlichen Körper Zellen unter, deren genetisches Material schließlich als cfDNA in das Blut gelangt. Bei z.B. Krebserkrankungen findet sich somit eine erhöhte Menge an zellfreier Tumor-DNA im Blut. Daher wurde die Theorie aufgestellt, dass bei Personen, welche an Small Fiber Neuropathie erkrankt sind, vermehrt C-Fasern untergehen sollten und somit auch vermehrt DNA dieser C-Fasern in das Blut gelangen. Ziel der Arbeit war es, cfDNA aus dem Blut gesunder sowie an SFN erkrankter Menschen zu isolieren und im Hinblick auf den Methylierungsstatus der Promotorregionen der ausgewählten C-Faser-spezifischen Gene zu analysieren und zu vergleichen. So sollte geprüft werden, ob die Möglichkeit vorliegt, SFN mittels eines epigenetischen Biomarkers anhand eines Bluttests zu diagnostizieren. Dieser soll es im Optimalfall ermöglichen, den Patienten im Rahmen der Diagnostik auf SFN eine Hautstanzbiopsie zu ersparen, welche aktuell zusammen mit der QST zur Standarddiagnostik gehört.

6.1 Methodische Aspekte

Um die Methylierungsanalyse der Promotorregionen der Gene SCN9A, SCN10A und SCN11A untersuchen zu können, mussten diese zunächst auffindig gemacht werden. Da aktuell noch keine Studien veröffentlicht wurden, die die Methylierung der Promotorregionen der besagten Gene in Zusammenhang mit Small Fiber Neuropathie untersucht haben, musste für diese Arbeit jeweils die Promotorregion der Gene ermittelt werden, CpG-reiche Regionen oder bereits bekannte Methylierungsstellen gesucht und anschließend *Primer* zur Untersuchung jener CpG-Positionen *designed* werden. Für die Auswahl der zu untersuchenden Loci war zu berücksichtigen, dass zellfreie DNA aus dem Blutplasma durchschnittlich eine Länge von ca. 147-167 bp hat (Worm Ørntoft et al., 2017) und die PCR-Produkte zudem für die Bisulfit-Konversion eine Größe von < 300 bp haben sollten (Warnecke et al., 2002). Bei dem *Design* der *Primer* musste ferner auf die Einhaltung bestimmter Regeln geachtet werden (siehe S.124, Abschnitt über das *Design* der *Primer* für die PCR-Amplifikation Bisulfit-behandelter DNA). Bei der Interpretation und Analyse der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass es für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen noch weitere CpG-Positionen als die hier ausgewählten gibt, die für eine Methylierungsanalyse ebenfalls geeignet sein könnten.

Das Gen SCN10A war bereits in Bezug auf Enhancer untersucht worden, die die mechanische Schmerzsensibilität beim Menschen beeinflussen. Hierbei wurde die Promotorregion des Gens in dem Bereich zwischen 38,837,888-38,835,390 auf Chromosom 3 beschrieben (Duan et al., 2018). Daraufhin wurde in dem *Human Genome Browser* GRCh37/hg19 von UCSC diese Genregion genauer analysiert. Hierbei fanden sich CpG-reiche Regionen. Davon wurden die Regionen chr.3:38,835,137-38,835,222 für die Sequenz SCN10A1 (*Forward* zu *Reverse Primer*) und chr.3:38,835,190-38,835,323 (*outer Primer* zu *outer Primer*) für die Sequenz SCN10A2 ausgesucht. Die Sequenz SCN10A1 wies dabei nur eine einzige CpG-Position auf, die Sequenz SCN10A2 hingegen drei CpG-Positionen. Bei der Sequenz SCN10A1 handelte es sich um eine einfache PCR, diese konnte jedoch im Rahmen der Arbeit nicht erfolgreich amplifiziert werden. Die Sequenz SCN10A2 hingegen wurde mittels *nested* PCR untersucht, zeigte sich erfolgreich amplifizierbar und wurde im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet. Im Nachhinein fand sich bei weiterführenden Recherchen im Bereich der genannten *Promotor*-Region zudem eine bekannte Methylierungsstelle an der Position chr3:38,836,991 (GRCh37/hg19). Diese wäre vermutlich ebenfalls für die Analyse im Rahmen dieser Arbeit geeignet gewesen und bietet ggf. eine relevante Option für weitere Forschungen nach einem epigenetischen Biomarker für SFN.

Das Gen SCN9A ist auf Chromosom 2 lokalisiert, ein Promotor befindet sich in der Region chr.2:167,227,711-167,233,715 (GRCh37/hg19) (Weizmann Institute of Science, 2023). Es wurden zwei Sequenzen in diesem Bereich untersucht, die Sequenz SCN9A1 mit der Position chr.2: 167,232,910-167,233,027 (*outer* zu *outer Primer*, GRCh37/hg19) und SCN9A2 mit

der Position chr.2: 167,233,272-167,233,422 (*outer* zu *outer Primer*, GRCh37/hg19). Beide Sequenzen enthielten je drei CpG-Positionen, von denen jeweils eine bereits als Methylierungsstelle bekannt war (University of California Santa Cruz Genomics Institute, n.d.). Für den Locus SCN9A1 war dies die zweite der drei CpG-Stellen an Position chr2:167,232,981 (GRCh37/hg19). Für den Locus SCN9A2 war dies die dritte der drei CpG-Positionen an der Stelle chr2:167,233,372 (GRCh37/hg19). Des Weiteren befanden sich die beiden Loci in der Nähe zu einer bekannten großen CpG-Insel, die sich in der Region chr.2:167,232,389-167,232,711 befindet, über 323 bp erstreckt und 31 CpG-Positionen enthält (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). In dieser Arbeit wurde sich einerseits wegen der bereits bekannten Methylierungsstellen sowie der Lage der Sequenzen in der *Promotor*-Region und andererseits wegen der *Designbarkeit* der Primer für die o.g. Loci entschieden, in der Folge als SCN9A1 und SCN9A2 benannt. Innerhalb der genannten *Promotor*-Region befinden sich jedoch acht weitere bekannte Methylierungsstellen an den Positionen chr2:167,233,056, chr2:167,232,696, chr2:167,232,680, chr2:167,232,646, chr2:167,232,412, chr2:167,232,220, chr2:167,231,970 und chr2:167,229,656 (GRCh37/hg19). Vier dieser Methylierungsstellen befinden sich außerdem in der beschriebenen CpG-Insel, es handelt sich dabei um die Positionen chr2:167,232,412, chr2:167,232,646, chr2:167,232,680 und chr2:167,232,696 (GRCh37/hg19). Auch die Methylierungsanalyse dieser Loci könnte für die Diagnostik der SFN interessant sein und stellt eine potenzielle Möglichkeit für weiterführende Untersuchungen dar.

Das Gen SCN11A befindet sich auf Chromosom 3, in der Region 38,845,764-39,052,157 (GRCh37/hg19). Eine *Promotor*-Region ist dabei im Bereich von chr.3:39,050,903-39,055,599 lokalisiert (GRCh37/hg19). Zudem befindet sich eine sogenannte *Promotor flanking Region* in dem Bereich chr.3:38,991,602-38,992,799 (Ensembl, 2023). Es wurden drei Sequenzen in diesem Gen untersucht, die Sequenz SCN11A1 befand sich in der Region chr.3:38,992,118-38,992,258 (*outer* zu *outer Primer*, GRCh37/hg19) und enthielt eine CpG-Position (chr.3:38,992,201), welche bereits als Methylierungsstelle bekannt ist (GRCh37/hg19). Diese ließ sich mittels einer PCR erfolgreich amplifizieren und wurde im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet. Die Sequenz SCN11A2 befand sich in der Region chr.3:38,992,631-38,992,781 (*Forward* zu *Reverse Primer*, GRCh37/hg19) und enthielt 16 CpG-Stellen. Weiterhin wurde die Sequenz SCN11A3 untersucht, welche sich in der Region chr.3:38,993,007-38,993,166 (*outer* zu *outer Primer*, GRCh37/hg19) befand und vier CpG-Positionen enthielt. Die letzten beiden Sequenzen konnten jedoch nicht erfolgreich amplifiziert werden und wurden daher nicht analysiert. Die Sequenzen SCN11A1 und SCN11A2 lagen in der besagten *Promotor flanking Region*. In der Nähe zu den untersuchten Sequenzen ist innerhalb der beschriebenen *Promotor*-Region ferner eine bekannte CpG-Insel in der Region chr3:39,051,979-39,052,534 lokalisiert, mit einer Länge von 556 bp und mit einer Anzahl von 57 CpGs (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Da die untersuchte

CpG-Position des Locus SCN11A1 bereits als Methylierungsstelle bekannt ist und sich in einer sogenannten *Promotor flanking Region* sowie in der Nähe einer großen CpG-Insel befindet, war es wahrscheinlich, dass sich dieser Locus sehr gut für eine Methylierungsanalyse eignet. Bei der Interpretation der Methylierungsergebnisse ist dennoch zu berücksichtigen, dass sich SCN11A1 nicht direkt in der *Promotor*-Region des Gens SCN11A befindet und es in eben jener *Promotor*-Region eine bekannte, große CpG-Insel gibt, welche sich eventuell ebenfalls für eine Methylierungsanalyse geeignet hätte. In dieser CpG-Insel gab es jedoch keine bereits bekannte Methylierungsstelle und auch hier musste die *Designbarkeit* der *Primer* mitbedacht werden. Ferner fand sich im Nachhinein bei weiteren Recherchen auch in der *Promotor*-Region des Gens eine bereits bekannte Methylierungsstelle an der Position chr3:39,054,994 (GRCh37/hg19). Diese wäre ebenfalls ein möglicher Ansatzpunkt für die Suche nach einem epigenetischen Biomarker bei SFN.

In der genannten *Promotor flanking Region* gibt es, abgesehen von der bei SCN11A1 untersuchten Methylierungsstelle, zudem noch eine weitere bekannte Methylierungsstelle an der Position chr3:38,991,907 (GRCh37/hg19), welche sich ebenfalls für eine Methylierungsanalyse eignen könnte.

Die für diese Arbeit ausgewählten und untersuchten Loci mit ihren potenziellen Methylierungsstellen wurden alle aufgrund ihrer entsprechenden Lage im Gen sowie ihres Status als z.T. bereits bekannte Methylierungsstelle ausgesucht und eigneten sich daher sehr gut für eine Methylierungsanalyse. In weiterführenden Untersuchungen könnten zudem auch andere Loci und CpG-Positionen, wie beispielsweise die bereits erwähnten, die sich ebenfalls gut für eine Methylierungsanalyse eignen, zu aussagekräftigen Ergebnissen führen.

Die Methylierungsanalyse von DNA-Sequenzen durch Bisulfit-Konversion mit anschließender Sequenzierung ist eine gut etablierte Methode und ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Methylierung sowie die Analyse von Methylierungsmustern. Die Voraussetzung für ein aussagekräftiges Ergebnis dieser Methode ist die vollständige Umwandlung aller nicht-methylierten Cytosine in Uracil sowie der Erhalt aller methylierten Cytosine. Bei zu häufiger unvollständiger Konversion würde es, durch Interpretation der fälschlicherweise nicht umgewandelten unmethylierten Cytosine als methylierte, zu einer erhöhten Rate an falsch positiven Ergebnissen kommen (Wreczycka et al., 2017). In der Regel ist eine Umwandlungseffizienz von 95-98 % ausreichend (Warnecke et al., 2002). Für ein hochqualitatives Experiment wird jedoch eine Umwandlungseffizienz von möglichst 99,5 % oder höher empfohlen (Wreczycka et al., 2017). Die Umwandlungseffizienz der Kontroll-Proben dieser Arbeit betrug mindestens 98,76 %, neun der zwölf Proben zeigten eine Umwandlungsrate von über 99,5 %. Die Umwandlungseffizienz der Plasma-Patienten-Proben betrug mindestens 99,48 %, fünf der sechs Proben wiesen eine Umwandlungseffizienz von über 99,5 % auf. Bezüglich der Kontroll-Proben sowie der Plasma-Patienten-Proben kann somit von einem aussagekräftigen Methylierungsergebnis ausgegangen werden. Bei den Biopsie-Proben ließ

ich die Umwandlungseffizienz der Bisulfit-Konversion jedoch nicht ermitteln. Dies könnte an der insgesamt geringeren Qualität der Biopsie-Proben liegen, welche sich in der Auswertung der jeweiligen Chromatogramme sowie der erschwerten PCR-Amplifikation der Proben zeigte.

Um die Umwandlungseffizienz zu ermitteln, wurde für jeden Locus die jeweilige Anzahl an Cytosinen herangezogen, die nicht Teil eines CpG-Dinukleotids waren. Bei SCN9A1 gab es 23 solcher Cytosine, bei SCN9A2 waren es 13, bei SCN10A2 waren es 26 und bei SCN11A1 waren es 22 Cytosine.

Bei der Bisulfit-Konversion gibt es diverse Limitationen, die die Qualität und die Effizienz der Umwandlung sowie die Analyse der Methylierungsergebnisse beeinflussen und auch beeinträchtigen können. Eine mögliche Störquelle ist, laut Wreczycka et al. (2017), dass die Qualität des *base calling* nicht konstant ist. Dies bedeutet, dass die Zuordnung der Base eines Nukleotids zu dem entsprechenden Peak des Chromatogramms fehlerhaft sein kann (Wreczycka et al., 2017). Die Qualität des *base calling* in dieser Arbeit war meist gut ($\geq 80\%$), Sequenzen mit zu geringer Qualität wurden bei der Analyse mittels des Sequencher Programms nicht miteingeschlossen. Eine Häufung von Sequenzen geringer Qualität fand sich vor allem bei den Biopsie-Proben und auch beim Locus SCN9A2 der Plasma-Probe P1 sowie der Loci SCN9A1 und SCN9A2 der Proben K2 und K3. Zeigte die Sequenz im Chromatogramm an der untersuchten CpG-Position sowohl einen C- als auch ein T-*Peak*, beide eindeutig gegenüber dem Hintergrund-*Peak* erhoben, so kann dies bedeuten, dass zwei Einzelklone zusammen sequenziert wurden.

Es gibt weitere mögliche Ursachen für Sequenzen, die bei der Auswertung der Chromatogramme eine geringe Qualität zeigen, so kann dies beispielsweise auch als Folge der Bisulfit-Konversion geschehen. Laut Warnecke et al. (2002) kann die Detektion von DNA-Methylierungen mittels Bisulfit-Konversion z.B. durch die Präsenz kurzer Strecken von doppelsträngiger DNA beeinträchtigt werden, welche ebenfalls zu einer Fehlinterpretation im Sinne von falsch-positiven Ergebnissen führen können. Diese entsteht entweder durch eine unvollständige Auftrennung in Einzelstränge oder durch ein *Re-Annealing* im Verlauf der Bisulfit-Reaktion. Das Risiko für die Entstehung von doppelsträngigen DNA-Strecken steigt v.a. bei repetitiven Sequenzen oder bei der Nutzung einer zu großen Menge an DNA für die Reaktion. Die Nutzung einer zu großen DNA-Menge kann außerdem zu der Erschöpfung des Bisulfits im Reaktions-Mix führen und dadurch die Bisulfit-Konversion stören. Dies wäre jedoch anhand der Ermittlung der Bisulfit-Konversion auffällig geworden, da die Umwandlung von Cytosinen, die nicht benachbart zu Guanin-Nukleotiden liegen, ebenfalls gestört gewesen wäre. Aufgrund der hohen Effizienz der Bisulfit-Konversion der Kontroll-Proben und der Plasma-Patienten-Proben (mindestens 98,76 %) ist dies im vorliegenden Fall auszuschließen. Bei den Biopsie-Proben hingegen konnte die Effizienz der Bisulfit-Konversion nicht ermittelt werden, sodass diese Möglichkeit bei jenen Proben nicht ausgeschlossen werden

kann. Dies kann schon ab einer Menge von $>10 \mu\text{g/ml}$ genomischer DNA auftreten. Um die Entstehung doppelsträngiger DNA-Strecken innerhalb der untersuchten Sequenzen zu vermeiden, sollte die Bisulfit-Reaktion wenigstens teilweise bei einer Temperatur von 95°C ablaufen sowie zuvor bestenfalls eine Fragmentierung der DNA z.B. durch Restriktionsenzyme stattgefunden haben (Warnecke et al., 2002). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch den ersten Schritt der Bisulfit-Konversion gewährleistet, bei welchem eine Denaturierung der Proben in Einzelstränge bei 98°C für 8 min im *Thermocycler* stattfand.

Ferner können Sequenzen existieren, die gegenüber einer Bisulfit-Konversion resistent sind (Warnecke et al., 2002).

Durch die Bisulfit-Konversion kann es zudem zu einer Degradierung der DNA kommen. Diese wird v.a. durch lange Inkubationszeiten und hohe Bisulfit-Konzentrationen begünstigt und kann zu einer Degradierung von bis zu 90 % der inkubierten DNA führen (Wreczycka et al., 2017). Dies kann anschließende PCR-Verfahren erschweren oder zu frustrierten Ergebnissen führen.

Laut Warnecke et al. (2002) sollten für die PCR-Amplifikation der Bisulfit-konvertierten DNA *Primer* verwendet werden, die keine CpG-Regionen enthalten und daher unabhängig von ihrem Methylierungsmuster amplifizieren, da alle Cytosine als Uracil vorliegen. Dies ist wichtig, da Bisulfit-konvertierte DNA relativ fragmentiert vorliegt, eine unübliche Basen-Komposition aufweist und die CpG-Positionen methyliert oder unmethyliert vorliegen können. Um die Chance auf eine erfolgreiche PCR zu erhöhen, sollten *Primer* außerhalb von CpG-Regionen lokalisiert sein und es musste zudem darauf geachtet werden, dass die *Primer* in DNA-Bereichen mit ausgewogener Basen-Komposition ohne übermäßig langen T-Strecken liegen. Weiterhin sollten möglichst *nested* PCRs genutzt werden, die PCR-Produkte $<300 \text{ bp}$ groß sein und die Reaktionsbedingungen optimiert werden, (z.B. *Annealing*-Temperaturen von $45\text{--}55^\circ\text{C}$) (Warnecke et al., 2002). Dies wurde bei dem *Design* der *Primer* sowie den PCR-Reaktionen im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt (siehe Abschnitt 3.4.1, Tabelle 18 und Tabelle 20). Es wurden daher nur *nested*-PCRs genutzt, da sich im Verlauf ausschließlich diese PCR-Reaktionen erfolgreich zeigten.

