

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Differentielle Expression spinaler microRNAs in einem chronisch neuropathischen Schmerzmodell der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maike Brendel

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. I. Bauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. O. Aktas

*„Es ist nicht genug zu wissen, man muß es auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen, man muß es auch tun.“*

Johann Wolfgang von Goethe

Die Studie wurde gefördert durch die Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Originalarbeit:

Brandenburger, T., Castoldi, M., **Brendel, M.**, Grievink, H., Schlösser, L., Werdehausen, R., Bauer, I., Hermanns, H., (2012), Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain. *Neuroscience Letters* (506) 281–286.

Kongressbeiträge:

Kongress der European Society of Anaesthesiology 2011: Brandenburger, T., Castoldi, M., **Brendel, M.**, Schlösser, L., Bauer, I., Hermanns, H., (2011), Expression of microRNAs in the rat spinal cord after chronic constriction injury of the sciatic nerve: 14AP1-1. *European Journal of Anaesthesiology* (28) 192

Doktorandenkongress der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2011: **Brendel, M.**, Castoldi, M., Bauer, I., Schlösser, L., Hermanns, H., Brandenburger, T.; Poster: „Expression spinaler microRNAs im *Chronic Constriction Injury (CCI)* Modell für neuropathischen Schmerz der Ratte“.

Deutscher Anästhesiekongress 2011: **Brendel, M.**, Castoldi, M., Bauer, I., Schlösser, L., Hermanns, H., Brandenburger, T., (2011), Poster PO-3.9.1: Expression spinaler microRNAs im *Chronic Constriction Injury (CCI)* Modell für neuropathischen Schmerz der Ratte. *Anästh Intensivmed* 2011 (52) 452

Deutscher Anästhesiekongress 2011: Schlösser L, Bauer I, Brandenburger T, Werdehausen R, Barthel F, Urban A, **Brendel M**, Hermanns H., (2011), Poster PO-4.1.4: Einfluss von neuropathischen Schmerzen auf die Expression von Glycintransportern im Rückenmark und in Spinalganglien der Ratte. *Anästh Intensivmed* 2011 (52) 464

Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNA) sind kleine, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Translation oder Degradation von Ziel-messengerRNAs (mRNA) regulieren und damit den Proteingehalt der Zelle beeinflussen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems. Neuropathischer Schmerz wird durch eine Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems ausgelöst. Dadurch kommt es zu einer Kaskade adaptiver und maladaptiver Veränderungen, welche zu einer veränderten Struktur des Nervensystems führen. Ob miRNAs bei diesen pathophysiologischen Veränderungen eine Rolle spielen, ist bisher nicht bekannt. Das Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob eine veränderte Expression von miRNAs im Rückenmark der Ratte zur Entstehung und Erhaltung neuropathischer Schmerzen beiträgt.

Nach Genehmigung der zuständigen Behörde wurden die Versuche an männlichen Wistar Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden in zwei Gruppen randomisiert. Bei Tieren der Gruppe 1 wurde der linke *Nervus ischiadicus* ligiert (*chronic constriction injury (CCI)*) zur Induktion eines neuropathischen Schmerzes. Bei Tieren der Gruppe 2 wurde der Nerv freipräpariert, jedoch nicht ligiert (*Sham*). Es wurden vier verschiedene Zeitpunkte nach *CCI*- bzw. *Sham*-OP untersucht: vier Stunden (4 h), ein Tag (1 d), sechs Tage (6 d) und zwölf Tage (12 d) (je n = 6). Die Entstehung einer mechanischen *Allodynie* als Parameter für die Entwicklung einer Neuropathie wurde vor der OP und jeweils vor der Gewebeentnahme untersucht. Die Rückenmarksproben wurden aus den Segmenten L4-L6 entnommen und die RNA isoliert. Die relative Expression verschiedener miRNAs wurde mit *miChip miRNA-Arrays* und *qPCR* untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von t-Tests, wobei ein $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Die Verhaltenstestungen bestätigten die Entwicklung einer Neuropathie in der *CCI*-Gruppe innerhalb von 6 Tagen. Die Ergebnisse der *miRNA-Arrays* zeigten veränderte Expressionslevel von 27 miRNAs nach vier Stunden, sieben miRNAs nach einem Tag, einer miRNA nach sechs Tagen und drei miRNAs nach zwölf Tagen. Die relativen Veränderungen waren moderat (0,69 bis 1,26 -fach). Die *qPCR* ausgewählter miRNAs zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede im Rückenmark von *CCI*-Tieren im Vergleich mit *Sham* zu den untersuchten Zeitpunkten.

Die Induktion von neuropathischem Schmerz durch das *CCI*-Modell führt bei Ratten zu den von uns untersuchten Zeitpunkten nicht zu signifikanten Veränderungen der miRNA-Expression im Rückenmark. Allerdings konnte für einige miRNAs teilweise eine deutliche Veränderung der Expression dargestellt werden, welche durchaus biologisch relevant sein könnte. Die von diesen miRNAs möglicherweise regulierten Zielproteine tragen zu den bereits bekannten und gut untersuchten Veränderungen der Struktur und Funktion des schmerzleitenden Systems im Bereich des Rückenmarks bei.

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz neuropathischer Schmerzen und der bisher unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten, ist es wichtig und notwendig, weitergehende Untersuchungen zur Rolle von miRNAs durchzuführen, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln, die auf der Regulation von miRNAs im Rahmen neuropathischer Schmerzen basieren.

Abkürzungen

AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
°C	<i>Grad Celcius</i>
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ca_v	spannungsabhängiger Calciumkanal
CCI	<i>chronic constriction injury</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C_T	<i>threshold cycle</i>
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
fc	<i>fold change</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure

GTP	Guanosintriphosphat
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
kg	Kilogramm
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
miRNA, miR	MicroRNA
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl der Proben
Na_v	spannungsabhängiger Natriumkanal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PSL	<i>partial sciatic ligation</i>
PWT	<i>Paw Withdrawal Threshold</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SCI	<i>spinal cord injury</i>
sec	Sekunden

tRNA	Transfer-RNA
TNF (α)	Tumornekrosefaktor (α)
TRBP	<i>transactivation response RNA binding protein</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
WNK3	<i>WNK lysine deficient protein kinase 3</i>

Inhalt

Zusammenfassung	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Neuropathischer Schmerz.....	1
1.1.1 Grundlagen.....	1
1.1.2 Mechanismen des neuropathischen Schmerzes	3
1.1.3 Zusammenfassung: Grundlagen neuropathischer Schmerz.....	8
1.2 MicroRNA	9
1.2.1 Grundlagen.....	9
1.2.2 Biogenese der miRNAs	9
1.2.3 Regulation der Translation.....	10
1.2.4 Einfluss auf Entwicklung und Plastizität des Nervensystems	11
1.2.5 MiRNAs und neurologische Krankheiten.....	13
1.2.6 MiRNAs im Zusammenhang mit Schmerz.....	13
1.2.7 MiRNA-Expression nach Induktion neuropathischer Schmerzen.....	16
1.2.8 Zusammenfassung: Grundlagen miRNA.....	18
2 Fragestellung.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte	20
3.2 Verwendete Software.....	22
3.3 Tierexperimentelle Untersuchungen.....	23
3.4 RNA-Isolierung	25
3.5 Bestimmung der RNA-Konzentration und -reinheit.....	26
3.6 RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese	26
3.7 <i>miRNA-Array (miChip)</i>	27
3.8 Reverse Transkription zur Synthese spezifischer <i>cDNA</i>	29
3.9 <i>Quantitative Real-Time PCR</i> zum Nachweis von miRNA.....	29

4	Ergebnisse	33
4.1	Testung der Pfotenrückzugslatenz	33
4.2	<i>Nanodrop</i> -Messung	34
4.3	RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese	34
4.4	<i>miRNA-Array</i>	34
4.5	<i>Real-Time PCR</i>	39
5	Diskussion.....	48
5.1	Diskussion der Methodik.....	49
5.1.1	Tiermodelle für neuropathischen Schmerz.....	49
5.1.2	Untersuchte Zeitpunkte.....	50
5.1.3	Rückenmark als Untersuchungsmaterial	51
5.1.4	Bestimmung der miRNA-Expressionslevel mittels <i>miChip-Array</i>	52
5.1.5	Bestimmung der miRNA-Expressionslevel mittels <i>qPCR</i>	53
5.2	Diskussion der Ergebnisse	54
5.2.1	Expressionsmuster von miRNAs im Rückenmark der Ratte.....	54
5.2.2	Relative Expression spinaler miRNAs nach induziertem chronischem neuropathischem Schmerz der Ratte.....	55
6	Schlussfolgerungen und Ausblick	58
7	Literatur	59
	Danksagung	81
	Eidesstattliche Versicherung.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Biogenese der miRNAs.	10
Abb. 2: Tiermodelle für neuropathischen Schmerz	23
Abb. 3: Versuchsgruppen	24
Abb. 4: TaqMan® <i>Real-Time PCR</i> -Prinzip.....	31
Abb. 5: Ergebnisse der Tests auf Entstehung einer mechanischen <i>Allodynie</i>	33
Abb. 6: RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese	34
Abb. 7: <i>Heatmap</i>	35
Abb. 8: Ergebnisse des <i>miChip-Arrays</i>	37
Abb. 9: Relative Expression signifikant veränderter miRNAs im <i>miChip-Array</i>	38
Abb. 10: Relative Expression der miR-10a	40
Abb. 11: Relative Expression der miR-30b	40
Abb. 12: Relative Expression der miR-99a	41
Abb. 13: Relative Expression der miR-100	42
Abb. 14: Relative Expression der miR-720	42
Abb. 15: Relative Expression der miR-1	43
Abb. 16: Relative Expression der miR-138	44
Abb. 17: Relative Expression der let-7f.....	44
Abb. 18: Relative Expression der miR-133a	45
Abb. 19: Regulation der Proteinexpression	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse <i>miChip-Array</i>	36
Tabelle 2: Ergebnisse der statistischen Auswertung der <i>qPCRs</i>	46
Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse von <i>miChip-Array</i> und <i>qPCR</i> ausgewählter miRNAs....	47

1 Einleitung

1.1 Neuropathischer Schmerz

1.1.1 Grundlagen

Schmerzen haben eine entscheidende Bedeutung für den Organismus. Sie schützen vor Verletzungen oder machen auf bereits eingetretene Schädigungen aufmerksam. So führen z. B. akute Schmerzen, welche bei Verletzung einer Extremität entstehen, dazu, dass eine Schutzhaltung eingenommen wird und die Verletzung oder Entzündung ausheilen kann. Eine völlig fehlende Nozizeption (Fähigkeit, Schmerz zu empfinden) führt zu wiederkehrenden Verletzungen bis hin zur Selbstverstümmelung (Cox u. a., 2006).

Bei chronischen Schmerzzuständen, wie z. B. den neuropathischen Schmerzen, ist diese Schutz- und Warnfunktion jedoch nicht mehr vorhanden, da diese Schmerzzustände auch ohne auslösenden Reiz dauerhaft bestehen. Neuropathische Schmerzen wurden 1994 von der *International Association for the Study of Pain (IASP)* definiert als „Schmerzen, die durch eine primäre Läsion oder Dysfunktion des Nervensystems ausgelöst oder hervorgerufen werden“ (Merskey, Bogduk, 1994). Diese Definition wurde von der *IASP* in Anlehnung an Treede et al. (Treede u. a., 2008) aktualisiert: „Neuropathische Schmerzen sind Schmerzen, die durch eine Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems ausgelöst werden“ (*IASP Taxonomy, 2014*). Bei dieser neueren Definition liegt der Fokus mehr auf der Tatsache, dass speziell der somatosensorische Teil des Nervensystems von einer Schädigung betroffen sein muss, um zur Entstehung neuropathischer Schmerzen zu führen (Jensen u. a., 2011).