Im Rahmen einer Agarose-Gelelektrophorese wurde anschließend die Spezifität der PCR-Amplifikation geprüft. Es wurden nur *Primer* von Sequenzen verwendet, die in der Gelelektrophorese keine Nebenprodukte zeigten, bei welchen es sich ausschließlich um *nested*-PCRs handelte. Die Blutplasma-Proben ließen sich generell gut amplifizieren. Bei den Biopsie-Proben gestaltete sich die Amplifikation deutlich erschwert. Zunächst konnte nur die PCR von SCN10A2 und SCN11A1 der Probe P2 Biopsie erfolgreich durchgeführt werden. Da sich diese PCR direkt an die Isolation der DNA mittels des „EZ DNA Methylation-Direct™ Kits“ aus den Hautstanzen sowie der darauffolgenden Bisulfit-Konversion anschloss, ist davon auszugehen, dass die Proben noch nicht rein genug waren und noch durch Proteine und

andere Reste der Hautstanze verunreinigt waren. Daher wurden diese DNA-Proben schließlich noch einer Aufbereitung durch das „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche) unterzogen. Danach zeigte sich die PCR-Amplifikation zwar verbessert, es ließen sich dennoch nicht alle Loci erfolgreich amplifizieren. Möglicherweise war trotz der *Purification* die Verunreinigung noch zu stark, oder die DNA nach Isolation, *Purification* und v.a. Bisulfit-Konversion ggf. schon zu stark degradiert, sodass die Menge an für die Untersuchungen nutzbarer DNA zu gering war. Eventuell hätte auch die Menge der bei der Bisulfit-Konversion eingesetzten DNA variiert oder die Dauer der Denaturierung bei 98 °C im Rahmen der Bisulfit-Konversion verlängert werden können, da auch dies Einfluss auf die anschließende PCR-Amplifikationen haben und diese beeinträchtigen kann. Betrachtet man die Werte der Plasma-Proben bei der Messung mittels *NanoDrop* (siehe Tabelle 5 und 6), so sind v.a. die Werte des Quotienten von A260/A280 interessant, welche eine Aussage zu der Reinheit der Proben bzw. deren Kontamination erlauben. Laut Hauk (2003) zeigen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, die Messung des Werts bei 280 nm erfolgt zur Bestimmung der Reinheit. Ist der Quotient aus A260/A280 bei Werten >1,8, so spricht das für eine hohe Reinheit der Probe, sind die Werte kleiner als 1,8 so kann dies ein Hinweis auf eine mögliche Kontamination mit z.B. Proteinen sein (Hauk, 2003). Bei den *NanoDrop*-Messungen zeigten sich v.a. bei den Proben K1, K2, P1 und P2 bei dem Quotienten aus A260/A280 hohe Werte, die alle größer als 1,8 waren. Die Probe K3 hingegen zeigte einen Wert von 1,16 und könnte somit kontaminiert sein. Die Biopsie-Proben konnten keiner Messung mittels *NanoDrops* unterzogen werden, weshalb hier nur von der erschwerten PCR-Amplifikation der Proben sowie der Chromatogramme mit teils schlechter Qualität Rückschlüsse auf die Reinheit der Proben möglich waren. Von diesen Informationen ausgehend, kann bei den Biopsie-Proben von einer geringeren Reinheit bzw. einer größeren Kontamination als bei den Plasma-Patienten-Proben ausgegangen werden.

Die PCR-Produkte mit der korrekten Größe (siehe Tabelle 20) wurden im Anschluss an die *inner*-PCR in einen pGEM-T-Vektor ligiert und daraufhin in kompetenten *E. coli*-Zellen (XL 10-Gold-Bakterien) transformiert. Ohne den Schritt der Klonierung wäre die Auswertung der Sequenzierungen der Proben durch die Überlappung einzelner Nukleotidsignale (*Peaks*) u.U. nicht möglich gewesen. Außerdem können die ersten 10-50 bp einer Sequenz erfahrungsgemäß bei dem in dieser Arbeit genutzten DNA-Sequencer (3130-*Genetic-Analyzer*) durch starke Hintergrundsignale nur erschwert oder gar nicht gelesen werden. Indem der Schritt der Klonierung vor die Sequenzierung geschaltet wird, kann die Sequenzierreaktion an der DNA-Sequenz einschließlich der *Primer* aus dem Vektor durchgeführt werden. Die ersten 10-50 bp sind somit nicht aus der eigentlichen Zielsequenz stammend, sondern Teil des Vektors. Ist es nicht möglich diese zu lesen, kommt es daher dennoch nicht zu einem Informationsverlust bezüglich der eigentlich zu untersuchenden Region. Die Information eines DNA-Moleküls wird hier durch das *Insert* eines Einzelklons repräsentiert.

Die Klonierung zeigte sich bezüglich ihrer Effektivität durchwachsen. Bei den Loci SCN9A1 und SCN9A2 hatten ca. 70-80 % der Klone auf den Agarplatten das *Insert* nicht erfolgreich übernommen. Bei den anderen Loci lag die Quote bei ca. 20-50 %. Dafür können verschiedene Ursachen in Betracht kommen. Laut Mülhardt and Mülhardt (2013) kann eine mögliche Ursache eine fehlerhafte Blau-Weiß-Selektion sein. So kann bei dieser nur eine vermeintlich geringe Anzahl an Klonen ausgewählt werden, die das *Insert* erfolgreich übernommen haben, weil das *Insert* zu klein ist. Aufgrund der geringen Größe des *Inserts* entstehen noch kleine Mengen von dem sogenannten α -Fragment oder es kommt zu einem Fusionsprotein, obwohl die Klonierung erfolgreich war. Dieses kann die Funktion des α -Fragments dennoch ausüben und es kommt somit trotzdem zu einer Blaufärbung der Klone. Dann haben die Klone zwar erfolgreich das *Insert* übernommen, weisen aber dennoch eine blaue Färbung auf und werden fälschlicherweise als Klone angesehen, bei welchen die Transformation nicht erfolgreich war. Dies wäre v.a. bei dem Locus SCN9A1 eine potenzielle Ursache, da dieser mit 71 bp die mit Abstand kleinste untersuchte Sequenz aufwies. Eine weitere mögliche Ursache kann laut Mülhardt and Mülhardt (2013) die Qualität der Ligation sein. Um diese zu verbessern, kann u.a. das Verhältnis von *Insert* zu Vektor angepasst werden. Empfohlen wird, dass im Rahmen der Ligation bezüglich der Molekülanzahl ca. 3-4-mal mehr *Insert* im Ligationsansatz eingesetzt wird als Vektor. Auch die Menge an ATP im Ligationspuffer kann durch das Alter des Puffers oder eine längere Lagedauer bei 4°C vermindert sein und dadurch die Ligation beeinträchtigen (Mülhardt and Mülhardt, 2013). In diesem Fall war eine Modifikation der Ligation allerdings nicht zwingend notwendig, da dennoch bei den Kontrollproben je mindestens 109 Einzelklone selektiert wurden, bei den Plasma-Patienten-Proben je mindestens 182 und bei den Biopsie-Proben je mindestens 96 Einzelklone.

Die bei der Blau-Weiß-Selektion ausgewählten Einzelklone wurden schließlich mittels M13-PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Klone, welche in der Gelelektrophorese das PCR-Produkt der korrekten Größe aufwiesen, bei SCN9A1 307 bp, bei SCN9A2 349 bp, bei SCN10A2 340 bp und bei SCN11A1 341 bp, wurden anschließend sequenziert.

Die Bandenstärke der PCR-Amplifikate zeigte in der gelelektrophoretischen Auftrennung keine große Variation. Daher ist davon auszugehen, dass die Konzentration dieser Amplifikate stets auf einem ähnlichen Niveau war. Nebenprodukte zeigten sich nur vereinzelt und könnten ein Hinweis auf fehlerhaft eingebaute DNA-Fragmente oder auf *Primer-Dimer* sein (Mülhardt and Mülhardt, 2013). Ein kleiner Teil der amplifizierten Einzelklone zeigte im Rahmen der Gelelektrophorese keine Bande oder auch eine Bande, deren Größe (236 bp) darauf schließen lässt, dass das *Insert* nicht übernommen wurde (siehe Abbildung 17, blauer Pfeil). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass eine falsch positive Kolonie selektiert wurde. Diese wurden dementsprechend nicht sequenziert und weiter analysiert.

Durch die Sequenzierung einer großen Anzahl an Einzelklonen wird die statistische Aussagekraft erhöht, da die Wahrscheinlichkeit, dass die Methylierungsrate auf der zufälligen Aus-

wahl an Sequenzen beruht, somit minimiert wird. Bei den Kontroll-Proben wurden je mindestens 78 bis maximal 204 Amplifikate der Einzelklone sequenziert (siehe Tabelle 21). Bei den Plasma-Patienten-Proben wurden je mindestens 126 bis maximal 150 Amplifikate von Einzelklonen sequenziert (siehe Tabelle 22) und bei den Biopsie-Proben waren es je mindestens 48 bis maximal 52 (siehe Tabelle 23). Dies entsprach bei den Kontroll-Proben 48,39-98,08 % (siehe Tabelle 28). Die Probe SCN9A2 K3 zeigte hierbei den geringsten Wert, die Probe SCN10A2 K1 den größten Wert (siehe Tabelle 28). Bei den Plasma-Patienten-Proben entsprach der Anteil der sequenzierten Einzelklone an den amplifizierten Klonen 37,39-80,22 % (siehe Tabelle 28). Die geringsten Werte wiesen hierbei die Proben SCN9A2 P1 und SCN9A2 P2 auf, den größten Wert die Probe SCN11A1 P1 (siehe Tabelle 28). Der Locus SCN9A1 wurde bei den Plasma-Patienten-Proben nicht untersucht. Bei den Biopsie-Proben lag die Quote zwischen 26,09-91,30 % (siehe Tabelle 28). Die geringsten Werte wiesen hier die Loci SCN9A1 und SCN9A2 der Probe P2 Biopsie auf, gefolgt von der Probe SCN9A2 P1 Biopsie (siehe Tabelle 28). Den größten Wert zeigte die Probe SCN11A1 P3 Biopsie (siehe Tabelle 28). Dementsprechend war der Locus SCN9A2 bei fast allen Proben derjenige, bei welchem die Transformation die schlechteste Effizienz aufwies. Bei den restlichen Loci zeigte sich i.d.R. eine mittlere bis z.T. sehr gute Effizienz der Transformation. Es gibt diverse potenzielle Ursachen dafür, dass eine größere Anzahl an bei der Blau-Weiß-Selektion selektierten Einzelklonen in der M13-PCR nicht erfolgreich amplifizierbar waren. Laut Mülhardt and Mülhardt (2013) kann es beispielsweise zu einer fehlerhaften Selektion von zu schwach gefärbten und daher fälschlicherweise als farblos eingeschätzten Klonen kommen, wenn die Bakterien-Platten, nachdem sie aus dem Brutschrank genommen wurden, zu kurz bzw. nicht ausreichend lang im Kühlschrank inkubiert wurden und daher die Färbung noch nicht stark genug ausbilden konnten. Möglicherweise war auch die Menge an X-Gal in den Agar-Platten nicht ausreichend um eine entsprechend starke Färbung der Klone zu bewirken (Mülhardt and Mülhardt, 2013).

Von den genannten, der SAP- und Sequenzierreaktion unterzogenen Sequenzen waren bei den Kontroll-Proben je mindestens 69 auswertbar. Die geringste Rate an auswertbaren Sequenzen zeigte sich bei SCN9A1 der Probe K1 mit 70,41 % (siehe Tabelle 28). Die größte Rate zeigte sich bei SCN10A2 der Probe K2, bei welcher alle Sequenzen ausgewertet werden konnten (siehe Tabelle 28). Generell zeigte sich bei den Kontroll-Proben diesbezüglich je eine gute Quote. Bei den Plasma-Patienten-Proben wurden je mindestens 114 (90,48 %, bei SCN9A2 P1) Sequenzen ausgewertet, die höchste Rate an ausgewerteten Sequenzen fand sich mit 100 % bei SCN10A2 der Probe P1 (siehe Tabelle 28). Dementsprechend war die Rate der ausgewerteten Sequenzen an der Anzahl sequenzierter Klone sehr hoch. Bei den Biopsie-Proben betrug die Quote 73,08-100 % (siehe Tabelle 28). Die geringste Rate zeigte sich bei SCN11A1 der Probe P1 Biopsie, die höchsten Raten mit je 100 % fanden sich bei SCN11A1 der Proben P2 und P3 Biopsie (siehe Tabelle 28). Es wurden je mindestens 38

Sequenzen ausgewertet (siehe Tabelle 23). Es fand sich also auch bei den Biopsie-Proben jeweils ein hoher bis sehr hoher Anteil auswertbarer Sequenzen an der Anzahl der sequenzierten Klone. Der Anteil an auswertbaren Sequenzen war für diese Arbeit somit insgesamt bei allen Proben zur Analyse der Methylierungsunterschiede ausreichend.

Bei der Auswertung der sequenzierten Sequenzen mit dem *Software-Programm Sequencher™ Version 5.10.1* zeigten sich z.T. Chromatogramme, die sich schlecht oder auch gar nicht auswerten ließen. Bei manchen Sequenzen fanden sich beispielsweise so starke Überlagerungen von Signalen, dass diese von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Laut Mülhardt and Mülhardt (2013) kann dies z.B. durch im Rahmen der SAP-Reaktion nicht ausreichend aus den M13-PCR-Proben entfernte, nicht eingebaute Nukleotide oder *Primer* geschehen, die dann im Rahmen der Sequenzierreaktion markiert werden und einen starken Hintergrund bewirken können. Weitere mögliche Ursachen für schlecht oder nicht auszuwertende Chromatogramme können sein, dass die Qualität der Synthese gering war oder dass es im Rahmen der Fällung einen starken Verlust an DNA-Fragmenten gab. Auch eine zu geringe Menge an eingesetzter *Template*-DNA stellt eine potenzielle Ursache dar (Mülhardt and Mülhardt, 2013).

Tabelle 28: Übersicht über den Anteil sequenzierter Klone an der Anzahl der selektierten Einzelklone sowie über den Anteil der ausgewerteten Sequenzen an den sequenzierten Einzelklonen bei allen Loci aller Proben.

	Anteil sequenzierter Klone an selektierten Einzelklonen	Anteil ausgewerteter Sequenzen an sequenzierten Einzelklonen
SCN9A1 K1	71,56 %	89,74 %
SCN9A2 K1	62,69 %	98,35 %
SCN10A2 K1	98,08 %	95,42 %
SCN11A1 K1	72,76 %	96,06 %
SCN9A1 K2	79,49 %	91,94 %
SCN9A2 K2	60,26 %	87,23 %
SCN10A2 K2	51,76 %	100 %
SCN11A1 K2	62,88 %	96,99 %
SCN9A1 K3	65,33 %	70,41 %
SCN9A2 K3	48,39 %	81,11 %
SCN10A2 K3	92,47 %	94,81 %
SCN11A1 K3	89,47 %	96,57 %
SCN9A2 P1	37,39 %	90,48 %
SCN10A2 P1	78,13 %	100 %
SCN11A1 P1	80,22 %	97,95 %
SCN9A2 P2	38,04 %	97,86 %

SCN10A2 P2	70,83 %	98,53 %
SCN11A1 P2	72,92 %	97,14 %
SCN9A1 P1 Biopsie	72,83 %	/
SCN9A2 P1 Biopsie	61,96 %	/
SCN10A2 P1 Biopsie	68,48 %	78,85 %
SCN11A1 P1 Biopsie	89,13 %	73,08 %
SCN9A1 P2 Biopsie	35,33 %	96,15 %
SCN9A2 P2 Biopsie	26,09 %	88,46 %
SCN10A2 P2 Biopsie	90,22 %	98,08 %
SCN11A1 P2 Biopsie	90,22 %	100 %
SCN10A2 P3 Biopsie	78,26 %	80,77 %
SCN11A1 P3 Biopsie	91,30 %	100 %

Insgesamt lässt sich aus der Diskussion der methodischen Aspekte schließen, dass die untersuchten Genloci alle aufgrund ihrer Lage im Gen sowie teilweise bereits bekannten Methylierungsstellen gut für die Methylierungsanalyse und Suche nach einem epigenetischen Biomarker geeignet waren. Zudem gab es jedoch weitere Loci, die sich ebenfalls für eine Methylierungsanalyse geeignet hätten. Aufgrund der höheren Spezifität der *nested* PCRs, wäre es effizienter gewesen, von Beginn an ausschließlich solche zu testen, da die einfachen PCRs im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich amplifizierbar gewesen waren. Die Effizienz der Bisulfit-Konversion war bei den Kontroll-Proben mit mindestens 98,76 % und Plasma-Patienten-Proben mit mindestens 99,48 % sehr gut, sodass von einem aussagekräftigen Methylierungsergebnis ausgegangen werden konnte. Allerdings konnte bei den Biopsie-Proben die Effizienz der Bisulfit-Konversion nicht ermittelt werden, sodass es bei diesen die Umwandlung aller nicht-methylierten Cytosine in Uracil bei gleichzeitigem Erhalt aller methylierten Cytosine gestört gewesen sein konnte und damit die Ergebnisse der Methylierungsanalysen nicht die Aussagekraft aufwiesen, wie sie es bei den Kontroll- und Plasma-Patienten-Proben hatten. Der Fokus der Untersuchungen lag allerdings auf dem Vergleich der Kontroll-Proben mit den Patienten-Proben, sodass die zentralen Ergebnisse verlässlich waren. Bei den Biopsie-Proben hätte zudem ein weiterer *Purification*-Schritt erfolgen können, da diese zum einen erschwert amplifizierbar waren und zum anderen bei der Auswertung der Chromatogramme vermehrt eine geringe Qualität des *base callings* aufwiesen. Eine Modifikation der Ligation war für diese Arbeit zwar nicht nötig gewesen, da dennoch eine ausreichend große Anzahl an Klonen das Insert erfolgreich übernommen hatte und bei der Blau-Weiß-Selektion selektiert werden konnte. Dennoch könnte eine Verbesserung des Ligationsvorgangs eine Steigerung der Effizienz sowie eine höhere Quote an weißen Klonen bewirken. Zudem könnte eine längere Inkubationszeit der Bakterien-Platten im Kühlschrank,

nachdem sie aus dem Brutschrank genommen wurden, die Blau-Weiß-Selektion verbessern, da die Ausprägung der Blau-Färbung dann stärker hervortritt. Allerdings ergab sich im Rahmen dieser Arbeit auch ohne die genannten Modifikationen der Methoden je Locus eine große Anzahl auswertbarer Sequenzen.

Es wurden die zuvor genannten Sequenzen der Loci SCN9A1 (bei den Proben K1, K2, K3 und P2 Biopsie), SCN9A2 (bei den Proben K1, K2, K3, P1, P2 und P2 Biopsie), SCN10A2 (bei den Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie) und SCN11A1 (bei den Proben K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie) sequenziert und ausgewertet. Diese Gene sind alle C-Faser-spezifisch und codieren für Untereinheiten von spannungsgesteuerten Natrium-Kanälen.

6.2 Analyse der individuellen Patienten-Informationen

Kontroll-Proben:

Bezüglich der Kontroll-Proben ist hervorzuheben, dass es sich bei einer der drei Proben (K2) um einen Mann handelt, die anderen beiden stammen von weiblichen Personen. Die Kontroll-Person der Probe K1 war schwanger. Die Person, von welcher die Probe K3 war, war anderer ethnischer Herkunft als die beiden anderen Kontroll-Proben. Somit gab es einige Unterschiede zwischen den drei Kontrollen. Dies schuf zwar eine größere Diversität, bedeutete jedoch auch, dass die jeweiligen Unterschiede Einfluss auf die Methylierungsverhältnisse der Proben haben könnten. Denn das Profil der DNA-Methylierung hängt auch mit dem Geschlecht und der Ethnie zusammen und weist somit individuelle Unterschiede auf (Gai and Sun, 2019). Zudem kommt es im Verlauf der Schwangerschaft zu Veränderungen in der DNA-Methylierung der Mutter, u.a. Bereiche betreffend, die für die Regulation von Komponenten des Immunsystems zuständig sind (Das and Maitra, 2021). Den drei Kontrollen gemein war jedoch, dass es sich um gesunde junge Menschen, ohne Vorerkrankungen oder Medikationen handelte, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung der Methylierungsverhältnisse durch diese minimiert wurde.

Patienten-Proben:

Die Patienten, deren Plasma- und Biopsie-Proben untersucht wurden, wiesen ebenfalls deutliche Unterschiede untereinander auf. Der Patient, von welchem die Plasma-Probe P1 (= Biopsie-Probe P2) stammte, wies ein Prostata-CA in der Vorgeschichte auf. Die Patientin, von der die Biopsie-Probe P1 (keine Plasma-Probe untersucht, s.u.) stammte, wies einen Diabetes Mellitus Typ 1 auf, zudem bestand der Verdacht auf eine Hashimoto Thyreoiditis.

Bei dem Patienten der Plasma-Probe P2 (= Biopsie-Probe P3) hingegen waren keine Vorerkrankungen bekannt. Es ist nicht auszuschließen, dass Vorerkrankungen einen Einfluss auf das Profil der DNA-Methylierung haben. Zudem unterschied sich die Symptomatik der Patienten und auch deren IENFD. Der Patient der Plasma-Probe P1 wies mit $3/\text{mm}^2$ (Normwert: $13\pm 5/\text{mm}^2$) die geringste IENFD auf, auch wenn P2 der Plasma-Proben mit einer IENFD von $4/\text{mm}^2$ dicht folgte. Bei den Patienten der Plasma-Probe P1 und der Biopsie-Probe P1 waren sowohl die oberen als auch die unteren Extremitäten betroffen und sie bedurften einer medikamentösen Schmerztherapie aufgrund der neuropathischen Schmerzsymptomatik. Der Patient der Plasma-Probe P2 hingegen wurde nach Patientenwunsch nicht medikamentös therapiert und zeigte die Symptomatik ausschließlich an der unteren Extremität. Somit war es möglich, dass sich die drei Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht im gleichen Krankheitsstadium befanden. Zudem konnte bei der Patientin zu Biopsie-Probe P1 die Diagnose der SFN nicht gestellt werden, da sie trotz passender Symptomatik mit einem Wert von $17/\text{m}^2$ (Normwert: $13\pm 5/\text{mm}^2$) keine Reduktion der IENFD zeigte. Aufgrund dessen wurde bei dieser Patientin auch keine Methylierungsanalyse des Blutplasmas vorgenommen.

6.3 Analyse der DNA-Methylierungsunterschiede

Die Loci SCN9A1, SCN9A2, SCN10A2 und SCN11A1 wurden bei den Kontroll-Proben, den Plasma-Patienten-Proben (bis auf SCN9A1) und den Biopsie-Proben untersucht. Dabei wurden drei Ebenen der Methylierung analysiert, das Methylierungslevel, das Methylierungsmuster und der Methylierungs-*content*.

Laut der Hypothese dieser Arbeit müssten die untersuchten CpG-Dinukleotide bei den Blutplasma-Proben der an SFN erkrankten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen eine verminderte Methylierung zeigen, da bei den SFN-Patienten vermehrt C-Fasern untergehen. Somit sollte ein höherer C-Faser-DNA-Anteil an der cfDNA im Blutplasma der Patienten bestehen. Da die untersuchten Gene in C-Fasern aktiv sind, müsste somit eine Hypomethylierung vorliegen. In anderen Geweben hingegen müssten diese Gene verstärkt methyliert und somit stillgelegt sein. Folglich sollten sich diese Ergebnisse auch bei der Analyse der cfDNA von gesunden Kontroll-Personen zeigen.

6.3.1 Methylierungs-*content*

Der Methylierungs-*content* beschreibt den Gesamtgehalt der Methylierungsinformationen (Siegmund and Laird, 2002). Dieser ermöglicht eine erste Einschätzung der vorliegenden Methylierungsverhältnisse, welche anhand der anschließenden Diskussion der Methylierungslevel und -muster tiefergehend exploriert wird. Im Folgenden werden die Ergebnisse

des Methylierungs-*contents* der Kontroll-, der Plasma-Patienten- und der Biopsie-Proben sowie der einzelnen Loci diskutiert.

Die Daten des Methylierungs-*contents* zeigten, dass der Locus SCN9A1 bei allen untersuchten Proben den geringsten Methylierungsgehalt (insgesamt 1,99 %) aufwies. Dies könnte möglicherweise dadurch begründet sein, dass dieser Locus entweder nicht nur in C-Fasern, sondern auch in anderen Geweben vorwiegend unmethyliert vorliegt, dass er sich im Bereich des Transskriptionsstarts befindet oder die Methylierung der hier untersuchten CpG-Positionen für die Genregulation nicht relevant war (Chatterjee and Vinson, 2012); Altmeyer, 2021). Bei Betrachtung des Methylierungs-*contents* der Kontroll-Proben im Vergleich zu den Biopsie-Proben fiel zwar ein geringer Unterschied auf, d.h. die Kontroll-Proben waren mit 2,38 % in ihrer Gesamtheit geringfügig stärker methyliert als die vollständig unmethylierten Biopsie-Proben. Doch die Analyse der Methylierungslevel und -muster gab Aufschluss darüber, dass dieser Unterschied v.a. aufgrund der Kontrolle K3 zustande kam und nicht aufgrund eines eindeutigen und aussagekräftigen Trends. Anhand der Ergebnisse der Untersuchung des Methylierungs-*contents* konnte somit vermutet werden, dass sich der Genlocus SCN9A1 nicht als epigenetischer Biomarker für SFN eignet. Da eine relevante Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben aufgrund der sehr geringen Methylierung der Kontrollen nicht möglich war, was jedoch für einen epigenetischen Biomarker gegeben sein müsste, wurden diese bei SCN9A1 nicht untersucht. Allerdings zeigte sich die untersuchte Biopsie-Probe mit den Kontroll-Proben auf einem ähnlichen Methylierungs-Niveau. Dies entsprach den Erwartungen, da die Biopsie-Proben als zusätzliche Kontrolle die Methylierungsverhältnisse des epidermalen und dermalen Gewebes abbildeten und sich daher auf einem ähnlichen Methylierungs-Niveau wie die Kontrollen befinden sollten.

Bei Betrachtung des Methylierungsgehalts der einzelnen Proben bei SCN9A2 fiel auf, dass die Plasma-Patienten-Proben mit 63,35 % gegenüber den Kontroll-Proben mit einem Methylierungs-*content* von 68,98 % hypomethyliert waren. Dieser Unterschied war zwar nur gering, würde aber der Hypothese dieser Arbeit entsprechen. Der Unterschied zwischen den Kontrollen sowie auch den Plasma-Patienten-Proben und der Biopsie-Probe hingegen, welche einen Methylierungs-*content* von 0 % aufwies, war sehr groß. Da die Biopsie-Proben jedoch als weitere Kontrolle fungierten und die Methylierungsverhältnisse der epidermalen und dermalen Zellen darstellten, hätte eigentlich eine Annäherung dieser Werte zu den Blutplasma-Kontroll-Proben erfolgen sollen. Dies war hier nicht der Fall. Dies könnte ggf. durch die ausschließliche Amplifikation von akzidentell an dieser Sequenz unmethylierten DNA-Fragmenten verursacht sein.

Zusammengefasst war die Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontroll-Proben zwar nicht sehr groß, konnte jedoch trotzdem relevant sein, da anhand des Methylierungs-*contents* Methylierungsunterschiede zwischen den beiden Plasma-Patienten-

Proben sowie auch den Kontrollen untereinander nicht detektierbar sind. Im Rahmen der Auswertung der Methylierungslevel und -muster hingegen wurde deutlich, dass ebensolche Unterschiede zwischen den jeweiligen Proben bestanden. Daher war durch die Ergebnisse des Methylierungs-*contents* durchaus zu vermuten, dass sich der Genlocus SCN9A2 für die Bestimmung eines epigenetischen Biomarkers bei SFN eignen könnte.

Der Methylierungs-*content* des Locus SCN10A2 wies keinen eindeutigen Trend auf. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Methylierungslevel-Analyse zeigte sich, dass dies u.a. darauf zurückzuführen war, dass die Probe K3 mit einem Methylierungslevel von 0 % an der zweiten CpG-Position den Wert für den *content* der Kontroll-Proben deutlich verringerte. Dieser Wert unterschied sich deutlich von den Methylierungsleveln der anderen beiden Kontroll-Proben und könnte ggf. auf einen genetischen Polymorphismus zurückzuführen sein. Auch ohne Betrachtung der Ergebnisse der Probe K3 entsprach der Methylierungsgehalt der letzten beiden CpG-Positionen nicht dem erwarteten Trend. Denn es lag dennoch eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben vor, was durch die Analyse der Methylierungslevel gestützt wurde. Diese fiel jedoch nicht so deutlich aus, wie aufgrund der Werte des *contents* angenommen, bei welchem sich für die Plasma-Patienten-Proben eine Methylierung von 98,71 % und bei den Kontrollen von 85,17 % zeigte. Dies widersprach der Hypothese dieser Arbeit, nach welcher eine Hypomethylierung erwartet wurde.

Ein solcher Trend bezüglich einer Hypomethylierung des Methylierungs-*contents* der Plasma-Patienten-Proben fand sich ausschließlich an der ersten CpG-Stelle von SCN10A2. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den Plasma-Patienten-Proben war hierbei jedoch zu gering (1,41 %), um wirklich aussagekräftig zu sein. Somit bestand aufgrund des Methylierungs-*contents* die Vermutung, dass SCN10A2 keinen potenziellen epigenetischen Biomarker für SFN darstellt.

Bei Betrachtung der Werte des *contents* der Biopsie-Proben fand sich nur ein geringfügiger Unterschied dieser gegenüber den Kontroll-Proben. Anhand des *contents* könnte somit von einer Annäherung der Werte der Biopsie-Proben an die Kontrollen ausgegangen werden, bei Betrachtung der Ergebnisse der Methylierungslevel zeigte sich jedoch, dass ein deutlich stärkerer Unterschied vorlag als von den Werten des *contents* her ersichtlich, da die Probe K3 mit 0 % Methylierung an der zweiten CpG-Position den *content* der Kontrollen nach unten verzerrte.

Der Methylierungs-*content* des Genlocus SCN11A1 zeigte wieder ein Trend. Die Kontrollen waren mit 94,94 % etwas stärker methyliert als die Plasma-Patienten-Proben mit 91,04 %. Der *content* der Biopsie-Proben unterschied sich mit 88,73 % hingegen wieder von den Kontroll-Proben. Die Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen war zwar nicht sehr stark, ausgehend von den Ergebnissen des *contents* konnte dennoch vermutet werden, dass SCN11A1 für einen epigenetischen Biomarker bei SFN in Frage

kommen könnte. Anhand des Methylierungs-*contents* allein konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Proben detektiert werden, sodass auch hier eine tiefergehende Untersuchung der Methylierungsverhältnisse nötig war. Bei der Analyse des Methylierungslevels jedoch zeigte sich ebenfalls eine Hypomethylierung (von P1) und bestätigte somit die Ergebnisse des Methylierungs-*contents*.

Bei der Interpretation der Methylierungsinformationen sollte der Fokus auf die Ergebnisse aus der Analyse der Methylierungslevel und -muster gelegt werden, da hierbei auch die individuellen Informationen erkenntlich sind und der Methylierungs-*content* diese nicht wiedergeben vermag. Durch die Betrachtung der Proben und CpG-Positionen als Gesamtheit kann hingegen u.U. ein verfälschter Gesamteindruck vermittelt werden. Daher eignet sich der Methylierungs-*content* v.a. für eine Ersteinschätzung der Methylierungsverhältnisse und erfordert eine anschließende tiefergehende Betrachtung der Methylierungslevel- und -muster, damit eine valide Aussage getroffen werden kann.

6.3.2 Methylierungslevel

Bei der Analyse des Methylierungslevels wird die Häufigkeit von Methylierungen an individuellen CpG-Positionen betrachtet, ohne diese in einen direkten Kontext mit benachbarten CpG-Dinukleotiden und deren Methylierungsstatus zu bringen (Laird, 2003). Im Folgenden werden die Methylierungslevel der einzelnen CpG-Positionen der jeweiligen Genloci analysiert.

SCN9A1

Der Genlocus SCN9A1 beinhaltet drei CpG-Positionen, diese wurden bei allen drei Kontrollproben und bei der Probe P2 Biopsie untersucht. Alle drei untersuchten CpG-Positionen liegen in der Promotor-Region des Gens, die zweite ist bereits als Methylierungsstelle bekannt.

Das erste CpG-Dinukleotid war bei den Proben K1, K3 sowie bei der Biopsie-Probe vollständig unmethyliert und bei der Probe K2 mit 1,77 % sehr gering methyliert.

Die zweite und dritte CpG-Position zeigten sich ebenfalls nur gering methyliert, wenn auch stärker als die erste CpG-Position. Bei beiden war die Biopsie-Probe erneut vollständig unmethyliert und die Probe K3 wies mit jeweils 10,14 % die stärksten Methylierung auf.

Diese Ergebnisse stützten die Erkenntnisse, die aus der Untersuchung des Methylierungs-*contents* gewonnen wurden. Der geringfügige Unterschied des *contents* der Kontrollen zu dem der Biopsie-Probe konnte anhand der Methylierungslevel auf die Methylierung der Pro-

be K3 (10,14 %) an den letzten beiden CpG-Positionen zurückgeführt werden. Zu den anderen beiden Kontroll-Proben hingegen zeigte sich kein relevanter Unterschied.

Da alle drei potenziellen Methylierungsstellen nur sehr gering bis gar nicht methyliert vorliegen, besteht die Möglichkeit, dass diese regulatorische Einheit vorwiegend aktiviert vorliegt und das nicht nur in C-Faser-DNA, sondern auch in der DNA von Zellen anderer Herkunft. Laut Altmeyer (2021) wird das Gen SCN9A zwar hauptsächlich im peripheren Nervensystem exprimiert, allerdings kommt der Natriumkanal in geringem Maße auch in glatten Muskelzellen der Pulmonal- und Koronararterien sowie im Bronchialsystem und auch in subkortikalen Bereichen des zentralen Nervensystems vor. Bei Themistocleous et al. (2014) wurde beschrieben, dass A δ - und C-Fasern zudem auch Strukturen wie Schweißdrüsen, Blutgefäße und das Herz innervieren, worin auch die dysautonomen Komponenten, die bei SFN auftreten können, begründet sind. Da es sich bei den Personen zu den Kontrollen um gesunde Individuen handelt, müsste der größte Anteil an cfDNA aus Geweben anderer Herkunft stammen, v.a. des hämatopoetischen Systems und nicht aus Nervenfasern, Blutgefäßen, Schweißdrüsen oder Bronchialsystem stammen (Rahat et al., 2020). Laut aktuell bekannter Informationen wird SCN9A dort jedoch nicht exprimiert. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass die regulatorische Einheit des Gens SCN9A vorwiegend aktiv vorliegt.

Wie u.a. bei Chatterjee and Vinson (2012) beschrieben, liegen nur ca. 15 % aller CpG-Stellen des menschlichen Genoms unmethyliert und somit transkriptionell aktiv vor. Vor allem Transkriptionsstart- und Endpunkte sind eher unmethyliert und *Introns* sind seltener methyliert als *Exons* (Chatterjee and Vinson, 2012). Daher kann eine mögliche Begründung für die geringe bis fehlende Methylierung von SCN9A1 sein, dass sich die in dieser Sequenz enthaltenen CpG-Positionen bspw. am Transskriptionsstartpunkt befinden.

Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass wie bei Galetzka et al. (2022) in einer Studie zur Hypermethylierung des Introns 2 von RAD9A bei kindlichen Tumoren beschrieben, eine fehlende Methylierung bzw. Hypomethylierung der untersuchten CpG-Positionen die Bindung eines Transkriptionsrepressors ermöglicht, welcher die Genexpression unterdrückt. Durch eine Hypermethylierung der besagten CpG-Dinukleotide hingegen wird die Bindung des Transkriptionsrepressors gestört, was eine Aktivierung der Genexpression zur Folge hat (Galetzka et al., 2022). Sollte dies bei SCN9A1 auch der Fall sein, so wäre dies eine Begründung für die geringe Methylierung des Locus bei allen Kontrollen sowie der Biopsie-Probe. Da SCN9A v.a. in C-Fasern exprimiert wird und nicht in den Zellen, die mehrheitlich in den untersuchten Kontroll-Versionen vorkamen und es somit in diesen der Hypothese nach vermehrt inaktiviert vorliegen würde, wäre eine geringe bis fehlende Methylierung der Proben nötig, damit ein Transkriptionsrepressor binden kann und die Genexpression unterdrückt. Allerdings müsste eine Methylierungsanalyse der Plasma-Patienten-Proben von SCN9A1 erfolgen, um dies zu klären. Sollte bei diesen eine stärkere Methylierung vorliegen

als bei den Kontroll-Proben und der Biopsie-Probe, so wäre dies ein Hinweis für eine mögliche Bindestelle eines Transkriptionsrepressors.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Methylierung wäre, dass diese CpG-Stellen des Promotors nicht für die Regulation der Genaktivität zuständig sind.

Auffällig war bei SCN9A1 das Methylierungslevel der Probe K3 bei den letzten beiden CpG-Positionen, welches sich deutlich von dem der beiden anderen Kontrollen abhob. Betrachtete man die individuellen Informationen über die Probanden, so zeigte sich für die Probe K3 kein eindeutiger Hinweis, der dies erklären könnte. In Bezug auf das Alter war der Unterschied zu den anderen beiden Kontrollen nicht groß und die Probe K1 war ebenfalls weiblich. Bei keiner der drei Kontroll-Personen waren Vorerkrankungen bekannt und es bestanden keine Medikationen. Lediglich die ethnische Herkunft unterschied sich bei K3. Allerdings fiel bei der Messung der DNA mit dem *NanoDrop* auf, dass die Probe eine geringe Reinheit aufwies und ggf. kontaminiert sein könnte. So könnte der Unterschied in den Methylierungsleveln zwischen dieser und den beiden anderen Kontroll-Proben u.U. dadurch bedingt sein.

Die Biopsie-Proben sollten die Methylierungsverhältnisse der epidermalen und dermalen Zellen abbilden und eine weitere Kontrolle darstellen. Es wurde daher erwartet, dass sie sich in ihren Werten der Methylierungsverteilung der Blutplasma-Kontrollen annähern. Bei diesem Locus stand lediglich eine Biopsie-Probe als Vergleichswert zur Verfügung, da er bei den anderen beiden Biopsie-Proben im Rahmen der PCR nicht amplifizierbar (P3) oder durch zu geringe Qualität der Chromatogramme nicht auswertbar war (P1). Die im Rahmen der Methylierungsanalyse untersuchte Biopsie-Probe zeigte sich an allen drei CpG-Positionen vollständig unmethyliert und wies keinen großen Unterschied zu den Kontrollen aus dem Blutplasma (v.a. K1 und K2) auf. Somit wurde die Erwartung, dass sich die Werte dieser Proben annähern an dem Locus SCN9A1 bestätigt.

Insgesamt zeigten bei den drei CpG-Positionen je zwischen einer und sieben Sequenzen ein uneindeutiges Ergebnis bezüglich des Methylierungsstatus. Diese Anzahl war jedoch so gering, dass sie die Methylierungsanalyse nicht beeinträchtigte.