In vielen Fällen ist unklar, wodurch die Schmerzen ausgelöst wurden und warum sie bestehen bleiben. Typische Symptome eines Patienten mit neuropathischen Schmerzen sind nicht erklärbare, weit verbreitete, brennende oder stechende Schmerzen am ganzen Körper und sensorische Defizite wie Taubheitsgefühle oder Kribbelparästhesien. Außerdem werden häufig nicht schmerzhaft Reize wie leichte Berührung der Haut bereits als schmerzhaft empfunden (*Allodynie*) und die Empfindlichkeit für schmerzhaft Reize kann erhöht sein (*Hyperalgesie*) (Campbell, Meyer, 2006; Dworkin u. a., 2007). Peri-

phere neuropathische Schmerzen resultieren aus einer Läsion des peripheren Nervensystems, z. B. durch ein mechanisches Trauma, metabolische Erkrankungen wie *Diabetes mellitus*, neurotoxische Chemikalien oder Medikamente und Infektionen wie z. B. *Herpes zoster* (Gürtelrose) (Campbell, 2001; Dyck u. a., 2000). Dadurch werden viele pathophysiologische Veränderungen sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem ausgelöst (Dworkin u. a., 2003). Die Prävalenz einer schmerzhaften diabetischen Neuropathie wird, je nach Quelle, mit 11-53% aller *Diabetes*-Patienten angegeben (Aslam u. a., 2014). Schmerz ist ebenso ein Symptom einer akuten *Herpes zoster*-Infektion, jedoch bleiben bei 15% der Patienten die Schmerzen auch nach Ausheilung der Infektion bestehen (postherpetische Neuralgie) (Niv, Maltzman-Tseikhin, 2005).

Zentrale neuropathische Schmerzen können durch Rückenmarksverletzungen, Schlaganfälle oder Krankheiten wie multiple Sklerose verursacht werden (Ducreux u. a., 2006). So leiden nach einem Schlaganfall bis zu 30% der Patienten an zentralen neuropathischen Schmerzen (Oh, Seo, 2015).

Ursprünglich wurden neuropathische Schmerzen in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Erkrankung klassifiziert und behandelt (Dworkin u. a., 2007). Da es jedoch, wie bereits erwähnt, durch die Plastizität des Nervensystems zu grundlegenden Veränderungen kommt, ist diese Herangehensweise nicht optimal. Die Krankheit beziehungsweise Verletzung ist nur der Auslöser einer ganzen Kaskade von Veränderungen, die zu neuropathischem Schmerz führen und diesen unterhalten (Costigan u. a., 2009).

Studien aus England und Frankreich zufolge leiden in Europa ca. 8% der Bevölkerung unter chronischen neuropathischen Schmerzen (Bouhassira u. a., 2008; Torrance u. a., 2006). Somit stellen chronische neuropathische Schmerzen ein eigenständiges Krankheitsbild und gleichzeitig ein gesellschaftliches, gesundheitspolitisches und ökonomisches Problem dar. Menschen mit chronischen Schmerzen leiden oft an Depressionen und Schlafstörungen und sind im Beruf weniger leistungsfähig sowie in ihrer Lebensqualität stark eingeschränkt (Baron, 2006). Da die Therapie jedoch bisher meistens symptomatisch ausgerichtet und bei vielen Patienten unzureichend ist, ist es nötig, die zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu untersuchen und besser zu verstehen, um kausale Therapieansätze entwickeln zu können.

1.1.2 Mechanismen des neuropathischen Schmerzes

Laut Definition entsteht neuropathischer Schmerz durch eine Läsion des nozizeptiven, also schmerzleitenden Teils des Nervensystems (Campbell, Meyer, 2006).

Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung neuropathischer Schmerzen ist abhängig von der Größe und der Anzahl verletzter Nerven sowie vom Entwicklungszustand (Reife) des Nervensystems (Moss u. a., 2007). So verursacht z. B. eine Verletzung des *Plexus brachialis* (Nervengeflecht am Arm) unter der Geburt keinen neuropathischen Schmerz bei Neugeborenen (Anand, Birch, 2002), während ca. 40% der Erwachsenen nach einer solchen Verletzung unter chronischen Schmerzen leiden (Htut u. a., 2006).

Es kommt als Folge der Verletzung sowohl zu adaptiven als auch zu maladaptiven Veränderungen. So zählen z. B. die Beseitigung von Zelldetritus, Veränderungen in der Rezeptordichte, um den fehlenden Eingang sensorischer Impulse auszugleichen, Induktion von Axon-Wachstum und die Remyelinisierung zu den adaptiven Mechanismen (Benn, Woolf, 2004; Cafferty u. a., 2008).

Auf der anderen Seite stehen die Entstehung abnormer Reizschwellen und ektooper Erregungen, verlangsamte Reizleitung, falsche synaptische Verbindungen und die Vernarbung von Gliazellen.

Zentrale Sensibilisierung:

Zentrale Sensibilisierung beruht auf synaptischer Plastizität. Durch die andauernde Aktivität der Nozizeptoren (Schmerzrezeptoren) bei neuropathischem Schmerz entsteht eine homo- und heterosynaptische Bahnung im Hinterhorn des Rückenmarks (Campbell u. a., 1988; Ji u. a., 2003; Magerl u. a., 1998; Woolf u. a., 1988). Wird der permanente Erregungseingang unterbrochen, nimmt die Hyperalgesie sofort ab (LaMotte u. a., 1991). Eine Variante der homosynaptischen Sensibilisierung ist das sogenannte „*wind-up*“ Phänomen. Dabei kommt es durch wiederholte niederfrequente Stimulation von C-Fasern zu einer steigenden Zahl von Aktionspotentialen im postsynaptischen Neuron durch kumulative Depolarisation der postsynaptischen Membran (Magerl u. a., 1998).

Es existieren zwei entscheidende Mechanismen der zentralen Sensibilisierung: die gesteigerte Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern (z. B. Glutamat, Substanz P) und die verstärkte synaptische Effizienz.

Auf der präsynaptischen Seite sind verschiedene synaptische Modulatoren und exzitatorische Aminosäuren beteiligt, die zu Veränderungen der Kinetik der

Ionenkanäle und einer gesteigerten Calcium-Kanaldichte führen (Hendrich u. a., 2008; Li u. a., 2004; Obata u. a., 2003). Dadurch strömt mehr Calcium ein und es wird mehr Glutamat freigesetzt. Auch eine Herabregulation von μ -Opioid-Rezeptoren (Kohno u. a., 2005) könnte zu gesteigerter Glutamat-Freisetzung führen.

Postsynaptisch kommt es durch Substanz P und andere Neuropeptide zu einer langsamen Depolarisation und somit zu einer Öffnung der glutamatabhängigen Calciumkanäle (N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren) und damit zu einem gesteigerten Calcium-Einstrom (Dougherty u. a., 1993; Duggan, 1995; Yoshimura, Yonehara, 2006). Außerdem werden vermehrt *AMPA*-(α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure)-Rezeptoren (eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren) in die Membran eingebaut (Harris u. a., 1996). Dadurch können auch ansonsten unterschwellige Reize die Nozizeptoren aktivieren (Costigan u. a., 2009). Das trägt sowohl zu dynamischer taktiler *Allodynie*, als auch zu sekundärer Hypersensibilität bei (Campbell, Meyer, 2006).

Einfluss von Entzündungsmediatoren und periphere Sensibilisierung:

Nozizeptoren reagieren unmittelbar auf Zytokine, Chemokine und andere Entzündungsmediatoren, die im entzündeten Gewebe entstehen (Binshtok u. a., 2008). Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Bradykinin und *Nerve Growth Factor* lösen Aktionspotentiale aus, indem vermehrt spannungsabhängige Ionenkanäle in die Membran eingebaut werden. Dadurch sinkt die Reizschwelle und die Erregbarkeit der Membran steigt. Diese Immunmediatoren werden auch nach einer Nervenschädigung von peripheren Immunzellen und Mikroglia im Rückenmark gebildet und tragen somit zur Entstehung von neuropathischem Schmerz bei (Costigan u. a., 2009). Es gibt Hinweise, dass diese Sensibilisierung auch ohne vorhergehende Entzündung durch bestimmte Reize stattfinden kann (Fields u. a., 1998).

Auch intakte Nozizeptoren können in Folge einer Nervenschädigung sensibilisiert werden. So entwickelt sich z. B. eine gesteigerte Empfindlichkeit für TNF- α (Schäfers u. a., 2003).

Ektope Erregungsentstehung:

Eine Eigenschaft des neuropathischen Schmerzes ist Schmerzempfindung ohne einen identifizierbaren Reiz. Dieser Schmerz entsteht durch ektope Aktionspotentiale, die

innerhalb des schmerzleitenden Systems entstehen und nicht aus den peripheren Nervenendigungen stammen. Diese spontanen Erregungen entstehen an verschiedenen Stellen. Im sogenannten Neurom, einer knotigen Vernarbung an der Stelle, an welcher der Nerv geschädigt wurde (Blumberg, Jänig, 1984), ebenso wie in den Spinalganglien (Amir u. a., 2005) und in benachbarten intakten Afferenzen (Wu u. a., 2002).

Eine wichtige Rolle im Rahmen der ektopen Erregungsentstehung spielen spannungsabhängige Natrium-Kanäle, weshalb die Erregungen auch mit Lokalanästhetika, genauer unselektiven Natrium-Kanalblockern, gehemmt werden können (Sheets u. a., 2008). Es ist allerdings noch nicht geklärt, welche Kanäle genau für die Erregung verantwortlich sind. Studien lieferten Hinweise auf eine besondere Bedeutung von Na_v 1.3-Kanälen (spannungsabhängiger Natriumkanal, Subtyp 1.3) (Hains u. a., 2003), allerdings zeigt ein *Knockout* dieses Kanals keinen Einfluss auf neuropathischen Schmerz oder die ektopen Erregungsentstehung (Nassar u. a., 2006). Auch andere Kanäle wie Na_v 1.8, Na_v 1.9 und Ca_v 2.2 (spannungsabhängiger Calciumkanal, Subtyp 2.2) scheinen eine Rolle zu spielen. So zeigen z. B. Mäuse mit einer Deletion des Ca_v 2.2 ein verringertes neuropathisches Schmerzverhalten (Saegusa u. a., 2001).

Weiterhin entsteht auch spontane Aktivität in den unverletzten Nozizeptoren, welche die gleiche Region wie die verletzten Nervenfasern innervieren (Ali u. a., 1999; Djouhri u. a., 2006; Wu u. a., 2001). Obwohl die Entladungsfrequenz in diesen unverletzten C-Fasern im Allgemeinen sehr gering ist, reicht sie doch aus, um *Hyperalgesie* zu erzeugen (Klede u. a., 2003).

Schmerzvermittlung über niederschwellige A β -Fasern:

Schmerzempfindungen werden normalerweise über unmyelinisierte C-Fasern und dünnmyelinisierte A δ -Fasern vermittelt. Im Rahmen der Hypersensibilität kommt es zu einem Verlust der terminalen C-Faser-Endigungen (Devigili u. a., 2008). Weiterhin verschwindet die Hypersensibilität, wenn die Überleitung in den dicken myelinisierten Fasern unterbrochen wird (Campbell u. a., 1988). Das bedeutet, dass niederschwellige A β -Fasern, die normalerweise nicht schmerzhaft empfindungen weiterleiten, nach Nervenverletzungen beginnen, Schmerz zu generieren und zu leiten (Khan u. a., 2002; Witting u. a., 2006). Außerdem erhalten die oberflächlichsten Schichten des Hinterhorns nun Informationen von A β -Fasern (Okamoto u. a., 2001), obwohl

normalerweise nur C- und A δ -Fasern Anschluss an diese Schichten haben (Lu, Perl, 2005). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass nach einer Nervenschädigung eine phänotypische Veränderung stattfindet, die bewirkt, dass nun in den A β -Fasern Neuropeptide (z. B. Substanz P) exprimiert werden, die normalerweise nur in Schmerzfasern vorkommen (Noguchi u. a., 1994).

Verminderte Schmerzhemmung:

Die Schmerzleitung durch A β -Fasern wird durch verschiedene Mechanismen unterstützt. Dazu zählen zentrale Sensibilisierung (s.o.), das Aussprossen zentraler terminaler Endigungen und die verminderte Schmerzhemmung.

Die postsynaptische Überleitung wird von Interneuronen durch GABAerge (GABA: Gamma-Amino-Buttersäure) und glycinerge Hemmung moduliert. Werden diese Mechanismen pharmakologisch ausgeschaltet, entsteht taktile *Allodynie* (Thompson u. a., 1993) und der Einfluss von A β -Fasern auf die nozizeptiven Schichten des Hinterhorns steigt (Baba u. a., 2003; Miraucourt u. a., 2007; Moore u. a., 2002; Torsney, MacDermott, 2006).

Absteigende Bahnen aus dem anterioren *Gyrus cinguli*, der *Amygdala* und dem *Hypothalamus* werden über das *periaquäduktale* Grau und die rostroventrale *Medulla* an das Rückenmark weitergeleitet und modulieren dort die spinale Schmerzweiterleitung. Die entsprechenden inhibitorischen Transmitter sind Noradrenalin, 5-Hydroxytryptamin und endogene Opiode.

Dieses System verändert sich nach einer Nervenschädigung. Die noradrenerge Hemmung entfällt (Rahman u. a., 2008), sodass die Schmerzwahrnehmung durch den serotonergen Einfluss verstärkt wird (Bee, Dickenson, 2008; Vera-Portocarrero u. a., 2006).

Außerdem nimmt die Expressionsdichte von μ -Opioid-Rezeptoren ab, so dass die Neurone des Hinterhorns weniger sensibel für Opioid-Rezeptoragonisten sind (Kohno u. a., 2005).

Weiterhin tragen mehrere Ursachen dazu bei, dass die GABAergen Hemmmechanismen im Rückenmark nicht mehr funktionieren. In den Neuronen der nozizeptiven Schichten des Rückenmarks kommt es zu einer Verschiebung des transmembranären Chlorid-Gradienten, sodass eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren nun, statt zu einer

Hyperpolarisation, zu einer Depolarisation führt und somit zur Entstehung paradoxer Erregungen und spontaner Aktivität (Keller u. a., 2007). Diese Veränderungen werden auch durch den *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* aus Mikroglia durch eine Hemmung des Kalium-Chlorid-Transporters ausgelöst (Coull u. a., 2005).

Auch ein Verlust GABAerger Interneurone durch Zelltod (Moore u. a., 2002) könnte zum Fortbestehen von neuropathischem Schmerz beitragen, da durch Verhinderung der Apoptose die GABAergen inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSPs) wieder regeneriert und mechanische sowie *Kälteallodynie* und *Hyperalgesie* nach Nervenschädigung gemildert werden (Scholz u. a., 2005). Auf der anderen Seite wurde auch neuropathisches Schmerzverhalten ohne vorherigen Zelltod beobachtet (Polgár u. a., 2005).

Strukturelle Veränderungen:

Durch eine Schädigung des peripheren *Axons* werden vermehrt Gene exprimiert, die im Zusammenhang mit Wachstum und Regeneration stehen und so zu einem aktiven Wachstum der Neurone und Wiederherstellung der neuronalen Verbindungen führen (Costigan u. a., 2002; Griffin, 2006). Andererseits kann dieser Wachstumsreiz aber auch zu einem Aussprossen zentraler axonaler Endigungen im Rückenmark führen (Woolf u. a., 1992). Das führt dazu, dass dicke, myelinisierte A β -Fasern, die normalerweise in den *Laminae* III und IV des Hinterhorns enden, nun in die *Lamina* II einsprossen, wo normalerweise nur unmyelinisierte C-Fasern und dünne, myelinisierte A δ -Fasern, welche für die Schmerzleitung zuständig sind, enden (Kohama u. a., 2000; Soares u. a., 2002; Watanabe u. a., 2007; Woolf u. a., 1992).

Neurodegeneration und chronischer Schmerz:

Nach peripherer Nervenschädigung gehen das primäre sensible und das Hinterhorn-Neuron zugrunde, wahrscheinlich aufgrund ektopter Aktivität und glutamatvermittelter *Exzitotoxizität* (Scholz u. a., 2005). Dabei gehen wesentlich mehr dünne Neurone, einschließlich der Nozizeptoren, zugrunde, als dicke, myelinisierte Neurone (Okamoto u. a., 2001; Tandrup u. a., 2000).

Magnetresonanztomographie-Untersuchungen an Patienten mit neuropathischem Schmerz haben gezeigt, dass diese Neurodegeneration auch im Gehirn stattfinden kann, wobei die Menge der grauen Substanz abnimmt (May, 2008). Diese Ergebnisse stützen

die Vermutung, dass neuropathischer Schmerz gewisse Gemeinsamkeiten mit neurodegenerativen Erkrankungen haben könnte, was neuroprotektive Behandlungsstrategien erfordern würde.

Die Rolle des Immunsystems:

Im peripheren Nervensystem bilden Makrophagen und T-Lymphozyten die Immunabwehr. Sie kommunizieren über Zytokine und Chemokine (zelluläre Botenstoffe) mit Neuronen, Schwann-Zellen und Satelliten-Zellen der Spinalganglien.

Makrophagen leisten nach Schädigung eines Axons einen zentralen Beitrag zur sogenannten anterograden Degeneration. Weiterhin trägt die Aktivierung des Immunsystems im verletzten Nerv und im Spinalganglion zu einer gesteigerten Schmerzempfindlichkeit bei (Scholz, Woolf, 2007). Dabei wirken die freigesetzten Zytokine auch auf intakte Neurone.

Mikrogliazellen stellen die Makrophagen des zentralen Nervensystems dar. Diese werden nach einer peripheren Nervenverletzung unmittelbar aktiviert, um anschließend Immunmodulatoren freizusetzen, die zur Entstehung von neuropathischem Schmerz beitragen, indem sie die neuronale Funktion beeinflussen (Saab u. a., 2008; Suter u. a., 2007).

Daher könnte die Beeinflussung der Immunfunktion neue Therapieansätze in der Behandlung des neuropathischen Schmerzes bieten.

1.1.3 Zusammenfassung: Grundlagen neuropathischer Schmerz

Eine Nervenschädigung im zentralen oder peripheren Nervensystem verursacht maladaptive Reaktionen in nozizeptiven Fasern und Bahnen, welche spontane Aktivität und Sensibilisierung auslösen können. Das führt zu bleibenden Schäden, unabhängig von der auslösenden Ursache, und somit zu persistierenden Schmerzen.

1.2 MicroRNA

1.2.1 Grundlagen

Micro-Ribonukleinsäuren (MicroRNAs, miRNAs) sind kleine, nicht kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21 bis 25 Nukleotiden. Sie regulieren die Genexpression auf Ebene der Translation (Ambros, 2004; Bartel, 2004), indem sie an ihre Ziel-*mRNA* (*messenger RNA*) binden und somit die Translation unterdrücken oder zum Abbau der *mRNA* führen. Erstmals entdeckt wurden sie im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee u. a., 1993; Wightman u. a., 1993).

Eine Reihe von Studien belegen eine Schlüsselfunktion von miRNAs bei vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen, so z. B. in der Regulation von Stammzellen, Proliferation und Apoptose, Zell- und Organdifferenzierung und dem zeitlichen Ablauf verschiedener Entwicklungsschritte (Karp, Ambros, 2005; Kloosterman, Plasterk, 2006; Nakahara, Carthew, 2004; Wang u. a., 2007).

1.2.2 Biogenese der miRNAs

Die Biogenese der miRNAs (Abb. 1) umfasst die Transkription der miRNA-Gene im *Nukleus*, den Export ins Zytoplasma und die anschließende Prozessierung und Reifung (Singh u. a., 2008). In der Regel transkribiert die RNA-Polymerase II oder III die entsprechenden Gene und es entsteht die pri-miRNA, die sich zu einer Schleife zusammenlagert (Bartel, 2004; Borchert u. a., 2006). Anschließend wird im Zellkern die pre-miRNA generiert. Dazu dient ein Microprozessor-Komplex, der aus dem RNase-III-Enzym Drosha und *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (*DGCR8*), einer RNA-Bindungsdomäne, besteht (Allen u. a., 2004; Denli u. a., 2004). Die pre-miRNA ist 70-80 Nukleotide lang und lagert sich zu einer haarnadelförmigen Struktur mit einem 3'-Überhang von 2-3 Nukleotiden zusammen (Basyuk u. a., 2003; Lee u. a., 2003), um dann durch Exportin-5 in Anwesenheit von Ran-Guanosintriphosphat (GTP) als Cofaktor ins Zytoplasma exportiert zu werden (Bohnsack u. a., 2004; Lund u. a., 2004). Als nächstes wird die pre-miRNA durch einen Enzymkomplex aus *Dicer*, einer weiteren RNA-Polymerase III, und dem Doppelstrang-RNA (dsRNA)-bindenden Protein *TRBP* (*transactivation response RNA binding protein*) zu kleinen, doppelsträngigen miRNA-Molekülen gespalten (miRNA:miRNA*) (Grishok u. a.,

2001; Hutvagner u. a., 2001; Ketting u. a., 2001). Die Basen sind nur teilweise gepaart. Der miRNA-Strang mit der höheren Stabilität am 5'-Ende wird abgebaut (Khvorova u. a., 2003; Schwarz u. a., 2003). Die verbleibende, reife miRNA wird in einen Effektor-Komplex, den sogenannten *RNA-induced silencing complex (RISC)* eingebaut (Khvorova u. a., 2003; Schwarz u. a., 2003).

Biogenese der miRNAs

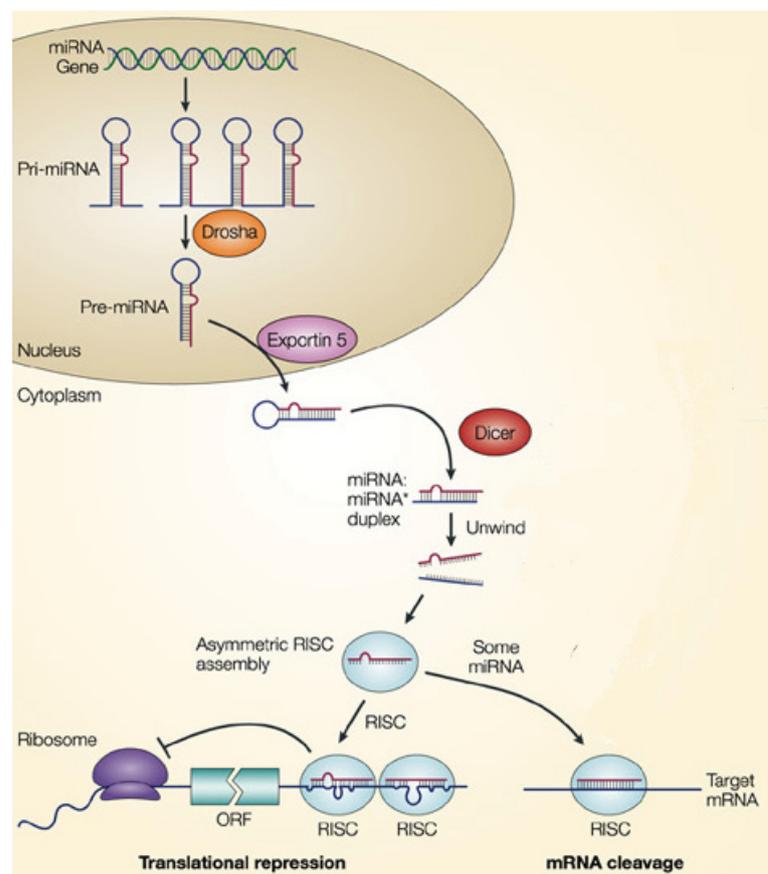


Abb. 1: Biogenese der miRNAs. Die Biogenese der miRNAs umfasst die Transkription der miRNA-Gene im Nucleus, den Export ins Zytoplasma und die anschließende Prozessierung und Reifung (modifiziert nach He, Hannon, 2004). *RISC*: *RNA-induced silencing complex*, *ORF*: *open reading frame*, *miRNA*: *microRNA*, *mRNA*: *messengerRNA*.