Dieser Genlocus wurde nach der Analyse des Methylierungslevels der Kontroll-Proben nicht mehr bei den Plasma-Patienten-Proben untersucht. Eine relevante Hypomethylierung dieser im Vergleich zu den Kontroll-Proben war somit nicht möglich. Genlocus SCN9A1 kommt daher als Biomarker für SFN nicht in Frage. Allerdings könnte eine Untersuchung dieser dennoch interessant sein, um herauszufinden, ob es sich bei SCN9A1 ggf. um eine Transkriptionsrepressor-Bindestelle handelt, wodurch es sich ggf. doch als epigenetischer Biomarker eignen könnte.

SCN9A2

Der Genlocus SCN9A2 wies ebenfalls drei CpG-Positionen auf. Er wurde bei allen Kontroll-Proben, bei beiden Plasma-Patienten-Proben und bei der Probe P2 Biopsie untersucht. Beim dritten CpG-Dinukleotid handelt es sich um eine bekannte Methylierungsstelle. Alle drei CpG-Positionen liegen wieder in der *Promotor*-Region des Gens.

Auch bei SCN9A2 wurde nur eine Biopsie-Probe untersucht (erneut P2), diese war an allen drei CpG-Stellen vollständig unmethyliert. An der ersten CpG-Position war die Probe K2 mit 69,51 % am stärksten methyliert und am geringsten die Probe P1 mit 38,60 %. Die anderen beiden Kontroll-Proben befanden sich mit 38,66 % sowie 45,21 % auf einem ähnlichen Level wie die Probe P1 und waren somit deutlich geringer methyliert als die Probe K2. Weiterhin war die Probe P2 mit 63,50 % am zweitstärksten methyliert. Um die Theorie dieser Arbeit zu stützen, sollte ein Trend vorliegen, bei welchem die Kontrollen stärker als die Plasma-Patienten-Proben methyliert sind, was hier nicht zutraf.

Bei der zweiten CpG-Position war die Probe P1 der Plasma-Patienten-Proben mit 43,86 % am geringsten methyliert. Weiterhin zeigte sich bei den Proben K1 und K2 eine starke Methylierung von je über 76 %. Allerdings war die Probe K3 mit 54,79 % zwar um ca. 11 % stärker methyliert als die Probe P1, aber deutlich geringer methyliert als die restlichen Kontrollen. Anhand der Werte der Kontrollen und der Probe P1 lässt sich dennoch ein Trend feststellen, der mit der Hypothese dieser Arbeit in Einklang zu bringen ist. Dem läuft einzig die Probe P2 zuwider, welche von allen Proben am stärksten methyliert war, sich somit auf einem annähernd gleichen Level wie die Kontrollen K1 und K2 zeigte und einen starken Kontrast zu der anderen Plasma-Patienten-Probe bildete.

Die dritte CpG-Position war als Methylierungsstelle bekannt. Hier zeigte sich bei den Kontroll-Proben ein klarer Trend, da diese mit über 83 % alle drei sehr stark methyliert waren. Im Gegensatz dazu war P1 mit 51,75 % am geringsten methyliert. Die dritte CpG-Position stimmte somit von allen untersuchten CG-Stellen am besten mit der Hypothese dieser Arbeit überein. Allerdings interferierte auch hier wieder die Probe P2 der Plasma-Patienten-Proben, welche erneut am stärksten methyliert war, sich mit den Kontroll-Proben auf einem annähernd gleichen Methylierungslevel befand und wieder einen deutlichen Unterschied zu P1 aufwies.

In der Untersuchung dieses Genlocus zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Plasma-Patienten-Proben. Dieser war bei der Analyse des Methylierungs-*contents* nicht ersichtlich gewesen und trat erst bei der Untersuchung der Methylierungslevel hervor. Bei Betrachtung der individuellen Informationen über die jeweiligen Probanden ließ sich feststellen, dass bei den beiden Patienten (P1 und P2) eine gesicherte SFN vorlag und beide männlichen Geschlechts waren. Der Patient P2 brauchte jedoch keine Medikation, wies eine geringfügig höhere IENFD auf und seine Beschwerden beschränkten sich auf die unteren

Extremitäten. Bei P1 hingegen waren auch die oberen Extremitäten betroffen und eine medikamentöse Therapie notwendig. Zudem war bei dem Patienten P1 im Vorfeld eine Tumorerkrankung bekannt, welche ebenfalls Einfluss auf die SFN und deren Schwere haben könnte. So führten Themistocleous, Ramirez et. Al (2014) als Ursache der SFN auch Paraneoplasien auf. Zudem wurden bei diversen Tumorerkrankungen bereits die Existenz onkoneuraler Antikörper beobachtet, welche Nervengewebe angreifen und so zu neurologischen Symptomen wie auch Neuropathien führen können (Graus et al., 2004, Senties-Madrid and Vega-Boada, 2001). Allerdings wurde dies v.a. beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, Mamma- und Ovarialkarzinom beschrieben, für das Prostata-Karzinom im Speziellen jedoch nicht (Kaiser, 1999). In der Beschreibung eines Einzelfalls, bei welchem bei einem Patienten mit Prostata-CA Pandysautonomen auftraten, wurden jedoch niedrige Titer besagter onkoneuraler Antikörper gefunden (Muccioli et al., 2020). Ferner kam es bei Patienten mit paraneoplastischer Neuropathie wohl meist eher zu einer PNP bzw. subakuten sensorischen oder sensomotorischen Neuropathie als zu einer SFN (Koike et al., 2011). Es wurde jedoch herausgefunden, dass das Gen DRG/RIT42, welches ein *target* des Tumorsuppressorgens p53 darstellt, mit einer Herunterregulation der Tumorprogression von u.a. Prostata-Karzinomen assoziiert ist und ferner bei motorischen und sensorischen Neuropathien mutiert vorliegen kann (Kim et al., 2004). Auffällig ist allerdings, dass bei P1 zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Durchführung der Studie das Prostata-CA bereits operativ entfernt war. In Studien wurden paraneoplastische Neuropathien und andere neurologische Syndrome meist vor der Tumordiagnose beobachtet (Voltz, 2002). Somit kann insgesamt eine Assoziation der SFN mit dem Prostata-CA bei P1 nicht ausgeschlossen werden, doch Klinik, Zeitpunkt des Auftretens und Tumortyp sprechen eher nicht dafür.

Bei Patient P1 dominierten v.a. die Positiv-Symptomatik, bei P2 hingegen stand die Negativ-Symptomatik im Vordergrund, auch wenn er zusätzlich Positiv-Symptome aufwies.

In Zusammenschau der Klinik mit der Therapie sowie einer potenziellen Tumorassoziation kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Erkrankung bei P1 weiter fortgeschritten war oder eine größere Schwere der Erkrankung vorlag, daher ein größerer C-Faser-Anteil unterging und somit ein größerer C-Faser-DNA-Anteil als bei P2 in der cfDNA enthalten gewesen sein könnte. Zudem könnte sich P2 zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einer Phase ohne aktiven Krankheitsschub befunden haben, sodass ebenfalls weniger C-Faser-DNA in seiner cfDNA zu finden gewesen wäre. Allerdings muss bei dieser Hypothese bedacht werden, dass auch bei P2 die Diagnose einer SFN gesichert war und eine stark reduzierte IENFD vorlag, die mit $4/\text{mm}^2$ nur geringfügig höher war als bei P1 mit $3/\text{mm}^2$. Die Ausprägung der Symptomatik bei SFN kann von Patient zu Patient variieren und ist nicht zwingend an die klinischen Befunde gekoppelt (Cazzato and Lauria, 2017, Sopacua et al., 2019). Demnach kann trotz des nur geringen Unterschieds in Bezug auf die IENFD bei P1, v.a. in Anbetracht seiner klinischen Symptome, im Vergleich zu P2 ein fortgeschritteneres Krank-

heitsstadium bestehen. Ferner befand sich P1 im Z.n. Prostata-CA, welches ebenfalls den Verlauf der SFN-Erkrankung beeinflussen könnte. Ob die aufgestellte Hypothese demnach zutreffend ist, lässt sich aus den gegebenen Informationen nicht abschließend sagen.

Bei den Kontroll-Proben variierte das Methylierungslevel vor allem bei den ersten beiden CpG-Positionen stark. An der ersten CpG-Stelle waren die beiden Proben K1 und K3, die von weiblichen Probanden stammen, auf einem annähernd gleichen Level, die Probe K2 hingegen deutlich stärker methyliert. Ob das Geschlecht hierfür ursächlich sein könnte, ist jedoch fraglich, da sich diesbezüglich bei den anderen beiden CpG-Positionen keine Stringenz zeigte.

Vor allem die Probe K3 zeigte bei den beiden ersten CpG-Stellen ein eher geringes Methylierungslevel. Bei Analyse der Informationen über diese Probandin unterschied sich diese hauptsächlich durch ihre ethnische Abstammung von den anderen beiden Kontrollen. Eine weitere Erklärung könnte jedoch die genannte Möglichkeit einer potenziellen Kontamination der Probe K3 darstellen.

Bei der letzten der drei CpG-Positionen waren die Kontroll-Proben als einzige von allen drei auf einem annähernd gleichen Methylierungslevel, trotz interpersoneller Unterschiede und zudem bestand eine Hypomethylierung der Probe P1. Das deutet darauf hin, dass sich diese CpG-Stelle für die weitere Untersuchung in Bezug auf das Finden eines epigenetischen Biomarkers für SFN eignen könnte, auch wenn sich bei den beiden Patienten-Proben kein einheitliches Ergebnis zeigte. Sollte sich die der aufgestellte Hypothese bestätigen, dass sich die beiden Patienten in einem unterschiedlichen Krankheitsstadium befanden, würde dies noch bekräftigt.

Zwischen dem Methylierungsgrad der Kontroll-Proben und der Biopsie-Probe bestand hingegen eine sehr große Differenz. Da die Biopsie-Proben als zusätzliche Kontrolle die Methylierungsverhältnisse der Zellen der Epidermis und Dermis darstellen sollten, wurde eine Annäherung ihrer Werte an die der Blutplasma-Kontroll-Proben erwartet. Stattdessen zeigte sie einen enormen Unterschied zu Letzterer. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die DNA-Konzentration bei der Bisulfit-Konversion zu gering war und so akzidentell nur an dieser Sequenz unmethylierte DNA-Fragmente amplifiziert wurden. Denn ein gewisser Anteil an unmethylierten Sequenzen bestand bei allen Proben. Daher kann das Methylierungsergebnis der Biopsie-Probe an diesem Locus keine valide Aussage treffen.

Bei diesem Locus zeigten sich bei jeder CpG-Stelle zwischen acht und elf Sequenzen, die bezüglich ihres Methylierungsstatus kein eindeutiges Ergebnis zeigten. Da insgesamt jedoch 571 Sequenzen ausgewertet wurden, war dieser Anteil sehr gering und störte die Methylierungsanalyse nicht.

Zusammengefasst variierten die Methylierungslevel v.a. bei der ersten CpG-Stelle recht stark unter den jeweiligen Proben. Am stärksten die Hypothese dieser Arbeit stützend zeigte sich die bereits als Methylierungsstelle bekannte dritte CpG-Position, welche von den dreien am besten für weitere Untersuchungen zur Findung eines epigenetischen Biomarkers für SFN geeignet ist. Dennoch ist hier die auffällig starke Methylierung von P2 zu berücksichtigen sowie die Möglichkeit, dass sich die beiden Patienten nicht im gleichen Krankheitsstadium befinden könnten. Bei allen drei CpG-Positionen wurde jeweils nur eine Biopsie-Probe als Vergleichswert untersucht, welche immer eine vollständige Demethylierung aufwies. Anhand der Biopsie-Probe konnte aufgrund dieser Ergebnisse keine valide Aussage getroffen werden.

SCN10A2

Bei diesem Genlocus wurden ebenfalls drei CpG-Positionen untersucht. Es wurden alle Proben analysiert (K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie). Dieser Locus befindet sich ebenfalls in der *Promotor*-Region des Gens. Von den drei CpG-Stellen war jedoch in der Literatur keine zuvor als Methylierungsstelle bekannt.

Insgesamt zeigte sich dieser Locus deutlich stärker methyliert als die beiden vorhergehenden. Bei der ersten CpG-Position waren alle drei Kontroll-Proben zu 100 % und alle drei Biopsie-Proben mit Werten zwischen 80,49 % (P1) und 92,86 % (P3) deutlich geringer methyliert. Ferner waren die Plasma-Patienten-Proben von ihrem Methylierungslevel zwischen dem der Kontroll-Proben und dem der Biopsie-Proben angeordnet. Allerdings zeigte sich nur ein Unterschied von 0,67 % (zu P1) und 2,22 % (P2) zwischen den Kontrollen und den Plasma-Patienten-Proben. Dies würde zwar vage einen Trend darstellen, der zu der Hypothese dieser Arbeit passt, doch die Unterschiede waren so geringfügig, dass es sich nicht um eine relevante Hypomethylierung handeln konnte. Anhand des Methylierungs-*contents* war dieser Methylierungsunterschied nicht ersichtlich gewesen. Bei diesem hatte sich eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen gezeigt. Zwischen den Biopsie-Proben und den Kontrollen hingegen war an dieser CpG-Stelle ein deutlich größerer Methylierungsunterschied gegeben, als anhand des Methylierungs-*contents* erwartet wurde, da sich bei diesem eine Annäherung der Werte dieser Proben gezeigt hatte.

Bei der zweiten CpG-Position waren die Kontrollen K1 und K2 mit je über 90 % wieder stärker methyliert als die Biopsie-Proben, welche ein Methylierungslevel von 80,49 % (P1) und 82,35 % (P2) aufwiesen. Allerdings kontrastierte die Probe K3, welche vollständig unmethyliert war, deutlich mit den anderen Kontrollen. Weiterhin waren die beiden Plasma-Patienten-Proben mit 100 % (P1) und 95,52 % (P2) jeweils stärker methyliert als die Kontrollen K1 und K2, welche von K3 separiert betrachtet wurden. Die Probe P1 war von allen Proben an die-

ser CpG-Position die am stärksten methylierte. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Informationen aus der Analyse des Methylierungs-*contents*. Sie zeigten jedoch auch, warum bei diesem die Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben noch ausgeprägter war, als anhand des Methylierungs-*contents* vermutet, denn bei der Untersuchung des *contents* wurden die individuellen Werte, hier v.a. der Probe K3, die vollständig unmethyliert war, nicht aufgezeigt. So hatte der 0 % Wert bei K3 eine Verzerrung des Werts des *contents* der Blutplasma-Kontrollen zur Folge. Eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben entsprach nicht der Hypothese dieser Arbeit, laut dieser hätte eine Hypomethylierung vorliegen müssen.

Die dritte CpG-Position war bei den Kontrollen je zu über 92 % methyliert und die Biopsie-Proben zeigten sich hier insgesamt ähnlich stark methyliert wie die Kontrollen. Da die Biopsie-Proben die Methylierungsverhältnisse des epidermalen und dermalen Gewebes widerspiegeln und als zusätzliche Kontrollen fungierten, war eine Annäherung ihrer Werte an die der Blutplasma-Kontrollen erwartet worden. Dies war hier bei SCN10A2 erstmals der Fall. Die beiden Plasma-Patienten-Proben wiesen mit 100 % und 99,25 % erneut eine Hypermethylierung gegenüber den Kontroll-Proben auf. Dies korrelierte, wie auch schon an der zweiten CpG-Position mit den Ergebnissen des Methylierungs-*contents*, entsprach jedoch ebenfalls nicht der Hypothese dieser Arbeit.

Ein eindeutiger Trend, bei welchem sich die Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontroll-Proben hypomethyliert zeigten, konnte an diesem Locus somit nicht festgestellt werden. Denn der Unterschied der Methylierungslevel von P1 und P2 zu den Kontrollen am ersten CpG-Dinukleotid war zu marginal, um wirklich Aussagekraft zu haben. An den anderen beiden CpG-Positionen lag sogar eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben vor. Diese war bei der Probe P1 besonders ausgeprägt. DNA-Hypermethylierung kann diverse Funktionen haben. So können durch sie zum einen Promotoren und Enhancer stillgelegt werden und somit die Transkription von Genen verhindert oder reduziert werden. Allerdings kann, wie bei Ehrlich (2019) beschrieben, durch eine Hypermethylierung auch die Transkription gefördert werden. Dies geschieht z.B., indem dadurch kryptische intragene Promotoren ausgeschaltet werden, der Zugang von repressiven Chromatinstrukturen zum Promotor begrenzt wird oder auch die Expression von kurzer nicht kodierender RNA verhindert wird, wie z.B. miRNA oder siRNA, welche eine Rolle in der Stilllegung von Genen spielen. Zudem kann durch die Methylierung von *Introns* in Genen, die für kleine Proteine kodieren und welche in ein größeres Gen oder einen gewebsspezifischen Enhancer eingebettet sind, mit der Expression eines benachbarten Gens verbunden sein (Ehrlich, 2019). Auch Chatterjee and Vinson (2012) beschrieben, dass eine Hypermethylierung von *Promotor*-Regionen bspw. durch Entstehung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen oder Alteration der Histonmodifikation zu einer Förderung der Genexpression führen kann. Zusätzlich kommen Hypermethyl-

ierungen auch spezifisch bei bestimmten Erkrankungen vor, wie z.B. Alzheimer, Epilepsie, Borderline-Persönlichkeitsstörungen, Rheumatoider Arthrose, Systemischer Sklerose oder dem Sjögren Syndrom (Ehrlich, 2019). Bei Untersuchungen von cfDNA bei Tumorerkrankungen zeigte sich ferner häufig eine Hypermethylierung in *Promotor*-Regionen, die zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führten (Chatterjee and Vinson, 2012). Ferner kann eine Hypermethylierung von einzelnen CpG-Positionen auch die Bindung von Transkriptionsrepressoren stören und so die Genexpression fördern (Galetzka et al., 2022). Wie schon im Rahmen der Diskussion von SCN9A1 angesprochen, stellt dies eine mögliche Erklärung dafür dar, warum die beiden Plasma-Patienten-Proben an den letzten beiden CpG-Positionen von SCN10A2 stärker methyliert waren als die Kontrollen und Biopsie-Proben. An der zweiten CpG-Position waren sie mindestens 1,2 % bis maximal 8,22 % stärker methyliert, an der dritten CpG-Position mindestens mit 5,41 % bis 7,95 %, die Probe K3 jeweils nicht berücksichtigt. V.a. an der dritten CpG-Position könnte, wenn wie bei SCN9A2 ein Methylierungsunterschied von mindestens 5 % als Maßstab gesetzt wird, von einer relevanten Hypermethylierung ausgegangen werden. Um herauszufinden, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Bindestelle für einen Transkriptionsrepressor handelt, wäre allerdings eine bioinformatische Analyse des Locus nötig. Ob in diesem Fall eine Hypermethylierung ebenfalls krankheitsassoziiert sein könnte, lässt sich daher aus den gegebenen Informationen nicht erschließen. Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Plasma-Patienten-Proben und den Kontroll-Proben insgesamt sehr gering, weshalb dies eher unwahrscheinlich ist. Die insgesamt starke Methylierung des Locus SCN10A2, mit nur marginalen Unterschieden zwischen den Kontrollen und Plasma-Patienten-Proben könnte auch bedeuten, dass die hier untersuchten CpG-Positionen generell methyliert vorliegen. Denn laut Chatterjee and Vinson (2012) sind 85 % der CpG-Stellen des menschlichen Genoms methyliert.

Im Gegensatz zu SCN9A2 zeigte sich hier zwischen den Proben P1 und P2 kein nennenswerter Unterschied in den Methylierungsleveln. Sie befanden sich mit einem Unterschied von 0,75 % (dritte CpG-Position) und 4,48 % (zweite CpG-Position) stets auf einem ähnlichen Methylierungs-Niveau.