1.2.3 Regulation der Translation

Der *RISC* besteht neben der miRNA weiterhin aus Nukleasen und regulatorischen Proteinen. So stellt z. B. ein Mitglied der Argonaut-Proteinfamilie einen Kernbestandteil des Komplexes dar (He, Hannon, 2004). Er besitzt eine PAZ- und eine PIWI-Domäne (Cerutti u. a., 2000). Proteindomänen sind bestimmte Abschnitte eines

Proteins, die funktionell und strukturell unabhängig vom Rest des Proteins sind. Die PIWI-Domäne bindet an das 5'-Ende der miRNA und die PAZ-Domäne an den 3'-Überhang. Ein weiteres Protein ist RecA, das für die Erkennung komplementärer Bereiche zwischen miRNA und mRNA zuständig ist (Janning, Knust, 2008). Die miRNAs binden an die 3'-*untranslated region* (UTR) der Ziel-mRNAs, um die Translation zu beeinflussen. Besteht eine hohe Komplementarität, können die miRNAs direkt einen Argonaut-vermittelten Abbau der Ziel-mRNA vermitteln (Hutvágner, Zamore, 2002; Song u. a., 2004; Yekta u. a., 2004). Häufiger besteht jedoch eine zu geringe Übereinstimmung, so dass es zu einer Hemmung der Translation oder einer Destabilisierung der mRNA kommt (Lee u. a., 1993; Lim u. a., 2005; Wightman u. a., 1993). Die genauen Mechanismen sind bis jetzt nur teilweise erforscht (Jackson, Standart, 2007; Pillai u. a., 2007; Standart, Jackson, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die Basensequenz der miRNA nur teilweise mit der Ziel-mRNA übereinstimmen muss, um einen Effekt auf die Translation auszuüben, kann eine miRNA viele verschiedene mRNAs regulieren (Standart, Jackson, 2007).

1.2.4 Einfluss auf Entwicklung und Plastizität des Nervensystems

Die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression ist ein wichtiger Mechanismus im Rahmen der Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Untersuchungen der miRNA-Expression in verschiedenen Geweben haben gezeigt, dass im Gehirn und in Nervenzellen eine hohe Anzahl spezifischer miRNAs exprimiert werden (Lagos-Quintana u. a., 2002), von denen viele mit Polyribosomen assoziiert sind (Kim u. a., 2004; Nelson u. a., 2004). Dabei ist sowohl eine zeitliche als auch eine regionale Spezifität der miRNAs zu erkennen. Manche miRNAs werden nur im *Telencephalon* (Wienholds u. a., 2005) oder vorwiegend in Astrozyten (Smirnova u. a., 2005) exprimiert. Andererseits gibt es auch miRNAs, die in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert sind, jedoch nicht in differenzierten Neuronen. Einige miRNAs sind hoch konserviert und können sowohl bei Nematoden als auch bei Primaten nachgewiesen werden (Lagos-Quintana u. a., 2001). Das könnte darauf hinweisen, dass diese miRNAs (z. B. let-7) bei der generellen Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle spielen. Andere miRNAs werden nur im Gehirn von Primaten exprimiert (Berezikov u. a., 2006). Ihre Funktion ist noch nicht bekannt, sie könnten aber an der Entwicklung höherer kognitiver Fähigkeiten beteiligt sein.

MiRNAs sind notwendig für die Entwicklung des Nervensystems (Giraldez u. a., 2005). Eine Unterdrückung der miRNA-Biogenese durch *Knockout* des Gens *Dicer* führt bei Zebrafischen zu schweren Neuralrohrdefekten durch Störung der neuronalen Differenzierung. Weiterhin wurden bei diesen Fischen Veränderungen in der Axon-Struktur festgestellt, was bedeuten könnte, dass miRNAs für das zielgerichtete Wachstum von Axonen notwendig sind (Giraldez u. a., 2005). Bei Säugetieren führt ein *Dicer-Knockout* während der Schwangerschaft durch Apoptose zu einer Größenminderung des Vorderhirns (Makeyev u. a., 2007). Allerdings könnten auch andere Mechanismen zu dem entsprechenden Phänotyp führen, da bisher noch kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und spezifischen miRNAs gezeigt werden konnte.

Im reifen Nervensystem spielen miRNAs eine wichtige Rolle als Regulatoren der synaptischen Plastizität und anderer dynamischer Veränderungen (Fineberg u. a., 2009; Schratt, 2009) und stehen daher im Zusammenhang mit höheren kognitiven Funktionen wie Lernen und Gedächtnis (Bonhoeffer, Yuste, 2002). Dabei kann die synaptische Aktivität die Expression von miRNAs sowohl induzieren als auch inhibieren (Vo u. a., 2010). *mRNAs* werden in den Dendriten in der Nähe der synaptischen Membran gespeichert und nach synaptischer Stimulation lokal translatiert. Diese lokale Proteinsynthese bietet einen Erklärungsansatz für die Modifikation der Stärke und Effizienz der synaptischen Übertragung (Sutton, Schuman, 2006). Die zuerst beschriebene miRNA, für die ein Einfluss auf die lokale dendritische Proteinsynthese bei Säugetieren gezeigt werden konnte, ist die miR-134. Sie inhibiert die Translation einer *mRNA*, die für eine Proteinkinase (Limk1) kodiert und beeinflusst dadurch die Größe der dendritischen Dornfortsätze (Schratt u. a., 2006). Die Größe der Dornfortsätze korreliert gut mit der Stärke der synaptischen Übertragung. Dieser Prozess ist allerdings durch den Einfluss von *BDNF* reversibel, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht bekannt ist. Weiterhin ist bekannt, dass eine Vielzahl weiterer miRNAs in den Dendriten lokalisiert sind und somit eine Rolle in der synaptischen Plastizität spielen (Kye u. a., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass miRNAs (z. B. miR-130a, miR-206) auch die Synthese von Substanz P, einem Neurotransmitter, in Nervenzellen regulieren (Greco, Rameshwar, 2007). Das bedeutet, dass miRNAs einen Einfluss auf die Art und Menge der in Nervenzellen produzierten Neurotransmitter haben.

1.2.5 MiRNAs und neurologische Krankheiten

MiRNAs stehen im Zusammenhang mit einer großen Anzahl pathologischer Veränderungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und neurologischer Krankheiten wie *Morbus Alzheimer*, *Morbus Parkinson*, *Morbus Huntington* und Prionenerkrankungen (Nelson, Keller, 2007; Saugstad, 2010). Bei Mäusen, bei denen *Dicer* im Kleinhirn ausgeschaltet wurde, kommt es zu einer Neurodegeneration. Die Purkinje-Zellen degenerieren bei diesen Tieren und es entsteht eine *Ataxie* (Schaefer u. a., 2007). Weiterhin wurden bei Patienten mit Schizophrenie Veränderungen der miRNA-Expression festgestellt (Hansen u. a., 2007; Perkins u. a., 2007). Die klinische Relevanz der miRNAs wird dadurch verdeutlicht, dass miR-34a und miR-132 zum Absterben von Neuronen im Rahmen von epileptischen Anfällen beitragen, während eine Hemmung der miR-134 die Anfalls-induzierten Schäden und die Häufigkeit spontaner Krampanfälle reduziert (Jimenez-Mateos, Henshall, 2013).

1.2.6 MiRNAs im Zusammenhang mit Schmerz

Im Rahmen von Schmerzen unterschiedlichster Genese kommt es zu einer Veränderung der miRNA-Expression. Dabei können alle Schaltstellen der Schmerz Wahrnehmung und -verarbeitung betroffen sein, vom primären afferenten Nozizeptor bis zu den schmerzverarbeitenden Hirnarealen (Kress u. a., 2013).

Eine Studie (Zhao u. a., 2010) hat den Einfluss von miRNAs auf die peripheren schmerzleitenden Nervenbahnen untersucht. Dazu wurde das Enzym *Dicer* in schmerzempfindlichen Neuronen, die den spannungsgesteuerten Natrium-Kanal $Na_v 1.8$ exprimieren, ausgeschaltet. Die *Knockout*-Mäuse waren phänotypisch gesund und hatten normale Schmerzreizschwellen für akuten Schmerz. Auch die Reaktion auf neuropathischen Schmerz war unverändert. Allerdings zeigten sie bei Entzündungsschmerzen eine abgeschwächte Reaktion. Es konnte gezeigt werden, dass durch das Fehlen von *Dicer* die Expression vieler universeller *mRNAs* in den Spinalganglien hochreguliert wird, wohingegen die Nozizeptor-assoziierten *mRNAs* herunterreguliert werden. *Dicer* und seine Produkte, die miRNAs, haben also einen Einfluss auf die Schmerzempfindung, indem sie die *mRNA*-Expression und damit letztendlich die Proteinexpression in sensorischen Neuronen regulieren.

In einer weiteren Studie (Aldrich u. a., 2009) wurde die Expression von miRNAs in den Spinalganglien von Ratten untersucht, bei denen zuvor durch *Spinal Nerve Ligation* eine mechanische Hypersensibilität ausgelöst wurde. Es wurde eine signifikante Verminderung der Expression mehrerer miRNAs festgestellt, die normalerweise in den Spinalganglien gesunder, erwachsener Ratten in hoher Anzahl vorhanden sind. Zusätzlich zu Veränderungen im Expressionslevel zeigten sich auch Veränderungen im räumlichen Expressionsmuster. Die verbleibenden miRNAs waren nicht mehr gleichmäßig im Ganglion verteilt, sondern in der Peripherie angereichert. Somit könnten diese Veränderungen durch die post-transkriptionelle Regulation der Expression schmerzrelevanter Gene zur Entstehung von neuropathischem Schmerz beitragen.

Verletzungen peripherer Nerven resultieren in einer Proliferation der *Microglia* und dadurch in einer Entzündungsreaktion, welche zur Entstehung und Unterhaltung neuropathischer Schmerzen beiträgt. Es ist bisher wenig darüber bekannt, wie miRNAs diesen Prozess durch die Regulation der Autophagozytose beeinflussen. Shi et al. konnten zeigen, dass die miR-195 in *Microglia* von Ratten nach *Spinal Nerve Ligation* hochreguliert war und zu einer gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine sowie einer verstärkten Hypersensibilität führte. Dementsprechend führte eine Inhibition der miR-195 zu einer Abschwächung der Hypersensibilität und der Neuroinflammation (Shi u. a., 2013).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei verschiedenen Tumor-Erkrankungen zu einer Dysregulation der miRNAs in peripheren Neuronen kommen kann, was zu tumorinduziertem Schmerz und Hypersensibilität beitragen kann (Bali u. a., 2013). Es konnten drei miRNAs identifiziert werden (miR-1a-3p, miR-34c-5p und miR-370-3p), die verstärkend auf tumorbedingte Schmerzen wirken, und eine miRNA (miR-483-3p), welche diesem entgegenwirkt. Diese Erkenntnisse bieten interessante Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei metastasenbedingtem Knochenschmerz.

Wie bereits erwähnt, kann es auch im Rahmen von *Diabetes mellitus* zur Entstehung einer Neuropathie kommen. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen diabetischer Neuropathie bei Ratten zu einer gesteigerten Dichte von spannungsabhängigen Natriumkanälen in den Hinterstrangganglien kommt. Die subkutane Applikation eines Vektors, der eine gegen die α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Natriumkanäle

gerichtete miRNA exprimierte, führte zu einer Expressionsabnahme der α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Natriumkanäle und damit einhergehend zu einer Reduktion von *Allodynie* und *Hyperalgesie* (Chattopadhyay u. a., 2012).

Es ist bereits bekannt, dass miRNAs eine wichtige Rolle für die Funktion des Nervensystems im Allgemeinen sowie im Rahmen der Schmerzwahrnehmung im Speziellen spielen. Ihre Funktion bei der Entstehung und Erhaltung neuropathischer Schmerzen ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Studie wurde mittels *miChip-Array* zunächst ein globaler Ansatz gewählt, um das generelle Expressionsmuster von miRNAs im Rückenmark der Ratte nach Induktion neuropathischer Schmerzen zu analysieren. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden einzelne, im *Array* signifikant veränderte, miRNAs ausgewählt und näher charakterisiert. Zu den möglichen *Targets* (Zielproteine) dieser miRNAs gehören schmerzrelevante Zielproteine. Um putative *Targets* einer miRNA zu identifizieren, wurden Gendatenbanken wie z. B. *Targetscan* (www.targetscan.org) genutzt.

Die miR-1 unterdrückt die Translation der mRNA für *BDNF* (s.o.) durch Bindung an die 3'-*UTR* (Varendi u. a., 2014). Ebenso spielt die miR-1 eine Rolle in der Regulation des Expression von Connexin-43 (Cx43) (Klotz, 2012), einem Transmembranprotein, welches durch noch nicht genau bekannte Mechanismen die Entstehung von neuropathischem Schmerz fördert und dessen Expression im Rückenmark z. B. nach einem *chronic constriction injury* gesteigert ist. (Chen u. a., 2014).

Eine weitere interessante miRNA ist die miR-138. Sie hat als mögliche *Targets* Natrium- (*Sodium channel subunit beta-1, SCN1b*) und Kalium-Kanalproteine (*Potassium channel subfamily K member 3, KCNK3*). Wie bereits oben erwähnt, spielen Ionenkanäle eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Weiterleitung von Erregungspotentialen im Allgemeinen und auch bei der Entstehung ektooper Erregungen im Rahmen neuropathischer Schmerzen (s.o.). Auch die miRNA let-7f hat als mögliches *Target* einen spannungsabhängigen Natriumkanal, den SCN11a oder auch Na_v 1.9.

Die miR-133a wurde untersucht, da sie unter anderem den Glutamatrezeptor GRM5 als *Target* hat. Glutamat ist, wie bereits oben erwähnt, ein exzitatorischer Neurotransmitter und damit wichtig für die zelluläre Erregungsleitung.

1.2.7 MiRNA-Expression nach Induktion neuropathischer Schmerzen

Trotz des rasant ansteigenden Wissens um die Funktion und Bedeutung von miRNAs, bleibt der genaue pathophysiologische Mechanismus von neuropathischem Schmerz bisher weitgehend unbekannt. Es ist aber von großer Wichtigkeit, diesen Mechanismus genauer zu verstehen, um neue Behandlungsstrategien und ursächlich orientierte Therapieansätze zu entwickeln (Baron, 2010). Der Entstehung von neuropathischem Schmerz liegen mehrere verschiedene Mechanismen zugrunde, wobei Neuroplastizität eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Latremoliere, Woolf, 2009). Zahlreiche Untersuchungen zeigten eine signifikante Veränderung der Genexpression im Rückenmark als Reaktion auf die Verletzung eines peripheren Nervs. Es kommt zu Veränderungen von zahlreichen Genen, die für Ionenkanäle, Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle kodieren (Yang u. a., 2004).

Da circa 20-30% der Protein-kodierenden Gene durch miRNAs reguliert werden, liegt die Vermutung nahe, dass letztere auch im Rahmen der Entstehung von neuropathischem Schmerz eine Rolle spielen (Übersicht in Niederberger u. a., 2011).

Bai et al. konnten als Erste zeigen, dass miRNAs im ipsilateralen *Ganglion trigeminale* im Rahmen von entzündlichem Muskelschmerz herunterreguliert werden, und innerhalb von zwölf Tagen wieder ihr Ausgangslevel oder sogar höhere Expressionslevel erreichen (Bai u. a., 2007). Ebenso ist die Expression mehrerer miRNAs im ipsilateralen Hinterstrangganglion nach Unterbindung des Spinalnerven bei Ratten verändert (Aldrich u. a., 2009; von Schack u. a., 2011), was einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von miRNAs an der Entstehung von neuropathischem Schmerz darstellt. Auch Zhang et al. konnten in *Microarray*-Untersuchungen zeigen, dass eine komplette Durchtrennung des *N. ischiadicus* zur einer signifikanten Expressionsänderung von mehreren miRNAs im ipsilateralen Hinterstrangganglion führt (Zhang u. a., 2011).

Weitere Hinweise darauf, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression schmerzassoziierter Gene spielen, stammen aus einer Studie, bei der bei gesunden Mäusen das Gen für das Enzym *Dicer* ausgeschaltet wurde. *Dicer* ist wichtig für die Entstehung der reifen Form von miRNAs. Bei den Mäusen zeigten sich eine unveränderte Zahl sensibler Nervenfasern und normale Schmerzschwellen für akuten Schmerz. Allerdings konnten die Mäuse Entzündungsschmerz nur noch abgeschwächt oder nicht mehr wahrnehmen. Das deutet darauf hin, dass miRNAs an der Regulation

der Schmerzempfindung beteiligt sind und dieses eventuell einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte (Zhao u. a., 2010).

Die beschriebenen Studien beziehen sich allerdings auf das periphere Nervensystem, während zur Funktion von miRNAs bei der Schmerzverarbeitung im zentralen Nervensystem bisher wenig bekannt ist. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen von Entzündungsschmerz zu Expressionsänderungen spezifischer miRNAs im präfrontalen Kortex kommt (Poh u. a., 2011). Allerdings wurde bisher in diesem Zusammenhang das Rückenmark als wichtiger Teil des schmerzleitenden Systems noch nicht ausreichend untersucht.

Die Hypothese, dass miRNAs an der Plastizität des Rückenmarks beteiligt sind, wird durch Studien zu traumatischen Wirbelsäulenverletzungen (*spinal cord injury, SCI*) untermauert. Die Expression mehrerer miRNAs zeigte zeitabhängige Veränderungen nach Verletzung des Rückenmarks (Liu u. a., 2009; Nakanishi u. a., 2010). Dabei zeigte sich auch, dass es besonders bei Apoptose-assoziierten miRNAs im Rahmen von körperlicher Anstrengung nach einer *SCI* zu Expressionsveränderungen kommt. Daher könnten sie auch in die regenerativen Prozesse nach einem Rückenmarkstrauma involviert sein (Liu u. a., 2010). Es ist allerdings bisher unklar, ob die neuroplastischen Veränderungen nach einer *SCI* mit denen nach Schädigung eines peripheren Nervs und den daraus resultierenden neuropathischen Schmerzen vergleichbar sind.

Genda et al. untersuchten mit Hilfe des *TaqMan*[®] *Low Density Arrays* die Veränderungen von miRNAs im Hinterhorn des Rückenmarks bei Ratten, die ebenfalls nach dem *CCI*-Modell (*chronic constriction injury*) behandelt wurden. Die Veränderungen wurden 0, 7 und 14 Tage nach *CCI*- oder *Sham*-Operation untersucht. Es zeigten sich nach sieben bzw. 14 Tagen deutliche Veränderungen bei 111 miRNAs, darunter auch einige, die schon in anderen Untersuchungen mit der Entstehung neuropathischer Schmerzen in Verbindung gebracht wurden (Genda u. a., 2013).

In einer weiteren Studie von Li et al. (Li u. a., 2013) konnte gezeigt werden, dass nach Induktion neuropathischer Schmerzen durch bilaterales *CCI* die miR-341 im Hinterstrangganglion signifikant heraufreguliert war, nicht jedoch in anderen Bereichen des ZNS wie Hinterhorn des Rückenmarks, Hippocampus oder dem anterioren *Gyrus cinguli*. Auf der anderen Seite zeigte sich eine verminderte Expression von miR-203, -181a-1 und -541 im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten mit neuropathischen

Schmerzen. Eine aktuelle Veröffentlichung von Sakai et al. beschreibt, dass auch die Herunterregulation von miR-7a eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von neuropathischem Schmerz spielt, indem sie die neuronale Erregbarkeit reguliert. Daraus resultiert, dass eine Anreicherung dieser miRNA in den Hinterstrangganglien einen neuen Ansatzpunkt zur Therapie neuropathischer Schmerzen darstellen könnte (Sakai u. a., 2013).

In der vorliegenden Studie wurde das Ziel verfolgt, eine systematische Untersuchung der Expression spinaler miRNAs nach induziertem neuropathischen Schmerz durchzuführen. Dazu wurde zunächst das generelle Expressionsmuster spinaler miRNAs nach Induktion neuropathischer Schmerzen durch *CCI* mit Hilfe eines *miChip-Arrays* untersucht. Im Anschluss wurden einzelne, im *Array* signifikant veränderte, sowie einige weitere, potentiell schmerzrelevante, miRNAs mittels *Real-Time quantitativer PCR (qPCR)* untersucht. Eine große Stärke der vorliegenden Studie war hierbei, dass zu jedem vorgegebenen Untersuchungszeitpunkt jeweils die gleiche Anzahl von *CCI*-Tieren und den entsprechenden *Sham*-Tieren als Kontrollen analysiert wurden.

1.2.8 Zusammenfassung: Grundlagen miRNA

MiRNAs können in vielerlei Hinsicht die Entwicklung und Funktion des Nervensystems beeinflussen. So sind spezifische miRNAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt. Sie beeinflussen die Produktion von Neurotransmittern und spielen eine Schlüsselrolle im Rahmen der Entstehung, Verarbeitung und Wahrnehmung von Schmerzen unterschiedlicher Art, von der Wahrnehmung des Schmerzreizes am Nozizeptor bis zur Verarbeitung des Schmerzempfindens in den entsprechenden Hirnarealen.

Eine Reihe von Untersuchungen deutet darauf hin, dass miRNAs und die durch sie vermittelte Regulation der Expression schmerzrelevanter Zytokine und Mediatoren eine wichtige Rolle in Bezug auf neuropathische Schmerzen spielen. Ziel unserer Studie war es, Veränderungen der Expression spinaler miRNAs im Rahmen neuropathischer Schmerzen zu charakterisieren. Dies könnte als Grundlage dienen, neue, zielgerichtete Therapieansätze auf molekularer Ebene entwickeln zu können.

2 Fragestellung

Es ist bisher nicht bekannt, wie und in welchem Umfang miRNAs bei den pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Entwicklung und des Fortbestehens neuropathischer Schmerzen beteiligt sind. Das Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob es bei Ratten nach Induktion einer Neuropathie durch *CCI* im weiteren zeitlichen Verlauf zu einer veränderten Expression von miRNAs im Rückenmark kommt.

1. Welche miRNAs sind im Rückenmark von Ratten exprimiert?
2. Welche miRNAs sind zu den untersuchten Zeitpunkten (vier Stunden, einen Tag, sechs Tage und zwölf Tage) nach Induktion neuropathischer Schmerzen im *CCI*-Modell differentiell exprimiert, verglichen mit *Sham*-Tieren?
3. Lassen sich die im *miChip-Array* nachgewiesenen Expressionsunterschiede ausgewählter miRNAs sowie weiterer schmerzrelevanter miRNAs auch mittels spezifischer *PCR-Assays* nachweisen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde zunächst ein *miChip-Array* zur Untersuchung des Expressionsmusters spinaler miRNAs durchgeführt. Anschließend wurden spezifische, im *Array* hoch-exprimierte und signifikant veränderte miRNAs, sowie weitere schmerzrelevante miRNAs ausgewählt und deren Expression im Rückenmarksgewebe einzelner Tiere mittels spezifischer *PCR-Assays* weitergehend untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

allg. Verbrauchsmaterialien und Geräte:

Minizentrifuge <i>Galaxy</i>	VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich
Vortex-Genie 1 <i>Touch Mixer</i>	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Pipetten Eppendorf <i>Research</i> ®	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen <i>TipOne</i> , mit/ohne Filter, verschiedene Größen	STARLAB GmbH, Ahrensburg
<i>PCR Soft Tubes</i> 0,2 ml farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
<i>Safe Lock Tubes</i> 2ml farblos	Eppendorf, Hamburg
<i>SafeSeal</i> Gefäß 1,5 ml farblos	Sarstedt, Nürnbrecht

RNA-Isolierung:

Flüssigstickstoff	Linde AG, Pullach
Dispergierstation T 8.10	IKA Labortechnik, Staufen
TRIzol® <i>Reagent</i>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Chloroform	VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Isopropylalkohol	Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Düsseldorf
Ethanol ($\geq 99,5\%$), unvergällt	Carl Roth, Karlsruhe
<i>NanoDrop</i> ND 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese:

Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
---------	----------------------

Agarosegelkammer	LTF Labortechnik, Wasserburg
10x FA Gel Puffer 3-MOPS Pufferan [®] ≥99,5% Natriumacetat EDTA Na-Salz	Carl Roth, Karlsruhe Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Formaldehyd 37%ig	Merck, Darmstadt
Promega <i>Loading Buffer</i>	Promega, Madison, WI, USA
Feinwaage LA 230S	Sartorius, Göttingen

Reverse Transkription:

TaqMan [®] MicroRNA <i>Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan 5x RT-Primer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA (s.u.)
<i>Thermocycler C 1000</i> TM	Bio-Rad, München

Real-Time PCR:

TaqMan MicroRNA <i>Assay 20x</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan 2x Universal <i>PCR MasterMix</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>7300 RealTimePCR Cycler</i>	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<i>96 Well Multiply</i> [®] <i>PCR-Plate</i>	Sarstedt, Nürnbrecht

verwendete Assays zum Nachweis der reifen miRNAs

TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> U6 snRNA (#001973)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> rno-miR-1 (#002064)	=
TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> hsa-let-7f (#000382)	=
TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> hsa-miR-10a (#000387)	=
TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> hsa-miR-30b (#000602)	=
TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> hsa-miR-99a (#000435)	=

TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-100 (#000437) =
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-133a (#002246) =
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-138 (#002284) =
TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-720 (#002895) =

3.2 Verwendete Software

Die Auswertung der Ergebnisse der Verhaltenstests an den Versuchstieren erfolgte durch t-Tests mit Hilfe der Software *Excel* von Microsoft.