Die zweite CpG-Position zeigte bei der Probe K3 mit 0 % Methylierung das auffälligste Ergebnis an diesem Locus. Bei Betrachtung der anderen beiden CpG-Stellen fiel auf, dass die Probe K3 an diesen jeweils zu 100 % methyliert war. Da die Methylierungsverteilung dieser Probe so extreme Werte aufwies, bestand die Möglichkeit, dass es sich bei der zweiten CpG-Position um einen genetischen Polymorphismus handelte und bei der Probandin dementsprechend an der zweiten CpG-Stelle gar keine CG-Basenabfolge vorlag.

Die Biopsie-Proben zeigten an der dritten CpG-Position eindeutig eine Annäherung an die Blutplasma-Kontrollen. An den anderen beiden CpG-Stellen fanden sich Unterschiede von 7,14 % (P3 Biopsie zu allen Kontrollen am ersten CpG) bis 19,51 % (P1 zu allen Kontrollen

am ersten CpG), die 0 % der Probe K3 an der zweiten CpG-Position ausgenommen. Da die Biopsie-Proben eine zusätzliche Kontrolle darstellten und die Methylierungsverhältnisse des epidermalen und dermalen Gewebes abbildeten, wurde eine Annäherung ihrer Werte an die der Blutplasma-Kontrollen erwartet. An den ersten beiden CpG-Positionen war dies jedoch nicht der Fall. Sie zeigten sich hypomethyliert. Mögliche Erklärungen dafür sind, dass bei Untergang der C-Fasern und Apoptose der Nervenzellen DNA der C-Faser aus dem Zellkern frei wurde, in die peripheren Ausläufer der Nervenzellen und durch die Hautstanz-Biopsie in die in dieser Arbeit untersuchten Biopsie-Proben gelangte. Wahrscheinlicher ist aber, dass die in diesem Locus untersuchte Methylierung für die Genregulation nicht relevant ist.

Insgesamt fanden sich an diesem Locus zwischen zwei und sieben von insgesamt 780 Sequenzen, die an einer CpG-Stelle kein eindeutiges Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus zeigten. Diese Anzahl war jedoch so gering, dass sie die Methylierungsanalyse nicht beeinträchtigte.

Zusammengefasst war dieser Locus für weitere Untersuchungen bezüglich eines epigenetischen Biomarkers für SFN wahrscheinlich nicht geeignet, da die Methylierungsergebnisse die Hypothese dieser Arbeit nicht stützten. Allerdings könnte die Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben an den letzten beiden CpG-Stellen, für welche verschiedene Ursachen in Frage kommen, auch eine Krankheitsassoziation haben. V.a. die Möglichkeit einer Bindestelle für einen Transkriptionsrepressor stellt hierbei eine interessante potenzielle Erklärung dar. Eine bioinformatische Analyse des Locus wäre nötig, um zu klären, ob SCN10A2 tatsächlich als epigenetischer Biomarker ungeeignet ist oder ob hier möglicherweise eine Transkriptionsrepressor-Bindestelle vorliegt, wodurch eine Eignung als Biomarker doch möglich wäre.

Für weitere Forschung nach einem epigenetischen Biomarker könnte sich jedoch die in Abschnitt 6.1 genannte bereits bekannte Methylierungsstelle an der Position chr3:38,836,991 (GRCh37/hg19) in der *Promotor*-Region von SCN10A anbieten.

SCN11A1

Dieser Genlocus wies nur eine einzige CpG-Position auf, diese ist bereits als Methylierungsstelle bekannt und befindet sich in einer *Promotor flanking Region*. Der Locus wurde bei allen Proben (K1, K2, K3, P1, P2, P1 Biopsie, P2 Biopsie und P3 Biopsie) untersucht.

Bei dieser CpG-Position waren die Kontroll-Proben erneut sehr stark methyliert, v.a. die Probe K3 (100 %). Die Biopsie-Proben waren im Vergleich dazu etwas geringer methyliert. Der Unterschied zu K1 und K2 war jedoch nur gering, mit 4,09 % zwischen P2 sowie P3 Biopsie und K2 und mit bis zu 2,32 % Unterschied zwischen P1 Biopsie und K1. Da die Probe K3 mit

100 % erneut einen extremen Wert aufwies, wie schon bei SCN10A2 und sie zudem auch bei SCN9A1 durch von den anderen beiden Kontroll-Proben abweichende Werte hervorstach, wurde bezüglich des Verhältnisses der Biopsie-Proben zu den Kontrollen an diesem Locus der Fokus auf die beiden Proben K1 und K2 gelegt. Daher zeigte sich, verglichen mit diesen, eine Annäherung der Werte der Biopsie-Proben an die Kontrollen-Proben. Dies entsprach der Erwartung an die Biopsie-Proben, welche als zusätzliche Kontrolle die Methylierungsverhältnisse epidermalen und dermalen Gewebes repräsentieren sollte. Dies war anhand der Ergebnisse des Methylierungs-*contents* nicht ersichtlich gewesen, da der *content* der Kontrollen durch den extremen Wert von K3 (100 %) nach oben verzerrt wurde.

Die beiden Plasma-Patienten-Proben hingegen zeigten sich, wie auch schon bei SCN9A2, sehr unterschiedlich methyliert. Die Probe P1 war mit 85,31 % geringer methyliert als Kontroll- und Biopsie-Proben und zeigte von allen Proben das geringste Methylierungslevel. Die Probe P2 hingegen war mit 97,06 % von allen Proben am zweitstärksten methyliert. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied der beiden Plasma-Patienten-Proben könnte erneut die Hypothese sein, dass sich die beiden Patienten in einem unterschiedlichen Krankheitsstadium befanden bzw. einen unterschiedlichen Schweregrad der SFN aufwiesen. Denn die Probe P1 zeigte sich mit ihrem Methylierungslevel im Vergleich zu den Kontroll-Proben hypomethyliert, was die Hypothese dieser Arbeit stützen würde. Die Probe P2 hingegen befand sich, wie schon bei SCN9A2, auf einem ähnlichen Methylierungsniveau wie die Kontroll-Proben. Die Ergebnisse des Methylierungs-*contents* hatten ebenfalls eine Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen gezeigt, was durch die Analyse des Methylierungslevels nun bestätigt wurde. Allerdings war diese Hypomethylierung durch die starke Methylierung der Plasma-Patienten-Probe P2 im *content* deutlich geringer erschienen, als sie (bei P1) tatsächlich war, was erst durch die Level-Analyse ersichtlich wurde.

An dieser CpG-Position zeigten fünf von insgesamt 974 ausgewerteten Sequenzen in Bezug auf ihren Methylierungsstatus ein uneindeutiges Ergebnis. Diese Anzahl war sehr gering und störte die Methylierungsanalyse nicht. Diese Sequenzen fanden sich ausschließlich bei den Biopsie-Proben.

Bei Betrachtung des Genlocus SCN11A1 zeigte sich zusammengefasst eine Hypomethylierung der Probe P1 im Vergleich zu den Kontroll-Proben, wie auch schon bei SCN9A2. Auf der Hypothese basierend, dass sich die beiden Patienten in einem unterschiedlichen Krankheitsstadium befanden bzw. einen unterschiedlichen Schweregrad der SFN aufwiesen, ließe sich daher die Annahme treffen, dass sich der Genlocus SCN11A1 ebenfalls zu weiterführenden Untersuchungen in Bezug auf einen epigenetischen Biomarker bei SFN eignet.

Es sollte jedoch bedacht werden, dass es in der *Promotor flanking Region* zudem eine weiteren bekannte Methylierungsstelle gibt, ebenso wie in der *Promotor*-Region, die sich ebenfalls für Untersuchungen in diese Richtung anbieten würden.

Zusammengefasst waren anhand der Ergebnisse der Analyse der Methylierungslevel die Loci SCN9A2 und SCN11A1 am ehesten erfolgsversprechend für die weitere Forschung nach einem epigenetischen Biomarker für SFN. Bei SCN9A2 wäre die zweite und v.a. die dritte CpG-Position, welche die besten Ergebnisse der drei CpG-Stellen zeigte und bereits als Methylierungsstelle bekannt war, für anschließende Untersuchungen interessant. Bei SCN9A2 zeigte sich an der ersten CpG-Position eine Hypomethylierung der Plasma-Patienten-Probe P1 zu den Kontrollen mit Werten von 0,06 % bis 30,91 %, an der zweiten CpG-Position von 10,93 % bis 35,97 % und an der dritten CpG-Position von 31,81 % bis 34,8 %. Bei SCN11A1 betrug die Hypomethylierung zwischen 6,48 % und 14,69 %. Eine Studie zur Untersuchung der Veränderungen von Methylierungs-Leveln in Zusammenhang mit der lokalen Ausbreitung und Metastasierung von Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) hatte eine Hypomethylierung ab Werten von 12,15 % $\pm$ 7,14 % bei NSCLC-Geweben verglichen mit gesundem Gewebe als relevant eingestuft (Liao et al., 2022). Andere Studien, die die Veränderungen von DNA-Methylierungsleveln untersuchten, legten einen Unterschied von mindestens 10 % als relevant fest (Lindner et al., 2021). Somit wurde zusammengefasst bei Unterschieden der Methylierungslevel ab 5-10 % von einer relevanten Aussagekraft ausgegangen. Auf die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Hypomethylierungen angewandt, bedeutet das für SCN9A2, dass sowohl die Hypomethylierung an der zweiten CpG-Position mit mindestens 10,93 % als auch an der dritten CpG-Position mit mindestens 31,81 % als aussagekräftig bezeichnet werden können. Für SCN11A1 mit einer Hypomethylierung zwischen 6,48 % und 14,69 % kann dies ebenfalls angenommen werden, obgleich diese Werte geringer als bei SCN9A2 und fast grenzwertig waren.

Der Locus SCN9A1 war insgesamt bei allen Proben nur gering methyliert, was darauf hindeuten könnte, dass er eher regulatorisch aktiv vorliegt oder für die hier untersuchten CpG-Positionen nicht für die Regulation der Genaktivität zuständig sind. Allerdings könnte er auch eine mögliche Bindestelle für einen Transkriptionsrepressor darstellen, weshalb eine Methylierungsanalyse der Plasma-Patienten-Proben interessant wäre. Die Hypermethylierung von SCN10A2 kann diverse Ursachen haben, ob eine Krankheitsassoziation vorliegt, ist jedoch aus den gegebenen Informationen nicht abschließend feststellbar. Auch hier könnte es sich jedoch um eine Transkriptionsrepressor-Bindestelle handeln. Daher wäre eine bioinformatische Analyse dieses Locus interessant.

Ferner sollte an dieser Stelle noch einmal auf die Genloci SCN10A Position 38,836,991 auf Chromosom 3, SCN11A Position 39,054,994 sowie Position 38,991,907 auf Chromosom 3

und SCN9A die Positionen 167,232,412; 167,232,646; 167,232,680 sowie 167,232,696 auf Chromosom 2 (GRCh37/hg19) hingewiesen werden, die sich jeweils in der *Promotor-/ Promotor flanking Region* ihrer jeweiligen Gene befinden und zudem als Methylierungsstellen bekannt sind. Diese könnten somit bei weiterführenden Untersuchungen miteinbezogen werden.

6.3.3 Methylierungsmuster

Das Methylierungsmuster beschreibt das lineare Muster von verschiedenen CpG-Dinukleotiden von Bisulfit-konvertierter DNA geklonter Moleküle (Siegmond and Laird, 2002). In der Methylierungslevel-Analyse wurden die einzelnen CpG-Positionen isoliert betrachtet. Bei der Untersuchung der Methylierungsmuster hingegen wurden diese miteinander in Kontext gesetzt und als Einheit gewertet. So ergaben sich z.T. Informationen, die aus der Untersuchung der Methylierungslevel nicht hervorgingen.

Im Folgenden werden die Methylierungsmuster der jeweiligen Genloci bei den entsprechend untersuchten Proben diskutiert.

Da der Genlocus SCN11A1 nur eine einzige CpG-Position enthielt, entsprachen die Methylierungsmuster weitgehend dem Methylierungslevel, abgesehen von den Biopsie-Proben P1 und P3, bei welchen sich auch vereinzelt Sequenzen mit uneindeutigem Ergebnis bezüglich ihres Methylierungsstatus zeigten. Dies betraf jedoch maximal vier Sequenzen und beeinträchtigte die Beurteilung der Methylierungsunterschiede zwischen Kontroll- und Plasma-Patienten-Proben nicht.

SCN9A1

Bei dem Genlocus SCN9A1 wurden die aus der Untersuchung der Methylierungslevel gewonnen Informationen durch die Methylierungsmuster-Analyse bestätigt. Dominierend war hier eindeutig das Methylierungsmuster U-U-U, welches insgesamt bei 94,04 % der 302 ausgewerteten Sequenzen vorkam und bei der Biopsie-Probe sogar mit 100 %. Die heterogenste Verteilung an Methylierungsmustern wies die Probe K3 auf, welche als einzige ein weiteres Muster mit einer auffälligen Häufigkeit aufwies. Bei diesem handelte es sich um das Muster U-M-M, (10,14 %). Mögliche Erklärungen für die klare Dominanz des Musters U-U-U über alle Proben hinweg wurden schon im Rahmen der Analyse der Methylierungslevel erläutert. Die Kontrolle K3 unterschied sich von den anderen beiden Kontroll-Proben hauptsächlich durch die ethnische Herkunft, da es sich bei allen drei Kontroll-Personen um junge,

gesunde Menschen zwischen 20 und 40 Jahren handelt, ohne Vorerkrankungen oder Medikationen sowie ohne Nikotin-, Alkohol- und Substanzabusus. Ein Ansatz als Erklärung für die heterogenen Verteilung an Methylierungsmustern bei der Probe K3 wäre somit zum einen die Ethnie der Kontroll-Person. Zum anderen ist den Ergebnissen der NanoDrop-Messungen zu entnehmen, dass bei der Probe K3 eine potenzielle Kontamination bestehen könnte, die ebenfalls eine mögliche Erklärung für die abweichenden Werte dieser Probe darstellen könnte. Aus der Methylierungsmuster-Analyse ging außerdem hervor, dass an diesem Genlocus ausschließlich bei den Proben K1 und K3 CpG-Positionen mit uneindeutigem Ergebnis in Bezug auf ihren Methylierungsstatus vorkamen. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Analyse der Methylierungsmuster von diesem Locus mit der Analyse der Methylierungslevel übereinstimmten und die darin gewonnene Erkenntnisse stützten. Eine Untersuchung der Plasma-Patienten-Proben könnte ein erster Schritt sein, um zu klären, ob sich SCN9A1 tatsächlich nicht als epigenetischer Biomarker bei SFN eignet. Falls diese ebenfalls kaum bis gar nicht methyliert wären, so würde dies gegen eine Eignung sprechen. Würde sich jedoch eine stärkere Methylierung dieser zeigen, so könnte es sich bei den bei SCN9A1 untersuchten CpG-Positionen um Bindestellen für einen Transkriptionsrepressor handeln.

SCN9A2

Im Vergleich zu SCN9A1 zeigte der Locus SCN9A2 eine wesentlich heterogenere Verteilung an Methylierungsmustern. V.a. zwei Muster, welche insgesamt sehr häufig vorkamen, waren bei Betrachtung der Kontroll-Proben auffällig. Bei diesen handelte es sich um die Methylierungsmuster M-M-M und U-M-M. Letzteres zeigte sich insbesondere bei der Kontrolle K1 vermehrt. Bei der Analyse der Methylierungslevel des Genlocus SCN9A2 war auffällig, dass vor allem die letzten beiden CpG-Positionen sehr stark methyliert waren. Bei dem Vergleich der Kontrollen untereinander anhand ihres Methylierungsmusters war nun zu erkennen, dass jedoch insgesamt bei K2 und K3 das Methylierungsmuster M-M-M (67,07 % bei K2, 35,62 % bei K3) das häufigste war, nicht das Muster U-M-M. Bei K3 war dies aus der Methylierungslevelanalyse nicht zu lesen, da sich die Probe dort an der ersten CpG-Stelle nur mit 45,21 % methyliert zeigte. Auch bei K1 machte das Muster M-M-M mit 26,05 % den zweithäufigsten Anteil aus. Zusätzlich war das Muster U-M-M in allen drei Kontrollen ebenfalls häufig vertreten. Bei einem Vergleich der Verteilung der Methylierungsmuster der Kontrollen mit den Plasma-Patienten-Proben, zeigte sich eine starke Ähnlichkeit zwischen der Probe P2 und den drei Kontroll-Proben. Auch bei dieser war M-M-M (53,28 %) am häufigsten vertreten und U-M-M (27,74 %) am zweithäufigsten. Konträr dazu wies P1 eine gänzlich andere Methylierungsmuster-Verteilung auf. Hier war das Muster U-U-U mit 36,84 % eindeutig dominant. Die Methylierungsmuster M-M-M und U-M-M hingegen machten im Vergleich zu den Kontrollen einen deutlich geringeren Anteil aus. Bei der Untersuchung der Methylierungslevel war v.a.

an den letzten beiden CpG-Positionen eine Hypomethylierung der Probe P1 im Vergleich zu den Kontrollen auffällig. An der ersten CpG-Stelle hingegen war anhand der Methylierungslevel keine eindeutige Hypomethylierung feststellbar. Die Musteranalyse bestätigte zwar, dass diese Hypomethylierung an den letzten beiden CpG-Stellen bestand, machte jedoch zusätzlich deutlich, dass sie an allen drei Positionen ausgeprägt war. Denn das Methylierungsmuster U-U-U war bei P1 mit Abstand das häufigste, wohingegen bei den Kontrollen (v.a. K2 und K3 betreffend) M-M-M am häufigsten vorkam.