Zur Auswertung der Ergebnisse des *miChip-Arrays* wurde die Software *Multi Experiment Viewer* von tm4 (www.tm4.org) (Saeed u. a., 2003) verwendet.

Die Auswertung der *Real-Time qPCR*-Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2007 und der Software *Relative Expression Software Tool (REST)* von Qiagen (Pfaffl u. a., 2002).

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit der Software *GraphPad Prism* (Version 5.03, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) durchgeführt.

3.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

Sämtliche Versuche des tierexperimentellen Teils wurden von zwei Tierärztinnen aus unserer Arbeitsgruppe (Dr. med. vet. Franziska Barthel und Andrea Urban) durchgeführt.

Die von uns untersuchten Proben stammen von Ratten, die nach dem *chronic constriction injury (CCI)* Modell behandelt wurden, bei dem der *N. ischiadicus* locker mit Fäden umschlungen wird (Abb. 2), was durch eine resultierende Schwellung und Ödematisierung zur Entstehung von *Allodynie* und *Hyperalgesie* führt.

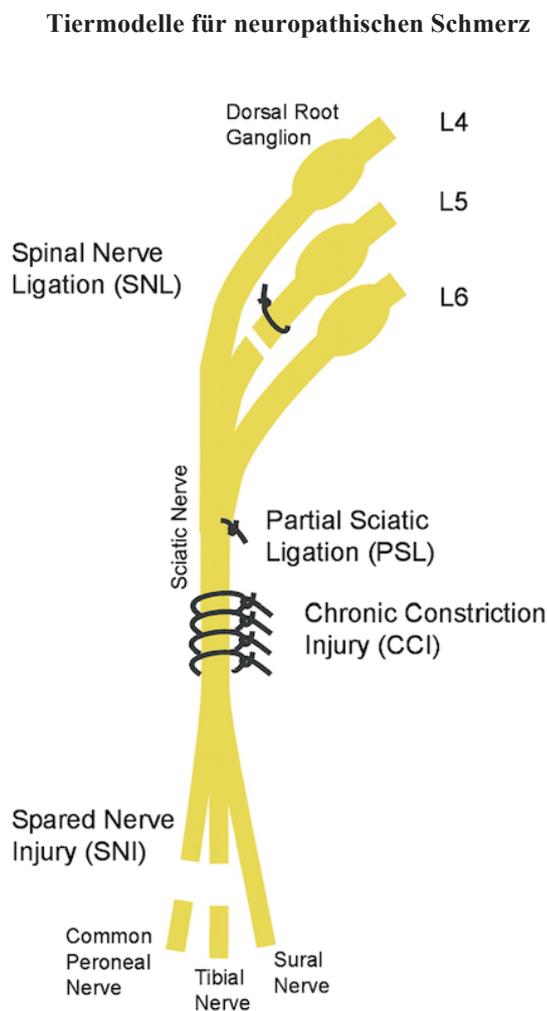


Abb. 2: Tiermodelle für neuropathischen Schmerz (Campbell, Meyer, 2006). Die Abbildung zeigt verschiedene mögliche Ligationsstellen des *Nervus ischiadicus* zur Erzeugung neuropathischer Schmerzen.

Nach Zustimmung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Recklinghausen (AZ8.87-51.04.20.09.343) wurden 48 männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 290 und 310 Gramm durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital in einer Dosierung von 60 mg/kg Körpergewicht anästhesiert. Die Tiere wurden in 2 Gruppen randomisiert. Bei den Tieren der Gruppe 1 wurde der linke *N. ischiadicus* ligiert, um ein *chronic constriction injury (CCI)* (Bennett, Xie, 1988) als Modell für neuropathischen Schmerz zu erzeugen. Bei den Tieren der Gruppe 2 wurde der Nerv freipräpariert, jedoch nicht ligiert (*Sham*). Es wurden vier verschiedene Zeitpunkte nach *CCI*- bzw. *Sham*-OP untersucht: Vier Stunden (4 h), ein Tag (1 d), sechs Tage (6 d) und zwölf Tage (12 d) (Anzahl der Proben pro Gruppe (n) =6) (Abb. 3).

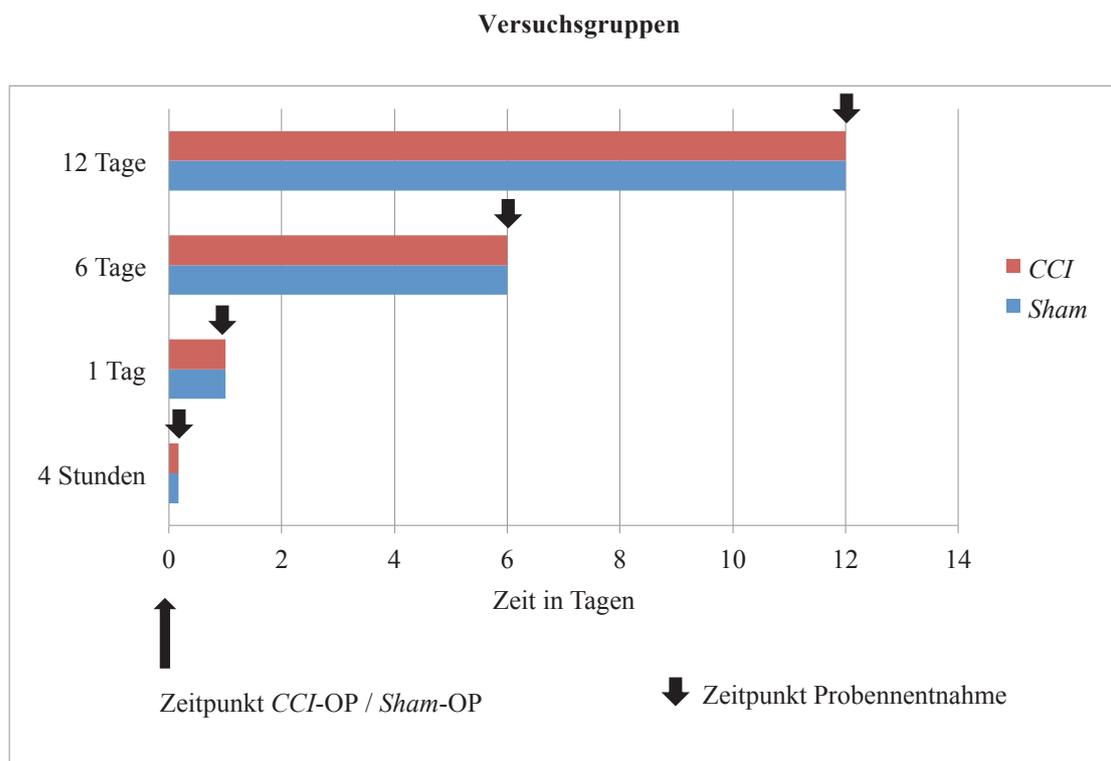


Abb. 3: Versuchsgruppen. Die Abbildung zeigt die verschiedenen Zeitpunkte der Entnahme des Rückenmarks der Segmente L4-L6 nach Operation in den *Sham*- und *CCI*-Gruppen. *CCI*: *chronic constriction injury*.

Die Entstehung einer mechanischen *Allodynie* als Parameter für die Entwicklung einer Neuropathie wurde vor der OP und jeweils vor der Gewebeentnahme untersucht.

Dazu wurde der Pfotenrückzugs-Schwellenwert (*Paw Withdrawal Threshold = PWT*) mit Hilfe des Dynamic Plantar Aesthesiometer® (Ugo Basile, Cat.No. 37400) gemessen. Diese Methode beruht auf den von Frey-Filamenten (von Frey, 1897), die in ähnlicher Art auch in der Klinik zur Diagnose einer *Allodynie* beim Menschen eingesetzt werden (Boivie u. a., 1994). Hierbei wird durch ein stumpfes Metallfilament, welches mit zunehmendem Druck gegen die Plantarfläche der Rattenpfote drückt, ein mechanischer Reiz ausgeübt. Zieht die Ratte ihre Pfote weg, ist der *PWT* erreicht. Dieser wird in Gramm angegeben. Ein signifikant niedriger *PWT* bei den *CCI*-Tieren, im Vergleich mit den *Sham*-Tieren, gilt als Nachweis einer Neuropathie. Man spricht von einem pronozizeptiven Effekt im Rahmen der Entstehung einer mechanischen *Allodynie*.

Zur Probenentnahme wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital (120 mg/kg Körpergewicht) euthanasiert. Anschließend wurde das Rückenmark aus den Segmenten L4-L6 entnommen, sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur RNA-Isolierung bei -80° C aufbewahrt.

3.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte aus den bei -80° C gelagerten Proben mit Trizol® nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski, Sacchi, 1987). Trizol® ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Dazu wurde das Gewebe in 1 ml Trizol homogenisiert und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform und der folgenden Zentrifugation bei 13.000 g für 15-20 Minuten bei 4 °C wurde die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Anschließend erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropylalkohol und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 12.000 g für 30 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml 75%igem Ethanol. Dazu wurde das Pellet mit Ethanol versetzt, gevortext und bei 7.500 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Am Ende wurde der Überstand abpipettiert, die RNA bei Raumtemperatur in offenen Reaktionsgefäßen unter dem Abzug getrocknet und schließlich in 70 °C heißem

ribonukleasefreiem (RNase-freiem) Wasser aufgelöst. Die so gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.5 Bestimmung der RNA-Konzentration und -reinheit

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des *Nanodrop* 1000 Spektrophotometers von Thermo Scientific bestimmt. Dabei wird die optische Dichte von 1 µl Probe bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm liefert einen Anhaltspunkt für die Reinheit der RNA. Es wird ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 angestrebt.

3.6 RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese können die RNA-Fragmente in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen wandert die RNA in Richtung Anode. Die kleineren RNA-Fragmente wandern dabei schneller und damit weiter als die größeren. Bei intakter RNA sind zwei deutlich getrennte Banden zu erkennen, die der 28-S- und der 18-S-Bande der ribosomalen RNA entsprechen. Das Verhältnis der Stärke der beiden Banden sollte ungefähr 1:2 betragen.

Um festzustellen, ob die RNA intakt ist, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden Agarose, 10x FA Gel-Puffer und DEPC-Wasser (1 ml Diethylpyrocarbonat in 1000 ml destilliertem Wasser) aufgekocht, mit Ethidiumbromid (5 mg/ml) und 37%igem Formaldehyd versetzt und in die Gelkammer gegossen. Die Zusammensetzung des Gels und des Puffers sind im Folgenden aufgeführt.

Gel-Herstellung

Agarose	1,2 g
10x FA Gel Puffer	10 ml
DEPC-Wasser	90 ml
Ethidiumbromid (5mg/ml)	2 µl
Formaldehyd 37%	1,8 ml

10x FA-Gel Puffer

200 mM 3-MOPS	41,85 g
50 mM Natriumacetat	4,102 g
10 mM EDTA	2,920 g
DEPC-Wasser	1000 ml

Je 2,5 µg RNA wurden zu 15 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser verdünnt, mit 3 µl *Loading Buffer* (1 ml Promega Loading Buffer + 72 ml Formaldehyd 37%ig) versetzt und für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt.