Die untersuchte cfDNA konnte entweder aus C-Fasern stammen oder aus anderen Zellen. In welchem Verhältnis diese beiden standen, war nicht zu bestimmen. Anhand der Hypothese, die dieser Arbeit zu Grunde liegt, wurde davon ausgegangen, dass sich bei den Patienten ein ausreichend großer Anteil an cfDNA aus C-Fasern im Blut befindet, sodass sich dieser detektieren lässt und bei der Analyse der Methylierungen sichtbare Unterschiede zu den gesunden Kontrollpersonen zu erkennen sind. Allerdings musste sich bei den Patienten zusätzlich zu der C-Faser-DNA auch C-Faser-fremde DNA im Plasma befinden, sodass sich auch deren Methylierungsverhältnisse bei der Analyse der Patienten-Proben finden lassen mussten. Welches Methylierungsverhältnis genau in den C-Fasern vorliegt lässt sich im Vorfeld nicht genau bestimmen, es wurde aber anhand der bestehenden Hypothese davon ausgegangen, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genloci in den C-Fasern hypomethyliert vorliegen und in den restlichen Zellen vermehrt methyliert. Durch die Analyse der untersuchten Proben und den Vergleich der Methylierungsverhältnisse bei den Kontrollen mit denen der Patienten, sollte es möglich sein, Rückschlüsse auf die tatsächliche Methylierung der Genloci in den C-Fasern sowie auf die tatsächliche Methylierung der Loci in den restlichen Zellen zu ziehen. Betrachtete man nun die Ergebnisse der Methylierungsmuster-Analyse, so ergab sich, dass in Zellen, die nicht aus C-Fasern stammen mit großer Wahrscheinlichkeit meist das Methylierungsmuster M-M-M vorliegt. Das Muster U-M-M zeigte sich ebenfalls häufig. Daher kann die Theorie aufgestellt werden, dass in C-Faser-fremder DNA bei Genlocus SCN9A2 v.a. die Muster M-M-M oder U-M-M vorliegen. Da es sich um die DNA von Zellen unterschiedlicher Herkunft handelt, ist nicht auszuschließen, dass dieser Locus in den verschiedenen Arten von Geweben eine Variation aufweist und somit U-M-M oder M-M-M vorliegt. Die Theorie, dass diese beiden Muster, in C-Faser-fremdem Gewebe vorherrschend sind, wird zudem dadurch gestützt, dass diese Muster auch bei P1 in einer relevanten Häufigkeit zu finden sind (28,95 % M-M-M und 11,40 % U-M-M). Auch in der Probe P1 findet sich zu einem gewissen Anteil C-Faser-fremde DNA. Diese weist somit Methylierungsmuster auf, die auch bei den Kontrollen zu finden sind. Die Tatsache, dass P2 der Plasma-Patienten-Proben eine mit den Kontrollen vergleichbare Verteilung dieser beiden Muster zeigt (53,28 % M-M-M und 27,74 % U-M-M) und in starkem Kontrast zu der Probe P1 steht, lässt darauf schließen, dass sich die beiden Patienten in ihrem Krankheitsstadium bzw. in Krankheitsschwere unterscheiden. Auch könnte bei dem Patienten hinter der Probe

P2 zum Zeitpunkt der Probenentnahme kein Krankheitsschub vorgelegen haben, sodass sich kein erhöhter C-Faser-DNA Anteil in der cfDNA seines Plasmas fand. Diese Hypothese wurde bereits bei der Analyse der Methylierungslevel aufgestellt und wurde durch die Ergebnisse der Untersuchung der Methylierungsmuster bekräftigt.

Die Biopsie-Probe hätte sich als weitere Kontrolle, die die Methylierungsverhältnisse in epidermalen und dermalen Zellen darstellt, den drei Blutplasma-Kontrollen annähern sollen, zeigte jedoch mit 100 % das Muster U-U-U. Ein so ausgeprägter Unterschied der Biopsie-Probe zu den Blutplasma-Kontrollen bzw. den restlichen Proben fand sich nur bei diesem Genlocus. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, wie schon im Rahmen der Methylierungslevel-Analyse erläutert, dass die DNA-Konzentration bei der Bisulfit-Konversion zu gering war, sodass akzidentell nur an dieser Sequenz unmethylierte DNA-Fragmente amplifiziert wurden, da bei allen Proben ein gewisser Anteil an unmethylierten Sequenzen bestand. Daher war an diesem Locus anhand der Methylierungsergebnisse der Biopsie-Probe keine valide Aussage möglich.

Insgesamt war der Unterschied der Probe P1 zu den Kontrollen in Bezug auf die Häufigkeit des Musters U-U-U hier so groß, dass er, wie schon bei der Untersuchung der Methylierungslevel, vermuten ließ, dass sich SCN9A2 als epigenetischer Biomarker für SFN eignet. Transferierte man die Annahme, dass ein Methylierungs-Unterschied von mindestens 5-10 % als aussagekräftig zu betrachten ist aus der Diskussion der Methylierungslevel auf die Interpretation der Ergebnisse der Methylierungsmuster, so fand sich das Muster U-U-U bei P1 mindestens um 23 % bis zu 30,96 % häufiger vor als bei den Kontrollen. Somit war auch anhand der Methylierungsmuster-Analyse von einem aussagekräftigen Ergebnis auszugehen. Zur weiteren Verifikation und Etablierung wären anschließende Untersuchungen von einer größeren Patientenzahl sowie in unterschiedlichen Krankheitsstadien notwendig.

SCN10A2

Insgesamt war bei SCN10A2 eine wesentlich stärkere Methylierung zu finden, mit einem deutlich größeren Anteil des Musters M-M-M als bei den beiden vorherigen Loci. Das Muster U-U-U kam bei allen 780 Sequenzen nur ein einziges Mal vor, bei der Probe P2 Biopsie, worin sich dieser Locus ebenfalls stark von den vorhergehenden unterschied. Das Muster M-M-M zeigte sich bei den Kontrollen K1 und K2 je mit ca. 86 %, bei den Plasma-Patienten-Proben mit 99,33 % (P1) und 94,03 % (P2) und bei den Biopsie-Proben mit 65,85 % (P1 Biopsie), 72,55 % (P2 Biopsie) und 73,81 % (P3 Biopsie). Die Plasma-Patienten-Proben zeigten somit im Vergleich zu den Kontrollen sogar einen deutlich größeren Anteil des Musters M-M-M, v.a. die Probe P1, und demnach eher eine Hypermethylierung. Dies wäre gegensätzlich zu den nach der Hypothese der Arbeit zu erwartenden Methylierungsverhältnis-

se. Mögliche Ursachen dafür wurden bereits im Rahmen der Diskussion der Methylierungslevel genannt, ob eine Krankheitsassoziation vorliegt, ist jedoch nach wie vor unklar. Die Theorie, dass es sich hierbei um eine Bindestelle für einen Transkriptionsrepressor handeln könnte, war besonders interessant. Da das Muster M-M-M bei den Plasma-Patienten-Proben im Vergleich zu den Kontrollen mit einem Methylierungsunterschied von mindestens 7,67 % deutlich häufiger vorkam und dabei Unterschiede mit Werten von über 5 % aufwies, konnte die Hypermethylierung als relevant angesehen werden. Zur Überprüfung der Theorie wäre jedoch eine bioinformatische Analyse nötig. Die beiden Plasma-Patienten-Proben zeigten an diesem Genlocus konträr zu SCN9A2 und SCN11A1 in ihrem Methylierungsgrad keinen so deutlichen Unterschied untereinander. Beide waren stärker methyliert als die Kontrollen und zeigten somit häufiger als diese das Methylierungsmuster M-M-M. Die Probe P1 wies zudem lediglich eine Sequenz mit einem anderen Muster auf (U-M-M). Diese wies auch die Probe P2 an einer Sequenz auf, letztere zeigte jedoch auch das Muster M-U-M (2,99 %) und bei einer Sequenz das Muster M-M-U. Diese beiden Methylierungsmuster kamen auch bei den Kontrollen (K1 und K2) vor. Somit zeigte die Probe P2 zum einen, die Muster betreffend, Analogien zu den Kontroll-Proben, wenn auch nicht mit dem entsprechenden prozentualen Anteil dieser, zum anderen zeigte sie mit ihrem hohen Methylierungsgrad sowie auch bei Betrachtung der Muster, eine starke Ähnlichkeit zu der Probe P1. Bei SCN9A2 hingegen, hatte P2 ganz deutlich eine starke Ähnlichkeit zu den Kontrollen gezeigt und in starkem Kontrast zu P1 gestanden. Da die Häufigkeit mit der die Methylierungsmuster hier vorkamen jedoch so gering war, konnte sich daraus keine eindeutige Aussage ableiten lassen.

Die Biopsie-Proben zeigten sich in der Muster-Analyse gegenüber den restlichen Proben hypomethyliert. Das Muster M-M-M kam zwischen 20,51 % und 11,81 % weniger häufig vor als bei den Blutplasma-Kontrollen. Bei der Untersuchung des Methylierungslevels der Biopsie-Proben hingegen hatte sich nur an den ersten beiden CpG-Positionen eine deutliche Hypomethylierung der Biopsie-Proben den Kontrollen gegenüber gezeigt. An der letzten CpG-Stelle waren die Methylierungslevel der Biopsie-Probe mit denen der Kontrollen auf einem ähnlichen Niveau befindlich, trotz der insgesamt gesehen geringeren Methylierung. Somit bestätigte die Muster-Analyse, dass die Biopsie-Proben insgesamt zu den Kontrollen hypomethyliert waren. Dennoch hatte die Level-Analyse gezeigt, dass sich diese an der letzten CpG-Position in ihrem Methylierungsgrad annähern. Bei der Analyse der Methylierungslevel hatte sich die Probe P1 Biopsie von allen Biopsie-Proben am geringsten methyliert gezeigt, dies wurde ebenfalls durch die Untersuchung der Methylierungsmuster bestätigt. Eine vermutete Annäherung der Werte des Methylierungsstatus der Biopsie-Proben an die der Blutplasma-Kontrollen war bei ausschließlicher Betrachtung der Muster-Analyse nicht festzustellen. Bei Einbeziehen der Untersuchungsergebnisse der Methylierungslevel hingegen, war eine Annäherung der Biopsie- und Kontroll-Proben an der dritten CpG-Stelle gegeben. Eine mögliche Erklärung für die Hypomethylierung der Biopsie-Proben, v.a. an den ersten

beiden CpG-Positionen, könnte sein, dass bei Untergang der C-Fasern DNA dieser aus dem Zellkern frei wurde. Welche dann in die peripheren Ausläufer der Nervenzellen und durch die Hautstanz-Biopsie in die in dieser Arbeit untersuchten Biopsie-Proben gelangte, sodass bei der Methylierungsanalyse derer eine Hypomethylierung im Vergleich zu den gesunden Kontroll-Personen auftrat. Dem widersprach, dass die Probe P1 Biopsie am geringsten von allen Biopsie-Proben methyliert war. Bei der Patientin zu dieser Probe war die Diagnose SFN nicht gesichert, da bei ihr (mit 17/mm²) eine normwertige und keine reduzierte IENFD vorlag. Bei ihr wäre der Theorie entsprechend die geringste Hypomethylierung zu erwarten gewesen. Beim Patienten zu Probe P2 Biopsie mit der am stärksten reduzierten IENFD hingegen, bei dem auch die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Plasma-Proben am deutlichsten auf einen vermehrten C-Faser Untergang hinwiesen, hätte der Theorie folgend die deutlichste Hypomethylierung der Biopsie-Proben vorliegen müssen. Dies bestätigte sich jedoch weder bei der Analyse der Methylierungslevel noch der Methylierungsmuster dieser. Wahrscheinlicher wäre demnach, dass die in diesem Locus untersuchte Methylierung für die Genregulation nicht relevant ist.

Auffällig war bei SCN10A2 ferner die Probe K3, welche mit 100 % das Methylierungsmuster M-U-M aufwies, ohne jegliche Varianz. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein genetischer Polymorphismus an der zweiten CpG-Position des Locus bei der Kontroll-Person sein, bei welcher an dieser Stelle kein CG sondern stattdessen z.B. ein TG oder ein CT zu finden wäre. Um dies zu verifizieren, wäre jedoch eine Sequenzierung der ursprünglichen, noch nicht der Bisulfit-Konversion unterzogenen DNA-Sequenz nötig.

Zusammengefasst bestätigten die Ergebnisse der Untersuchung der Methylierungslevel und v.a. in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Biopsie-Proben die Vermutung, dass sich dieser Locus wahrscheinlich nicht als epigenetischer Biomarker bei SFN eignet und dass die in diesem Locus untersuchte Methylierung für die Genregulation nicht relevant ist. Denn auch die Ergebnisse der Methylierungsmuster-Analyse stützten die Hypothese dieser Arbeit nicht. Die Hypermethylierung der beiden Plasma-Patienten-Proben könnte dem jedoch widersprechen, da die Unterschiede der Methylierungsmuster zwischen Kontrollen und Patienten mit mindestens 7,67 % als relevant betrachtet werden konnten und somit die Theorie stützten, dass es sich bei SCN10A2 um eine potenzielle Transkriptionsrepressor-Bindestelle handeln könnte.

Insgesamt bestätigte die Analyse der Methylierungsmuster die bereits aus der Untersuchung der Methylierungslevel hervorgehende Annahme, dass v.a. die Loci SCN9A2 und SCN11A1 erfolgsversprechend für die weitere Forschung nach einem epigenetischen Biomarker für SFN sein können. Zudem konnte die Muster-Analyse die Hypothese bekräftigen, dass sich

die beiden Patienten der Plasma-Patienten-Proben in einem unterschiedlichen Krankheitsstadium befanden. SCN9A1 zeigte generell kaum bis keine Methylierung und SCN10A2 eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen. Beides entsprach nicht der Hypothese dieser Arbeit und machte es unwahrscheinlich, dass diese beiden Genloci als epigenetische Biomarker geeignet sein könnten. Allerdings kam bei beiden die Möglichkeit in Betracht, dass es sich um Bindestellen für Transkriptionsrepressoren handeln könnte. Um die Eignung als epigenetischen Biomarker abschließend zu klären, müsste diese Theorie in anschließenden Forschungen erst exploriert werden. Die Biopsie-Proben zeigten durchwachsene Ergebnisse, so war eine Annäherung ihrer Methylierungsverhältnisse an die der Blutplasma-Kontrollen bei SCN9A1, SCN11A1 (bezogen auf K1 und K2) und in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Methylierungslevel auch an der dritten CpG-Position von SCN10A2 zu beobachten. Bei SCN9A2 und den ersten beiden CpG-Positionen von SCN10A2 hingegen war dies nicht der Fall, sodass eine klare Aussage dieser insgesamt nicht eindeutig zu treffen war.

Zusammenfassend ermöglichte die Untersuchung der Methylierungsverhältnisse auf drei verschiedenen Ebenen eine genaue und tiefgehende Analyse. Anhand des Methylierungs-*contents* war eine Ersteinschätzung möglich, welche sich in vielen Fällen durch die anderen beiden Untersuchungsebenen bestätigte. Ferner konnte ein Überblick über die Methylierung der Kontrollen, Patienten- und Biopsie-Proben gewonnen werden. Die Methylierungslevel und -muster zeigten teils Aspekte auf, die bei der jeweils anderen Analyseebene nicht ersichtlich waren oder bestätigten gegenseitig ihre Ergebnisse. So ergänzten sich die Ergebnisse der drei Analysemethoden und ermöglichten die Erarbeitung möglichst valider Ergebnisse.

6.4 Validität der Biopsie-Proben

Die Haut besteht aus mehreren Schichten, der Epidermis, Dermis und Subcutis. Die Epidermis kann wiederum in 5 Schichten eingeteilt werden: das Stratum corneum bildet die äußerste Schicht, dann folgen das Stratum lucidum, das Stratum granulosum, das Stratum spinosum und das Stratum basale. Daraufhin schließt sich die Basalmembran an und danach folgt die Dermis. Die Dermis gliedert sich nun in das Stratum papillare und das Stratum reticulare. Betrachtet man die Hautstanzbiopsie-Proben, so handelt es sich bei diesen um eine ca. 2-10 mm (Durchmesser) große Stanze (Alguire and Mathes, 1998). Angestrebt wird ein Durchmesser von 3 mm, kleiner sollten sie jedoch aufgrund der histologischen Beurteilbarkeit nicht sein (Alguire and Mathes, 1998) (Sopacua et al., 2019). Diese reicht von der Tiefe her bis in den Bereich der Dermis, wie anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme in

Abbildung 12 zu sehen ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Biopsie-Proben enthielten somit Zellen aus all diesen Hautschichten, wie z.B. Epithelzellen, Melanozyten, Merkel-Zellen, Langerhans-Zellen ([www. amboss.com](http://www.amboss.com)). Die Biopsie-Proben wurden somit als eine weitere Kontrolle genutzt, zusätzlich zu den Blutplasma-Kontrollen und bildeten die Methylierungsverhältnisse der diversen Hautzellen ab. Als solche bestand die Erwartung, dass sich die Methylierung der Biopsie-Proben denen der Blutplasma-Kontrollen annähern.

Die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Biopsie-Proben zeigte sich jedoch durchwachsen. Fanden sich bei den Loci SCN9A1 und SCN11A1 zwar Annäherungen ihrer Werte an die der Blutplasma-Kontrollen, so wiesen sie v.a. bei SCN9A2 einen großen Unterschied zu diesen auf. Auch bei SCN10A2 zeigten sie v.a. bei den ersten beiden CpG-Positionen teils deutliche Unterschiede der Methylierung im Vergleich zu den Blutplasma-Kontrollen. Da die Effizienz der Bisulfit-Konversion der Biopsie-Proben nicht ermittelt werden konnte und diese insgesamt eine geringe Qualität zu haben schienen, welche sich in der Auswertung der jeweiligen Chromatogramme sowie der erschwerten PCR-Amplifikation der Proben zeigte, ist es unklar, ob anhand der Methylierungs-Ergebnisse der Biopsie-Proben valide Aussagen getroffen werden können. Der Fokus bei der Auswertung der Ergebnisse und ob sich Loci als epigenetische Biomarker eignen könnten, sollte demnach v.a. auf den Vergleich der Plasma-Patienten-Proben mit den Blutplasma-Kontrollen gelegt werden.

6.5 Hautstanzbiopsie vs. Sanger Sequenzierung der cfDNA aus Blutplasma-Proben

Einer der Beweggründe, eine neue Methode zur Diagnostik der SFN zu finden, war, den Patienten die Hautstanzbiopsie zu ersparen. Wie in Abschnitt 2.5 erwähnt, hat die Hautstanzbiopsie Nachteile, so z.B., dass sie an Patienten mit Hauterkrankungen oder Ödemen teilweise nicht durchführbar ist, ebenso wie an infizierten Arealen (Sopacua et al., 2019, Alguire and Mathes, 1998). Ferner bestehen laut Sopacua et al. (2019) u.a. die Limitationen, dass sie Patienten, welche die Klinik einer SFN aufweisen, aber aufgrund von bspw. prädegenerativen Funktionsstörungen der Nerven noch eine normale IENFD zeigen, nicht detektiert und nicht zwischen idiopathischer oder z.B. diabetischer Genese unterscheiden kann. Zudem kann die IENFD auch bei anderen Erkrankungen reduziert sein, nimmt im Alter ab und variiert je nach Lokalisation der Entnahmestelle (Sopacua et al., 2019). Daher kann eine reduzierte IENFD eine SFN nicht beweisen, aber andererseits bei einer normalen IENFD eine SFN auch nicht ausgeschlossen werden (Schlereth et al., 2019). Weiterhin kann es bei Hautstanzbiopsien zu Komplikationen wie Narbenbildung, Infektionen, Blutungen und Wundheilungsstörungen kommen (Alguire and Mathes, 1998). Hinzu kommt, dass i.d.R. an zwei Lokalisationen eine Stanze entnommen wird, einmal ca. 10 cm proximal des lateralen Malleolus und zum anderen am proximalen Oberschenkel (Sopacua et al., 2019). V.a. die

distale Entnahmestelle befindet sich somit in dem bei SFN meist schmerzhaften Bereich. Ziel dieser Arbeit war es somit u.a. den Patienten diese Art der Diagnostik zu ersparen und durch eine Blutanalyse zu ersetzen. Bei einer Blutentnahme gibt es zwar relative Kontraindikationen, wie Infektionen an der Einstichstelle, verletzte/ stark ödematöse Extremitäten, thrombotische/ phlebitische Venen, arteriovenöse Transplantate oder Fisteln sowie eine ipsilaterale Mastektomie mit Lymphadenektomie; diese können jedoch meist durch die Wahl einer anderen Lokalisation zur Durchführung der Entnahme, wie z.B. dem anderen Arm umgangen werden (Liu, 2020). Es gibt weiterhin Patienten mit desolatem Venenstatus, bei denen die Blutentnahme erschwert ist. Hier besteht jedoch die Möglichkeit einer sonographisch gesteuerten Punktion als Alternative. I.d.R. sind Blutentnahmen problemlos durchführbar und es kommt nur selten zu Komplikationen. Dennoch können z.B. Infektionen, Blutungen, Hämatome, Schädigungen von Vene oder Nerven, vasovagale Synkopen mit der Gefahr von Sturzverletzungen sowie der fälschlicherweise arteriellen Punktion mit der Gefahr von Blutungen, Aneurysma spurium, Gefäßspasmen, Luftembolien etc. vorkommen (Liu, 2020; Amboss, 2023). Somit ist auch eine venöse Blutentnahme nicht völlig frei von Komplikationen. Die Komplikationen bei Hautstanzbiopsien werden zudem ebenfalls als sehr selten und meist nur gering beschrieben (Themistocleous et al., 2014). Es ist somit fraglich, ob die Blutentnahme im Vergleich zu der Biopsie deutlich ungefährlicher ist.