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x FA *Running Buffer* (Zusammensetzung siehe unten) gefüllt, die Proben in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese bei 100 V (Volt) für eine Stunde durchgeführt.

1x FA Gel *Running Buffer*

10x FA Gel-Puffer	100 ml
Formaldehyd 37%	20 ml
DEPC-Wasser	880 ml

Anhand der Aufspaltung der Proben in eine 28-S- und eine 18-S-Bande wurde die Intaktheit der isolierten RNA nachgewiesen.

3.7 *miRNA-Array (miChip)*

Der *miChip-Array* (Castoldi u. a., 2006) stellt eine effiziente Methode dar, die Expression vieler verschiedener miRNAs in vielen Proben gleichzeitig zu untersuchen. Dabei ist es wichtig, dass der *Array* zwischen den verschiedenen miRNAs einer Familie differenzieren kann, die sich oft nur in einem einzigen Nukleotid unterscheiden. Die hier eingesetzte Technik beruht auf der Methode der *locked nucleic acid (LNA)*-modifizierten Oligonukleotide. Hierbei handelt es sich um synthetische RNA/DNA-Analoga, welche, wenn sie in Oligonukleotide eingebracht werden, die Thermostabilität dieser erhöhen (Braasch, Corey, 2001). Dadurch ist es möglich, einheitliche Hybridisierungsbedingungen für alle miRNAs zugrunde zu legen, wodurch die Hybridisierungsspezifität erhöht wird.

Ein solcher *Array* (Castoldi u. a., 2008) stellt eine beschichtete Glasplatte dar, auf die punktförmig (*Spots*) *Capture Probes* (LNA-modifizierte Oligonukleotide) aufgedruckt werden.

Nach der RNA-Isolierung wird die in der RNA enthaltene miRNA markiert, indem spezielle, farbstoffenthaltende RNA-*Linker*-Moleküle mit Hilfe der T4 RNA Ligase an die einzelsträngigen RNA-Moleküle gebunden werden.

Die so markierte miRNA wird auf die Glas-Objektträger pipettiert und die Hybridisierung wird durchgeführt. Anschließend werden die Platten gewaschen, getrocknet und abschließend gescannt. Die Signalstärke korreliert dabei mit der miRNA-Konzentration in der Probe. Als *housekeeper* dient hier U6. Die Ergebnisse werden auf die 50. Perzentile der Positivkontrolle (*housekeeper*) normalisiert.

Für die Durchführung des *Arrays* wurden die Proben *gepoolt*, indem je 3,5 µg RNA aus dem Rückenmarkgewebe von je zwei Tieren einer Gruppe zusammengemischt wurden. Bei sechs Versuchstieren in einer Gruppe ergaben sich so je drei gepoolte Proben pro Zeitpunkt und *CCI*- bzw. *Sham*-Gruppe. Die Messungen wurden vom *European Molecular Biology Laboratory* in Heidelberg unter der Leitung von Herrn Mirco Castoldi, PhD, durchgeführt.

Nach Auslesen der Array-Platten mit dem *Genepix 4200AL laser scanner* (Molecular Devices, USA) speichert die *Genepix-Software* die Signaldaten als „GPR“-Dateien (*genepix results*). Anschließend werden die Daten mithilfe der *miCHIP R-library* auf der Plattform *Bioconductor* (www.bioconductor.org) normalisiert.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des *Multi Experiment Viewer* (www.tm4.org). Die Ergebnisse wurden gefiltert und Signale mit einer zu geringen Intensität (*cut off* 0,5, d.h. < 50% der mittleren Signalintensität) aussortiert. Dann wurde ein hierarchisches *Clustering* mit *Pearson Correlation* durchgeführt, um etwas über die Abhängigkeit der einzelnen Proben voneinander zu erfahren. Zum Schluss wurde noch ein *SAM* (*serial analysis of microarray*) durchgeführt, um diejenigen miRNAs zu identifizieren, die in der *Sham*- und *CCI*-Gruppe unterschiedlich reguliert waren.

3.8 Reverse Transkription zur Synthese spezifischer cDNA

Die Reverse Transkription dient dazu, RNA in cDNA umzuschreiben. Hier werden spezifische Primer verwendet, um spezifische cDNA zu generieren. Dazu wird die RNA mit einer Mischung verschiedener Reagenzien und spezifischen *Primern* versetzt und anschließend im *Thermocycler* nach Herstellerangaben wie folgt behandelt:

Reaktionsansatz:

7 μ l RT *Master Mix* + 5 μ l RNA (2 ng/ μ l \rightarrow 10 ng/Reaktionsansatz) + 3 μ l 5x RT-*Primer*

RT *Master Mix*

Nucleasefreies Wasser	4,16 μ l
RNase Inhibitor 20 U/ μ l	0,19 μ l
10x RT <i>Buffer</i>	1,50 μ l
<i>Multiscribe RT Enzyme</i>	1,00 μ l
dNTP Mix (100mM total)	0,15 μ l

Reaktionsablauf

16 °C	30 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
12 °C	∞

Die entstandene cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.9 *Quantitative Real-Time PCR* zum Nachweis von miRNA

Beim TaqMan®-Prinzip (Livak u. a., 1995) wird ein Oligonukleotid als Sonde eingesetzt, an dessen Enden sich zwei Fluorochrome, *Reporter* und *Quencher*, befinden (Abb. 4). Nach der Denaturierung bindet diese Sonde an einen DNA-Einzelstrang. Durch den Abbau dieses Oligonukleotids im Rahmen der Synthese des Komplementärstranges entfernen sich *Reporter* und *Quencher* voneinander und die Signalstärke steigt mit der Menge an synthetisierter DNA. Zu Beginn der Reaktion

findet eine exponentielle Vervielfältigung der DNA-Fragmente statt. Nach einer Phase des linearen Wachstums kommt die Reaktion schließlich ganz zum Stillstand. Die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt, wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Durch Amplifizierung von verschiedenen bekannten *Templatemengen* und Vergleich der resultierenden C_T -Werte lässt sich eine Standardkurve erstellen, so dass von einem C_T -Wert auf die *Templatemenge* geschlossen werden kann.

Für die Durchführung der *Real-Time PCR* wurde zuerst ein Reaktionsmix aus folgenden Komponenten hergestellt:

TaqMan® microRNA <i>Assay</i> 20x	1 µl
TaqMan® 2x Universal <i>PCR Master Mix</i>	10 µl
Nucleasefreies Wasser	8 µl

Je 19 µl von diesem Mix wurden in die einzelnen *Wells* einer 96-*Well*-Platte pipettiert. Dazu wurden je 1 µl cDNA gegeben. Dabei wurden die Proben jeweils doppelt in zwei nebeneinander liegende *Wells* pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer speziellen Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und im 7300 *Real Time PCR Cycler* gemessen.

Reaktionsablauf

Initialisierung	50 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	10 min
Vervielfältigung (40 Zyklen)	95 °C	15 sec
	60 °C	1 min



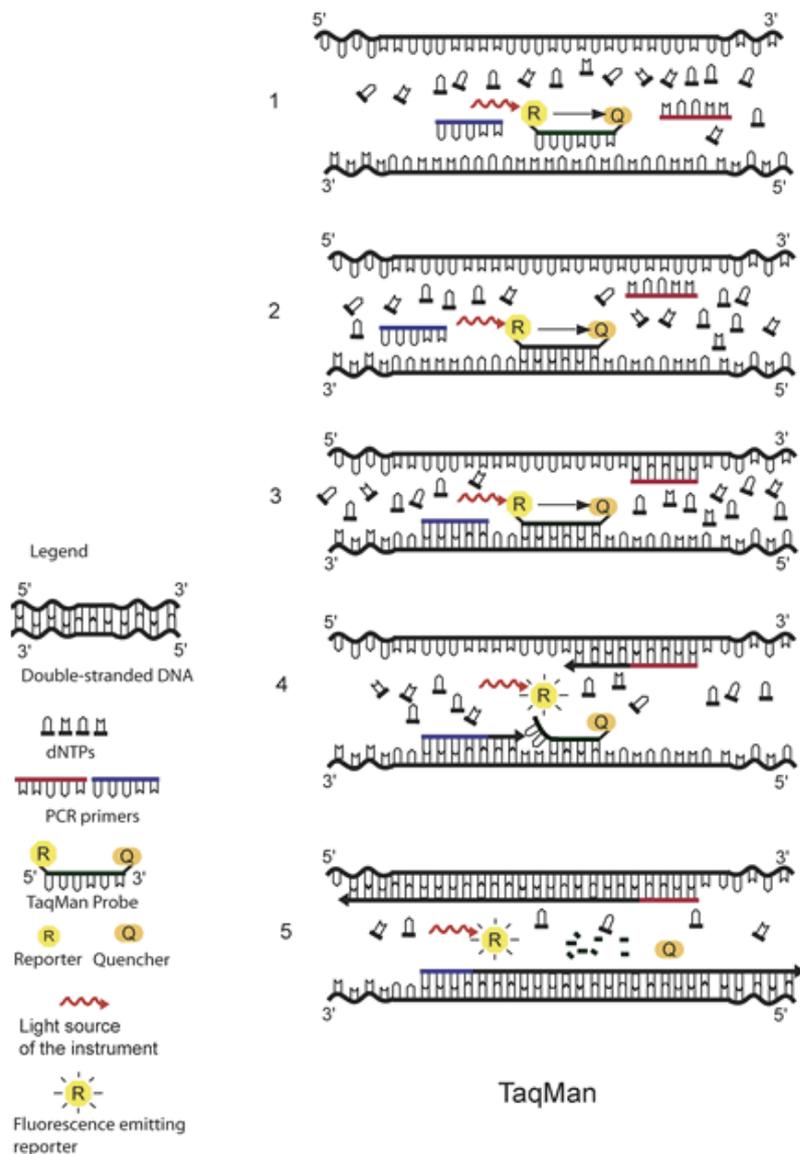
TaqMan® *Real-Time PCR*-Prinzip

Abb. 4: TaqMan® *Real-Time PCR*-Prinzip (nach da Silva, Pieniasek, 2003). Zwei Fluorochrome (*Reporter* (*R*) und *Quencher* (*Q*)) befinden sich an den gegenüberliegenden Enden eines Oligonukleotids (*TaqMan Probe*) (Schritt 1), welches nach der Denaturierung an einen DNA-Einzelstrang bindet (Schritt 2). Solange sich *Reporter* und *Quencher* noch in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird vom *Reporter* nach Anregung durch die Lichtquelle noch kein Fluoreszenzsignal emittiert. Nach Bindung der *Primer* an den jeweiligen Komplementärstrang (Schritt 3) folgt die Synthese der Komplementärstränge und damit der schrittweise Abbau der *TaqMan-Sonde* (Schritt 4). Dadurch entfernen sich *Reporter* und *Quencher* voneinander und das *Reporter-Fluorochrom* sendet nach Anregung durch die Lichtquelle ein Fluoreszenzsignal aus (Schritt 5). *PCR*: polymerase chain reaction. *DNA*: Desoxyribonukleinsäure. *dNTPs*: Desoxyribonukleosidtriphosphate.

Um Expressionsunterschiede für die jeweiligen miRNAs zwischen den *Sham*- und den *CCI*-Tieren zu quantifizieren, wurde die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Dazu wird eine *Real-Time PCR* für die zu untersuchende miRNA

und einen *housekeeper* (U6) durchgeführt. Aus den C_T -Werten der Proben der *Sham*- und *CCI*-Tiere wird zu einem bestimmten Zeitpunkt je für Ziel-miRNA und Kontrollgen die Mittelwerte gebildet. Anschließend werden die ΔC_T -Werte (Mittelwert Zielgen – Mittelwert Kontrollgen) für *Sham*- und *CCI*-Tiere berechnet und abschließend der $\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet (ΔC_T der *CCI*-Tiere - ΔC_T der *Sham*-Tiere). Dieser wird in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Das Ergebnis stellt den Expressionsunterschied, den sogenannten *Fold Change* (*fc*), dar, der aussagt, wie viel stärker oder schwächer die entsprechende Ziel-miRNA in den *CCI*- Tieren im Vergleich zu den *Sham*-Tieren exprimiert ist (Pfaffl, M. W., 2004).