Da im Rahmen von klinischen Untersuchungen allerdings zumeist sowieso Blut entnommen wird, würde somit einfach eine weitere Probe für die Methylierungsanalyse entnommen. Demnach wären die möglichen Komplikationen einer Blutentnahme ohnehin gegeben, wohingegen die Biopsie aktuell noch additiv durchgeführt wird und somit auch additiv die Möglichkeit für das Auftreten von Komplikationen durch die Hautstanzbiopsie besteht. Zudem erfolgt die venöse Blutentnahme meist in der Ellenbeuge und somit nicht an einem der bei SFN besonders schmerzempfindlichen Areale, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine Schmerzreduktion bei der Diagnostik durch eine Blutentnahme anstelle einer Biopsie gegeben wäre. Ferner würden durch epigenetische Analysen der DNA ggf. noch weitere diagnostische Möglichkeiten offenstehen, wie z.B. die Beobachtung des Krankheitsverlaufs oder der Überprüfung der Wirksamkeit der Therapie (Rahat et al., 2020).

Sowohl die Analyse von Hautstanzbiopsien als auch die Methylierungsanalyse von Blutplasma-Proben sind aktuell noch teuer und zeitaufwändig. Allerdings wäre der nächste Schritt nach Etablierung eines epigenetischen Biomarkers für SFN, eine kosten- und zeiteffiziente Methode zur Detektion der Methylierungsergebnisse zu finden, wie z.B. die Methylierungsspezifische PCR (MSP). Darauf wird im Ausblick noch weiter eingegangen.

Zudem gibt es bei der Methode der Hautstanzbiopsie die genannten Limitationen, dass nicht alle an SFN erkrankten Patienten detektiert werden können, da die IENFD durch verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Die Methylierung von Promotorregionen hingegen ist recht

robust, da sie eng an deren Funktionalität gekoppelt ist, sodass es eher unwahrscheinlich ist, dass diese durch äußere Einflüsse verändert werden. Allerdings hängt das Profil der DNA-Methylierung auch mit dem Geschlecht und der Ethnie zusammen und weist somit individuelle Unterschiede auf (Gai and Sun, 2019). Darauf gaben möglicherweise auch die Methylierungsergebnisse, die sich im Rahmen dieser Arbeit zeigten, Hinweise. Zudem kann die Menge an cfDNA im Blut durch diverse Faktoren beeinflusst werden.

In ihrer Gesamtheit sprachen die meisten Informationen dafür, dass eine epigenetische Analyse anhand einer Blutprobe einer Hautstanzbiopsie als diagnostisches Mittel vorzuziehen wäre, sofern diese in Bezug auf Sensitivität und Spezifität gleichwertig wäre.

Sowohl die Kontroll-Proben als auch die Plasma-Patienten-Proben wurden im Rahmen einer venösen Blutentnahme mit anschließender Zentrifugation und Untersuchungen der cfDNA im Blutplasma gewonnen. Dies wird auch als *Liquid Biopsy* bezeichnet. Die aus dem Blutplasma isolierte cfDNA zeigt hochgradig gewebsspezifische Muster der DNA-Methylierung und wurde, wie von Rahat et al. (2020) beschrieben, bereits zur Findung von epigenetischen Biomarkern für Krebserkrankungen, aber auch von Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematoses oder das Sjögren-Syndrom herangezogen. Bei autoimmunen Erkrankungen zeigte sich, dass die Veränderungen der cfDNA-Methylierung ein geringeres Ausmaß haben als bei Tumor-Erkrankungen (Rahat et al., 2020). Wie eingangs erläutert, wurde laut Gai and Sun (2019) bei der Untersuchung von Krebserkrankungen festgestellt, dass die Menge der zellfreien DNA im Blutplasma je nach Krankheitsstadium, Benignität oder Malignität der Läsionen sowie dem Ausmaß der Metastasierung variieren und auch durch die Interaktion des Tumors mit seinem Mikromilieu oder dessen Metabolismus beeinflusst werden kann. Durch die hohe Gewebsspezifität der cfDNA-Methylierungen ist eine Bestimmung des Ursprungsgewebes und somit eine Messung der cfDNA sowie ein Monitoring des Krankheitsverlaufs möglich (Gai and Sun, 2019). Überträgt man nun dieses aus Untersuchungen von Krebserkrankungen gewonnene Wissen auf die Analyse von cfDNA im Rahmen anderer Erkrankungen, wie z.B. der SFN, so sollte auch bei nicht tumorösen Erkrankungen bei Findung des richtigen epigenetischen Biomarkers ein Monitoring des Krankheitsverlaufs über die Bestimmung der cfDNA möglich sein sowie ggf. auch die Bestimmung der Wirksamkeit der Therapie und des Krankheitsstadiums. Sollte dies zutreffen, so wären dies weitere Gründe, warum ein epigenetischer Biomarker als diagnostisches *Tool* einer Hautstanzbiopsie überlegen wäre. Allerdings variiert, wie eingangs erwähnt, die Menge an cfDNA im Blutplasma, so z.B. je nach Krankheitsstadium und ggf. auch Schwere des Krankheitsverlaufs. Demnach bestünde die Möglichkeit, dass in einem frühen Krankheitsstadium oder bei einem milden Krankheitsverlauf der SFN nur eine geringe Menge an cfDNA aus C-Fasern in das Blut gelangt und diese Menge ggf. zur Detektion der Erkrankung zu gering sein könnte. Dies wäre wiederum

eine mögliche Limitation in der Diagnostik der Erkrankung über einen epigenetischen Biomarker.

Die Halbwertszeit (HWZ) von cfDNA in zirkulierendem Blut variiert laut Kustanovich et al. (2019) zwischen wenigen Minuten bis hin zu zwei Stunden und hängt z.B. von Tumortyp, -stadium, Behandlungsmodalität und ihrer Assoziation mit molekularen Komplexen ab, welche ihre Degradierung verlangsamt. Die besagte Degradierung erfolgt durch diverse Mechanismen, beispielsweise wird eine Beteiligung von Niere und Leber diskutiert. Im Blut wird v.a. von einer Beteiligung von zirkulierenden Enzymen, wie z.B. die DNase I, Faktor H und Plasma-Faktor-VII-aktivierende Protease (FSAP) ausgegangen (Kustanovich et al., 2019). Diese Enzyme finden sich im Blutplasma und waren somit auch in den gewonnenen Blutplasma-Proben vorhanden. Aufgrund der genannten HWZ sowie den zuvor beschriebenen Erkenntnissen über cfDNA kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht zwingend kontinuierlich in das Blut freigesetzt wird, sondern ggf. auch schubweise z.B. im Rahmen eines Schubs der vorliegenden Erkrankung. Dementsprechend sind nicht nur Krankheitsstadium, -schwere, Behandlungsmodalitäten, Mikromilieu und individuelle Faktoren entscheidend für die Menge an cfDNA im Blut, sondern auch die Krankheitsaktivität und die HWZ der cfDNA. Da weiterhin die zu der DNA-Degradierung beitragenden Enzyme z.T. im Blutplasma befindlich sind, kann postuliert werden, dass die Degradierung der cfDNA nicht nur im zirkulierenden Blut stattfindet, sondern auch nach der Entnahme der Blutprobe in dieser voranschreitet. Dieser Hypothese folgend hat eine rasche Blutentnahme sowie anschließende Zentrifugation und ein rasches Einfrieren der Proben einen Einfluss auf die Stärke der Degradierung der cfDNA, ebenso wie eine rasche Isolation der cfDNA nach Auftauen der Proben aus dem Blutplasma. Bei der Gewinnung der Proben für diese Arbeit konnte dies garantiert werden. Dennoch war bei der Interpretation der Methylierungsergebnisse zu berücksichtigen, dass die HWZ der cfDNA die Experimente und deren Ergebnisse beeinflussen kann.

Die Grundlage für diese Arbeit bildete die Hypothese, dass bei an SFN erkrankten Personen eine größere Menge an cfDNA aus C-Fasern in das Blut freigesetzt wird als bei gesunden Personen, da bei Erkrankten vermehrt C-Fasern untergehen. Generell setzen jedoch alle Zellen cfDNA in Körperflüssigkeiten wie Blutplasma, Urin, Liquor etc. frei (Khier and Lohan, 2018). Somit gelangt auch bei SFN-Patienten ein großer Teil an cfDNA in das Blut, welcher nicht von C-Fasern stammt. Zudem gibt es Organbereiche oder Zelltypen, die sehr viel häufiger im menschlichen Körper vorkommen als C-Fasern. Daher stellte sich die Frage, ob der Anteil an cfDNA aus den besagten C-Fasern an der Gesamtheit an cfDNA im Blutplasma der Proben groß genug ist, um aussagekräftige Unterschiede in der Methylierung zwischen gesunden und an SFN erkrankten Probanden aufzuzeigen. Allerdings hat sich bei der Untersuchung zellfreier DNA bei Krebserkrankungen gezeigt, dass die Konzentration von cfDNA im Blut von an Krebs erkrankten Patienten deutlich größer ist als es sich von der Masse der

Zellen her erklären ließe (Bronkhorst et al., 2019). Diese Tatsache sowie, dass epigenetische Biomarker auch für die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen genutzt werden konnten, bei welchen geringere Mengen an cfDNA freigesetzt werden als bei Tumorerkrankungen, machte es dennoch plausibel, dass auch bei neuropathischen Erkrankungen wie der SFN ausreichend aus C-Fasern stammende cfDNA im Blutplasma der Patienten vorliegen könnte, um diese in Bezug auf deren Methylierung mit gesunden Kontroll-Personen vergleichen zu können. Dies wurde durch die Ergebnisse der Methylierungsanalysen der Loci SCN9A2 und SCN11A1 bekräftigt, da sich bei diesen z.T. deutliche Unterschiede in der Methylierung der Plasma-Patienten-Proben und der Kontroll-Proben zeigten.

6.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Genloci SCN9A2, mit Fokus auf die zweite und dritte CpG-Position, und SCN11A1 als mögliche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen zur Etablierung eines epigenetischen Biomarkers für SFN identifiziert werden.

Der Genlocus SCN9A1 zeigte nur eine sehr geringe Methylierung. Hier empfiehlt sich jedoch die Methylierungsanalyse von Plasma-Patienten-Proben, um zu prüfen, ob sich der Locus tatsächlich nicht als epigenetischer Biomarker eignet, oder ob es sich bei diesem ggf. um eine Bindestelle für einen Transkriptionsrepressor handeln könnte. Auf Letzteres würde eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben hinweisen. Sollte dies der Fall sein, so wäre für die weitere Forschung eine bioinformatische Analyse des Locus interessant, bei welcher geprüft wird, ob tatsächlich ein Transkriptionsrepressor bindet. Auch bei SCN10A2, bei welcher sich v.a. an den letzten beiden CpG-Positionen eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben den Kontrollen und den Biopsie-Proben gegenüber zeigte, wäre eine solche bioinformatische Analyse auf einen Transkriptionsrepressor-Bindestelle interessant.

Bei weiterer Recherche fanden sich zudem noch andere CpG-Positionen, die bereits als Methylierungsstellen bekannt sind. Dabei handelte es sich um die Position chr3:38,836,991 im Gen SCN10A, die Positionen chr2:167,232,412, chr2:167,232,646, chr2:167,232,680 und chr2:167,232,696 des Gens SCN9A sowie die Position chr3:39,054,994 (GRCh37/hg19) des Gens SCN11A. Diese Methylierungsstellen befinden sich alle in den *Promotor*-Regionen der jeweiligen Gene. Weiterhin fand sich in der *Promotor flanking Region* des Gens SCN11A eine zusätzliche bekannte Methylierungsstelle an Position chr3:38,991,907 (GRCh37/hg19). Diese Positionen könnten weitere mögliche Ansatzpunkte zur Etablierung eines epigenetischen Biomarkers für SFN darstellen.

Zudem wäre ein Monitoring des Methylierungsstatus im Krankheitsverlauf sowie unter Therapie der SFN bei Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien und mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen interessant. Auch wäre eine Erweiterung der Methylierungsanalyse auf

eine größere Anzahl an Patienten- und Kontroll-Proben nötig, um die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu validieren.

Nach der Etablierung von CpG-Positionen in der *Promotor*-Region von C-Faser-spezifischen Genen als epigenetische Biomarker sollte eine alternative diagnostische Methode zur Detektion des Methylierungsstatus gefunden werden, da die Sanger Sequenzierung von Bisulfit-konvertierter, klonierter und PCR-amplifizierter DNA sehr kosten-, personal- und zeitaufwändig ist. Eine Möglichkeit wäre z.B. die MSP (Methylierungsspezifische PCR). Hierbei werden, wie bei Derks et al. (2004) beschrieben, zwei methylierungsspezifische *Primer* erstellt. Der unmethylierte *Primer* amplifiziert ausschließlich unmethylierte bisulfit-konvertierte DNA, der methylierte *Primer* ist hingegen spezifisch für methylierte bisulfit-konvertierte DNA. Die MSP ist ein schnelles und kostengünstiges Verfahren, geeignet für Hochdurchsatz-Analysen von klinischen Proben. Sie kann weiterhin als *nested* MSP oder *multiplex* MSP durchgeführt werden, bei welcher zudem ein PCR-Schritt mit *Primern* vor die MSP geschaltet wird, die nicht zwischen methyliert und unmethyliert unterscheiden und die DNA-Region der MSP-*Primer* flankieren. Eine *nested* MSP ist sensitiver (1 methylierte Sequenzen in >50000 unmethylierten Sequenzen) als eine alleinige MSP (1 methylierte Sequenzen in 1000 unmethylierten Sequenzen) und kann auch für die Analyse von kleinen Mengen geringqualitativer DNA genutzt werden. Über die Nutzung von fluoreszenzmarkierten MSP-*Primern* kann zudem eine Quantifizierung der Anzahl der methylierten Sequenzen über eine quantitative *real-time* PCR erfolgen (Derks et al., 2004). Alternativ stellt auch die Pyrosequenzierung eine Option zur Detektion des Methylierungsstatus nach Etablierung von entsprechenden epigenetischen Biomarkern dar. Diese basiert auf der Methode des *sequencing-by-synthesis* und detektiert die Nukleotide bei Einbau während der Synthese eines komplementären DNA-Strangs anhand einer Lichtreaktion, die auf einer Abspaltung von Pyrophosphat beruht. Die Pyrosequenzierung ermöglicht die parallele Sequenzierung mehrerer Proben, ist schneller und kostengünstiger als die Sanger-Sequenzierung und vermeidet zudem den *Bias*-behafteten Schritt der Klonierung (Siqueira et al., 2012).

Für die weitere Analyse der Bedeutung der verschiedenen Methylierungsmuster könnten zudem Genexpressionanalysen durchgeführt werden, um herauszufinden, wie und ob diese durch die jeweiligen Methylierungsmuster beeinflusst wird.

Neben der Untersuchung der DNA-Methylierung hatte in diversen Studien auch die Analyse von cfDNA *fragmentation patterns* anhand einer *Liquid Biopsy* großes Potenzial gezeigt und könnte sich als eine weitere Möglichkeit bei der Suche nach epigenetischen Biomarkern bei SFN anbieten (Gai and Sun, 2019).

Die Small-Fiber-Neuropathie ist eine langsam progrediente Erkrankung, die durch die Nervenschädigung sowie den Untergang von kleinen unmyelinisierten peripheren Nervenfasern, den sogenannten A δ - und C-Fasern, verursacht wird. Diese finden sich z.B. in der Haut sowie in peripheren Nerven und diversen Organen (Themistocleous et al., 2014). Betroffene zeigen meist brennende Schmerzen akral sowie in den unteren Extremitäten (Sommer and Üçeyler, 2018). Die aktuelle Diagnostik der SFN fußt u.a. auf quantitativen sensorischen Tests aber v.a. auf der Entnahme einer Hautstanzbiopsie zur Diagnosesicherung (Sommer and Üçeyler, 2018). Da die Hautstanzbiopsie nicht bei allen Patienten anwendbar ist und mit Schmerzen sowie Komplikationen verbunden sein kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Möglichkeit gesucht, eine Methode zu etablieren, bei der die Small Fiber Neuropathie mithilfe einer einfachen Blutentnahme anhand epigenetischer Biomarker diagnostiziert werden kann. Dafür wurden insgesamt vier Regionen in den Promotorregionen der Gene SCN9A, SCN10A und SCN11A untersucht, die für Untereinheiten der Nav-Kanäle Nav1.7, 1.8 und 1.9 codieren und spezifisch in C-Fasern exprimiert werden. Dabei wurden die Methylierungsverhältnisse der ausgewählten Genabschnitte zwischen gesunden Kontroll-Personen und an SFN erkrankten Patienten verglichen. DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation, kann vererbt werden und findet meist an CpG-Positionen statt (Walter, 2018). Daher wurden für die Suche nach einem epigenetischen Biomarker CpG-Positionen im Bereich der Promotorregionen der genannten Gene untersucht. Als weitere Kontrolle dienten zudem Proben von Hautstanzbiopsien von Patienten, die die Methylierungsverhältnisse der Zellen der Epidermis und Dermis darstellen sollten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die Promotorregion der genannten Gene, da diese C-Faser spezifisch sind, in Gewebe anderen Ursprungs methyliert und somit transkriptiv stillgelegt vorfinden, in den C-Fasern selbst jedoch unmethyliert und aktiv sind. Dieser Hypothese zufolge sollte der cfDNA-Anteil von C-Fasern im Blut der an SFN erkrankten Patienten höher sein als bei den gesunden Kontrollpersonen, da bei diesen vermehrt C-Fasern untergehen. Somit wäre bei den an SFN erkrankten Patienten mit einer Hypomethylierung der untersuchten Regionen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen zu rechnen. Zur Analyse der DNA-Methylierung wurde eine Methode basierend auf der Einzelklonsequenzierung von aus dem Blutplasma isolierter, bisulfit-konvertierter und PCR-amplifizierter cfDNA mit anschließender Sequenzierung genutzt. Die Methylierungsverhältnisse wurden daraufhin auf drei Ebenen analysiert, auf der Ebene des Methylierungs-*contents*, der Methylierungslevel und der Methylierungsmuster. In Zusammenschau der Ergebnisse dieser drei Analyse-Ebenen ergab sich v.a. für die Regionen SCN9A2 und SCN11A1 eine deutliche Hypomethylierung einer der beiden untersuchten Plasma-Patienten-Proben den Kontroll-Proben gegenüber. Daher konnte die Annahme ge-

troffen werden, dass sich diese beiden Loci gut für die Etablierung eines epigenetischen Biomarkers bei SFN eignen. Die beiden im Rahmen dieser Arbeit analysierten Plasma-Patienten-Proben zeigten an beiden relevanten Genloci deutliche Unterschiede ihren Methylierungsgrad betreffend. So wies eine der beiden (P1) eine Hypomethylierung auf, die andere (P2) jedoch zeigte sich von ihrer Methylierung her auf einem ähnlichen Niveau wie die Kontroll-Proben. Es wurde daher die Theorie aufgestellt, dass sich die beiden Patienten in ihrem Krankheitsstadium unterscheiden bzw. sich der eine (P2) bei Probenentnahme nicht in einem Krankheitsschub befand und daher deren Ergebnisse so stark voneinander abwichen. Deshalb wäre für weiterführende Untersuchungen die Analyse der Genloci SCN9A2 und SCN11A1 bei einer größeren Patientenanzahl sowie Patienten in einem unterschiedlichen Krankheitsstadium nötig. Die anderen beiden Genloci, die im Rahmen dieser Arbeit ausgewertet wurden zeigten entweder eine insgesamt sehr geringe bis keine Methylierung (SCN9A1) oder eine Hypermethylierung der Plasma-Patienten-Proben gegenüber den Kontrollen (SCN10A2), sodass diese als epigenetische Biomarker bei SFN wahrscheinlich eher nicht geeignet waren. Allerdings bestand bei beiden die Möglichkeit, dass es sich um Bindestellen für Transkriptionsrepressoren handelt, weshalb bei SCN9A1 die Methylierungsanalyse von Plasma-Patienten-Proben und bei beiden eine bioinformatische Analyse nötig wäre, um endgültig die Eignung als epigenetischer Biomarker zu klären. Die Biopsie-Proben zeigten sich in ihren Ergebnissen durchwachsen, bei SCN9A1, SCN11A1 und der letzten der drei bei SCN10A2 untersuchten CpG-Positionen näherten sie sich erwartungsgemäß den Werten der Blutplasma-Kontrollen an; an den anderen CpG-Positionen von SCN10A2 sowie bei SCN9A2 zeigten sie jedoch keine Annäherung oder auch starke Abweichungen in ihrer Methylierung. Ob anhand dieser Proben valide Aussagen getroffen werden können, war daher unklar.

Um die beiden Genloci SCN9A2 und SCN11A1 als epigenetische Biomarker zu etablieren, müsste eine größere Patientenzahl untersucht werden. Nach Etablierung der Biomarker könnte dann eine kosten- und zeiteffizientere Methode zur Detektion des Methylierungsstatus angestrebt werden, wie beispielsweise die MSP oder die Pyrosequenzierung. Auch Genexpressionsanalysen sowie die Analyse von cfDNA *fragmentation patterns* anhand einer *Liquid Biopsy* könnten Potenzial für weitere Forschung in diesem Thema bergen.

ALGUIRE, P. C. & MATHES, B. M. (1998) Skin biopsy techniques for the internist. *J Gen Intern Med*, 13, 46-54.

BAKER, M. D. & NASSAR, M. A. (2020) Painful and painless mutations of SCN9A and SCN11A voltage-gated sodium channels. *Pflugers Arch*, 472, 865-880.

BRONKHORST, A. J., UNGERER, V. & HOLDENRIEDER, S. (2019) The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif*, 17, 100087.

CAZZATO, D. & LAURIA, G. (2017) Small fibre neuropathy. *Curr Opin Neurol*, 30, 490-499.

CHATTERJEE, R. & VINSON, C. (2012) CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1819, 763-70.

CROSSLEY, B. M., BAI, J., GLASER, A., MAES, R., PORTER, E., KILLIAN, M. L., CLEMENT, T. & TOOHEY-KURTH, K. (2020) Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest*, 32, 767-775.

DAS, J. & MAITRA, A. (2021) Maternal DNA Methylation During Pregnancy: a Review. *Reprod Sci*, 28, 2758-2769.

DERKS, S., LENTJES, M. H., HELLEBREKERS, D. M., DE BRUÏNE, A. P., HERMAN, J. G. & VAN ENGELAND, M. (2004) Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol*, 26, 291-9.

DRAGUHN, A. (2019) Aktionspotenziale. In: PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. (eds.) *Physiologie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.

DUAN, G., SUN, J., LI, N., ZHENG, H., GUO, S., ZHANG, Y., WANG, Q., YING, Y., ZHANG, M., HUANG, P. & ZHANG, X. (2018) A variant in the SCN10A enhancer may affect human mechanical pain sensitivity. *Mol Pain*, 14, 1744806918763275.

EHRlich, M. (2019) DNA hypermethylation in disease: mechanisms and clinical relevance. *Epigenetics*, 14, 1141-1163.

GAI, W. & SUN, K. (2019) Epigenetic Biomarkers in Cell-Free DNA and Applications in Liquid Biopsy. *Genes (Basel)*, 10.

GALETZKA, D., BÖCK, J., WAGNER, L., DITTRICH, M., SINIZYN, O., LUDWIG, M., ROSSMANN, H., SPIX, C., RADSAK, M., SCHOLZ-KREISEL, P., MIRSCH, J., LINKE, M., BRENNER, W., MARRON, M., POPLAWSKI, A., HAAF, T., SCHMIDBERGER, H. & PRAWITT, D. (2022) Hypermethylation of RAD9A intron 2 in childhood cancer patients, leukemia and tumor cell lines suggest a role for oncogenic transformation. *Excli j*, 21, 117-143.

GORAL DR. RER. NAT., R. O. (2015) *Molekulare Funktion des spannungsgesteuerten Natriumkanals hNav1.9*.

GRAUS, F., DELATTRE, J. Y., ANTOINE, J. C., DALMAU, J., GIOMETTO, B., GRISOLD, W., HONNORAT, J., SMITT, P. S., VEDELER, C., VERSCHUUREN, J. J., VINCENT, A. & VOLTZ, R. (2004) Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 1135-40.

HAMMI, C. & YEUNG, B. (2021) Neuropathy. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

HAUK, A. (2003) Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit*, 43.

HOLINSKI-FEDER, E. (2017) DNA-Untersuchung – Diagnostische Anwendung beim Menschen. In: MURKEN, J. D., GRIMM, T., HOLINSKI-FEDER, E. & ZERRES, K. (eds.) *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 9. teilaktualisierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

HORN, F. (2018) DNA-Methylierung. In: HORN, F. (ed.) *Biochemie des Menschen*. 7., korrigierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

HOTH, M. & RETTIG, J. 2021. Grundlagen der Neurophysiologie. In: BEHREND, J., BISCHOFBERGER, J., DEUTZMANN, R., EHMKE, H., FRINGS, S., GRISSMER, S., HOTH, M., KURTZ, A., LEIPZIGER, J., MÜLLER, F., PEDAIN, C., RETTIG, J., WAGNER, C. & WISCHMEYER, E. (eds.) Duale Reihe Physiologie. 4., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.

KAISER, R. (1999) Paraneoplastische neurologische Syndrome¶Diagnostische und pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern. *Der Nervenarzt*, 70, 688-701.

KHIER, S. & LOHAN, L. (2018) Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future Sci OA*, 4, Fso295.

KIM, K. T., ONGUSAHA, P. P., HONG, Y. K., KURDISTANI, S. K., NAKAMURA, M., LU, K. P. & LEE, S. W. (2004) Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent mitotic spindle checkpoint. *J Biol Chem*, 279, 38597-602.

KNIPPERS, R. (2018) Gentechnik oder das Klonieren von DNA-Fragmenten. In: NORDHEIM, A. & KNIPPERS, R. (eds.) *Molekulare Genetik*. 11., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

KOIKE, H., TANAKA, F. & SOBUE, G. (2011) Paraneoplastic neuropathy: wide-ranging clinicopathological manifestations. *Curr Opin Neurol*, 24, 504-10.

KOOLMAN, J. & RÖHM, K.-H. (2019) Epigenetik. In: KOOLMAN, J. & RÖHM, K.-H. (eds.) *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 5., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

KUSTANOVICH, A., SCHWARTZ, R., PERETZ, T. & GRINSHUP, A. (2019) Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*, 20, 1057-1067.

LAIRD, P. W. (2003) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*, 3, 253-66.

LETI, F., LLACI, L., MALENICA, I. & DISTEFANO, J. K. (2018) Methods for CpG Methylation Array Profiling Via Bisulfite Conversion. *Methods Mol Biol*, 1706, 233-254.

LIAO, C. G., LIANG, X. H., KE, Y., YAO, L., LIU, M., LIU, Z. K., HE, L., GUO, Y. X., BIAN, H., CHEN, Z. N. & KONG, L. M. (2022) Active demethylation upregulates CD147 expression promoting non-small cell lung cancer invasion and metastasis. *Oncogene*, 41, 1780-1794.

LINDNER, M., LAINE, V. N., VERHAGEN, I., VIITANIEMI, H. M., VISSER, M. E., VAN OERS, K. & HUSBY, A. (2021) Rapid changes in DNA methylation associated with the initiation of reproduction in a small songbird. *Molecular Ecology*, 30, 3645-3659.

- MENSE, S. (2020)** Nervensystem – Grundlagen. In: AUMÜLLER, G., AUST, G., CONRAD, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MAIO, G., MAYERHOFER, A., MENSE, S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANEL-BOROWSKI, K., WENNEMUTH, G., WOLFF, W. & WURZINGER, L. J. (eds.) *Duale Reihe Anatomie*. 5., korrigierte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- MOORE, L. D., LE, T. & FAN, G. (2013)** DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38.
- MUCCIOLI, L., NICODEMO, M., CORTELLI, P. & GUARINO, M. (2020)** Subacute-onset paraneoplastic autonomic neuropathy associated with prostate cancer. *Clin Auton Res*, 30, 579-580.
- MÜLHARDT, C. & MÜLHARDT, C. (2013)** Die Klonierung von DNA-Fragmenten. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 133-161.
- PAPAGIANNI, A. (2018)** Schmerz-assoziierte elektrisch evozierte Potentiale (PREP) bei Patienten mit neuropathischen Schmerzsyndromen, Pain-related evoked potentials (PREP) in patients with neuropathic pain.
- RAHAT, B., ALI, T., SAPEHIA, D., MAHAJAN, A. & KAUR, J. (2020)** Circulating Cell-Free Nucleic Acids as Epigenetic Biomarkers in Precision Medicine. *Front Genet*, 11, 844.
- SENTIES-MADRID, H. & VEGA-BOADA, F. (2001)** Paraneoplastic syndromes associated with anti-Hu antibodies. *Isr Med Assoc J*, 3, 94-103.
- SIEGMUND, K. D. & LAIRD, P. W. (2002)** Analysis of complex methylation data. *Methods*, 27, 170-8.
- SIEMENS, J. & SOPPA, J. (2017)** In-vitro–Methoden der Molekularbiologie. In: MUNK, K. (ed.) *Taschenlehrbuch Biologie: Genetik*. 2. unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.
- SIQUEIRA, J. F., JR., FOUAD, A. F. & RÔÇAS, I. N. (2012)** Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*, 4.
- SOMMER, C. & ÜÇEYLER, N. (2018)** Small-Fiber-Neuropathien. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 86, 509-518.
- SOPACUA, M., HOEIJMAKERS, J. G. J., MERKIES, I. S. J., LAURIA, G., WAXMAN, S. G. & FABER, C. G. (2019)** Small-fiber neuropathy: Expanding the clinical pain universe. *J Peripher Nerv Syst*, 24, 19-33.
- TAVEE, J. O. (2018)** Office approach to small fiber neuropathy. *Cleve Clin J Med*, 85, 801-812.
- THEMISTOCLEOUS, A. C., RAMIREZ, J. D., SERRA, J. & BENNETT, D. L. (2014)** The clinical approach to small fibre neuropathy and painful channelopathy. *Pract Neurol*, 14, 368-79.
- VOLTZ, R. (2002)** Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis, and therapy. *Lancet Neurol*, 1, 294-305.
- WALTER, J. (2018)** Epigenetik. In: NORDHEIM, A. & KNIPPERS, R. (eds.) *Molekulare Genetik*. 11., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

WARNECKE, P. M., STIRZAKER, C., SONG, J., GRUNAU, C., MELKI, J. R. & CLARK, S. J. (2002) Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*, 27, 101-7.

WORM ØRNTOLT, M. B., JENSEN, S., HANSEN, T. B., BRAMSEN, J. B. & ANDERSEN, C. L. (2017) Comparative analysis of 12 different kits for bisulfite conversion of circulating cell-free DNA. *Epigenetics*, 12, 626-636.

WRECZYCKA, K., GOSDSCHAN, A., YUSUF, D., GRÜNING, B., ASSENOV, Y. & AKALIN, A. (2017) Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *J Biotechnol*, 261, 105-115.

ZIDEK, W. (2021) Morbus Fabry. In: BAENKLER, H.-W., BALS, R., GOLDSCHMIDT, H., AHN, J.-M., HINTERSEER, M., KNEZ, A., MÖHLIG, M., PFEIFFER, A. F. H., SCHÄFER, J., SCHMIDT, H. H. J., SEILER, F., SPRANGER, J., VOLL, R. E., WITZENS-HARIG, M. & ZIDEK, W. (eds.) *Kurzlehrbuch Innere Medizin*. 4., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.

Internetquellen:

- Williams et al. (2019): Enzymatic Methyl-seq The Next Generation of Methylome Analysis. [online]
<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/enzymatic-methyl-seq-the-next-generation-of-methylome-analysis> [zuletzt abgerufen am 30. August 2023]
- Schlereth T. et al. (2019): Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie [online]
https://register.awmf.org/assets/guidelines/030-114I_S2k_Diagnose-nicht-interventionelle-Therapie-neuropathischer-Schmerzen_2022-06.pdf [zuletzt abgerufen am 10.10.2021]
- Zymo Research (n.d.): Bisulfite Beginner Guide [online]
<https://www.zymoresearch.de/pages/bisulfite-beginner-guide> [zuletzt abgerufen am 10.01.2023]
- Promega Corporation (2021): technical manual, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems [online]
<https://www.promega.de/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-vector-systems/?catNum=A3600> [zuletzt abgerufen am 29.01.2023]
- Liu Y. (2020): Durchführung einer venösen Blutentnahme [online]
<https://www.msdmanuals.com/de-de/profi/intensivmedizin/durchfu%C3%BChrung-von-peripheren-vaskul%C3%A4ren-eingriffen/durchfu%C3%BChrung-einer-ven%C3%B6sen-blutentnahme> [zuletzt abgerufen am 07.03.2023]
- Amboss (2023): Arterieller Katheter – Klinische Anwendung [online]
https://www.amboss.com/de/wissen/Arterieller_Katheter_-_Klinische_Anwendung/ [abgerufen am 07.03.2023]
- Altmeyer P. (2021): SCN9a-Gen [online]

<https://www.altmeyers.org/de/innere-medizin/scn9a-gen-111470#literatur>, [zuletzt abgerufen am 23.03.2023]

- Gardiner-Garden and Frommer (1987): CpG islands in vertebrate genomes., J. Mol. Biol. 196:261-82 [online]
https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=1569662841_eF5Xxbd7f9AY9Ifq4kczFUW6WWR7&db=hg19&c=chr2&l=167232437&r=167233499&o=167232388&t=167232711&g=cpgIslandExt&i=CpG%3A+31 [zuletzt abgerufen am 13.02.2023]
- Weizmann Institute of Science (2023): SCN9A Gene - Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 9 [online]
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SCN9A>, [abgerufen am 13.02.2023]
- University of California Santa Cruz Genomic Institute, (n.d) [online]
<https://genome.ucsc.edu/> [zuletzt abgerufen am 13.02.2023]
- Ensembl (2023): sodium voltage-gated channel alpha subunit 11 [online]
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;fdb=funcgen;g=ENSG00000168356;r=3:38992002-38993199;rf=ENSR00000683130, [zuletzt abgerufen am 14.02.2023]

Danksagung

Ich bedanke mich bei der AG Prawitt für die Unterstützung und Begleitung meiner Dissertation. Ich bedanke mich außerdem von Herzen bei Renee, die mir während der ganzen Laborzeit und auch später zur Seite stand und ohne die alles nur halb so schön gewesen wäre. Ich bedanke mich bei meinen Freunden, v.a. Alissa, Armin und Hanna, dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten, auch wenn etwas nicht so lief wie geplant. Auch meinem Bruder möchte ich danken, für die Hilfe, diese Arbeit optisch so zu gestalten, wie ich es mir vorgestellt habe. Vor allem aber bedanke ich mich bei meiner Mutter, die mich immer unterstützt, beraten und gefördert hat, nicht nur während meiner Arbeit an dieser Dissertation, sondern mein ganzes Leben lang.

Vielen Dank euch allen.

SUSANNE KRISTIN MESSER



PROFIL

GEBURTSDATUM:
04/09/1996

GEBURTSORT:
55543 Bad Kreuznach

FAMILIENSTAND:
ledig

SONSTIGES

Führerschein Klasse 3

EDV-KENNTNISSE:
Word, Excel, Power Point, Endnote

AUSBILDUNG

Grundschule St. Martin Norheim
09/2003 - 07/2007

Gymnasium an der Stadtmauer, Bad Kreuznach
08/2007 – 11/03/2016
Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz (Humanmedizin)
10/2016 – 11/05/2023: Studium der Humanmedizin
28/07/2018: Physikum
März 2019: Beginn Dissertation: Untersuchung zellfreier DNA auf epigenetische Biomarker bei Small Fiber Neuropathie
Institut: Molekulare Pädiatrie, Universitätsklinikum Mainz
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. et med. Dirk Prawitt
07/04/2022: M2 Staatsexamen
16/05/2022 – 11/05/2023: Praktisches Jahr im St. Josefs-Hospital Wiesbaden, Wahlfach Orthopädie
11/05/2023: M3 Staatsexamen
01/09/2023-heute: Ärztin in Weiterbildung, Orthopädie/ Unfallchirurgie, St. Josefs-Hospital Wiesbaden

PRAKTIKA

Insgesamt 90 Tage Pflegepraktikum (Marienwörth: HNO/ Onkologie, Diakonie: HNO; Bad Kreuznach)
2016 – 2017

Famulatur Allgemeinmedizin (Praxis Dipl. med. Peter Heß, Mainz)
07/03/2019 – 09/04/2019

Famulatur Plastische Chirurgie (Diakonie, Bad Kreuznach)
02/09/2019 – 04/10/2019

Famulatur Orthopädie/ Unfallchirurgie (Orthopädisch-Traumatologische Praxis Mainz - Dr. Jakob Grevenstein/ Prof. Dr. Matthias Hansen)
27/02/2020 – 30/03/2020

Famulatur Gynäkologie (Diakonie Bad Kreuznach)
24/08/2020 – 04/09/2020

Famulatur Innere/Gastroenterologie (Diakonie Bad Kreuznach)
07/09/2020 – 07/10/2020

Famulatur Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie (Universitätsmedizin Mainz)
08/03/2021 – 22/03/2021

Famulatur Tumororthopädie (Universitätsklinikum Heidelberg)
27/09/2021 – 08/10/2021

Hospitation Orthopädie (Universitätsmedizin Mainz)
15/11/2021 – 18/11/2021

ARBEITSERFAHRUNG

Betreuerin beim Trägerverein Betreuende Grundschule Norheim e.V.
03/2008 – 01/2011

Ehrenamtliche Betreuerin beim Kinderdorf Salinental
03/2008 – 01/2011

Studentische Hilfskraft bei der Stiftung Mainzer Herz
Oktober 2018 – 2020

Studentische Hilfskraft in der Orthopädie/ Unfallchirurgie des St. Josefs-Hospitals, Wiesbaden
01/03/2020 – 15/05/2022