4 Ergebnisse

4.1 Testung der Pfotenrückzuglatenz

Die Ergebnisse der Testung der Pfoten-Rückzuglatenz sind in Abb. 5 dargestellt. An der nicht behandelten rechten Pfote (intraindividuelle Kontrolle) bestand zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein Unterschied des *PWT* zwischen *Sham* und *CCI*. An der linken Pfote, an der der *N. ischiadicus* entsprechend des *CCI*-Modells ligiert wurde, zeigte sich nach sechs und zwölf Tagen eine signifikante Reduktion des *PWT* in der *CCI*-Gruppe, als Hinweis auf die Entstehung einer Neuropathie.

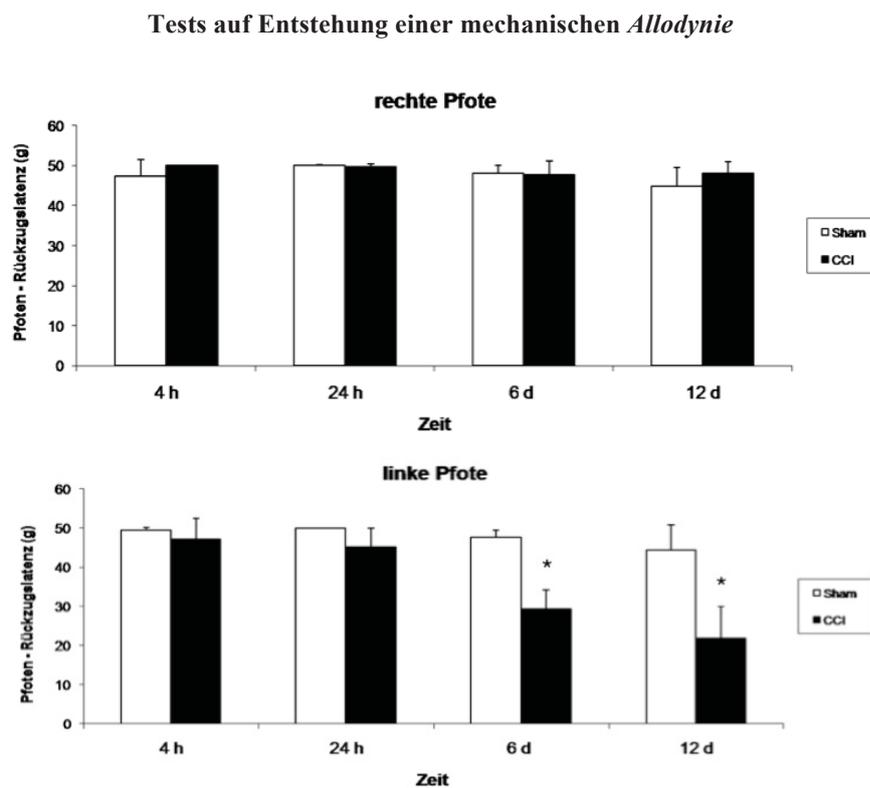


Abb. 5: Ergebnisse der Tests auf Entstehung einer mechanischen *Allodynie*, getrennt nach unbehauelter rechter (oben) und behandelter linker (unten) Pfote. Dargestellt ist der Pfotenrückzugsschwellenwert (*PWT*, in Gramm (g)) als Antwort auf eine mechanische Reizung der plantaren Pfotenfläche. Sechs und zwölf Tage nach Induktion einer *CCI* war an der linken, verletzten Pfote eine signifikante Reduktion des *PWT* in der *CCI*-Gruppe nachweisbar, was auf die Entstehung einer mechanischen *Allodynie* hinweist. Dargestellt ist jeweils nach t-Test der Mittelwert + Standardabweichung, $n = 6$ pro Gruppe, * $p < 0,05$ vs. *Sham* (Brandenburger et al. 2012). *CCI*: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

4.2 Nanodrop-Messung

Der Quotient der bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessenen Absorptionen der RNA-Präparationen lag bei der für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzten RNA zwischen 1,9 und 2,1. Dies entspricht einem hohen Reinheitsgrad.

4.3 RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese

Bei allen Proben konnten mit Gelelektrophorese sowohl die 28-S- als auch die 18-S-Bande deutlich dargestellt werden, was bedeutet, dass die gewonnene RNA nicht degradiert war. Die folgende Abbildung (Abb. 6) zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Elektrophorese. Die RNA-Proben stammten aus Rückenmarksgewebe von Tieren zwölf Tage nach *Sham*- oder *CCI*-Operation.

RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese, 12 d-Gruppe

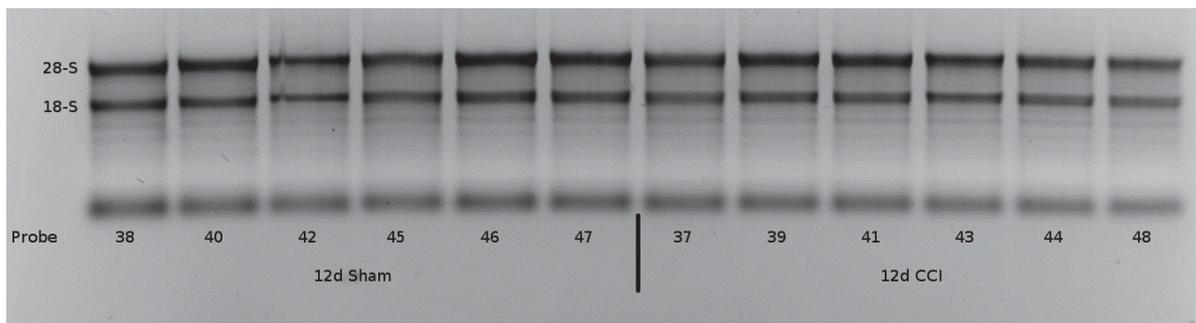


Abb. 6: RNA-Intaktheits-Gelelektrophorese von RNA-Proben, die aus Rückenmarksgewebe der 12 d-Gruppe gewonnen wurden. Dargestellt ist die Auftrennung der aufgetragenen Proben der *Sham*- und *CCI*-Gruppe (je n = 6) in einem 1,2%igen Agarosegel. Anhand der deutlich erkennbaren Auftrennung in eine 18-S- und eine 28-S-Bande ist erkennbar, dass die verwendete RNA intakt war. *CCI*: *chronic constriction injury*, n: Anzahl der Proben.

4.4 miRNA-Array

Aus den Ergebnissen des *miChip-Arrays* wurde von Herrn Dr. Castoldi statistisch anhand der relativen Signalintensitäten eine *Heatmap* mit den 30 am höchsten exprimierten miRNAs im Rückenmark der Ratte erstellt (Abb. 7). Auf der Farbskala am oberen Rand der Abbildung ist der Zusammenhang von Signalintensität im *miChip-Array* und Expressionslevel dargestellt. Rot bedeutet hohe Expressionslevel, wohingegen grün auf niedrigere Expressionslevel hinweist. Die miR-494 war die am höchsten

exprimierte miRNA mit einer Signalintensität von 300 in allen analysierten Proben. Die Zahlen 1 - 23 am unteren Rand der Abbildung bezeichnen die verschiedenen gepoolten Proben: 1-3 = *Sham* 4 h, 4-6 = *CCI* 4 h, 7-9 = *Sham* 1 d, 10-12 = *CCI* 1 d, 13-15 = *Sham* 6 d, 16-18 = *CCI* 6 d, 19-21 = *Sham* 12 d, 22-23 = *CCI* 12 d. Aufgrund eines technischen Fehlers wurden aus der letzten Gruppe nur zwei gepoolte Proben (22 und 23) untersucht. Insgesamt wurden 590 miRNAs der Maus und 349 der Ratte untersucht.

Ergebnisse des *miChip*-Arrays

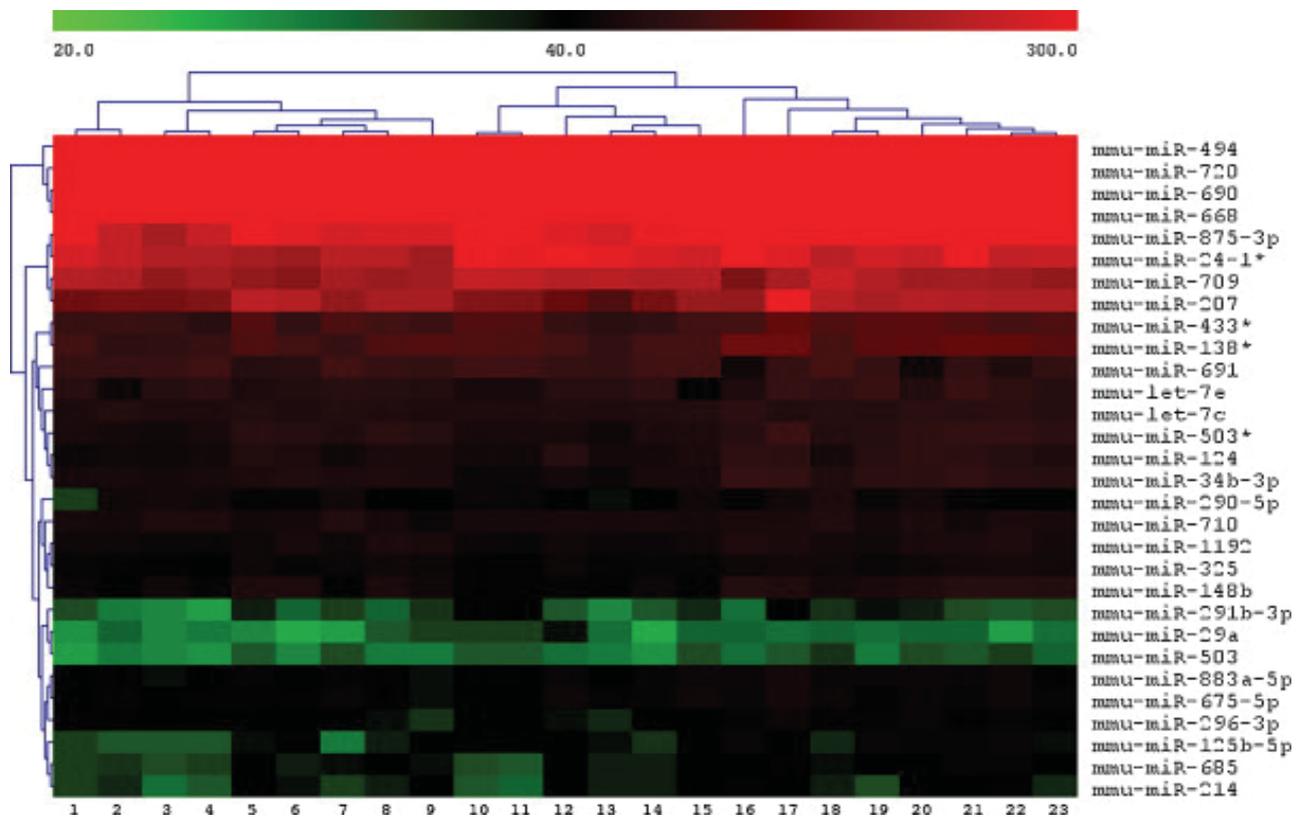


Abb. 7: Heatmap der 30 am höchsten exprimierten microRNAs (miRNAs) im *miChip*-Array. Die Farbskala am oberen Bildrand zeigt den Zusammenhang von Signalintensität im *miChip*-Array und Expressionlevel. Rot bedeutet hohe Expression, wohingegen grün auf eine niedrigere Expression hinweist. Die Zahlen am unteren Rand der Abbildung stehen für die verschiedenen gepoolten Proben (1-3 = *Sham* 4 h, 4-6 = *CCI* 4 h, 7-9 = *Sham* 1 d, 10-12 = *CCI* 1 d, 13-15 = *Sham* 6 d, 16-18 = *CCI* 6 d, 19-21 = *Sham* 12 d, 22-23 = *CCI* 12 d). *CCI*: chronic constriction injury.

Die Untersuchung gepoolter Proben mithilfe des *miChip-Arrays* ergab signifikant veränderte Expressionslevel ($p < 0,05$) bei 27 miRNAs vier Stunden, sieben miRNAs einen Tag, einer miRNA sechs Tage und drei miRNAs zwölf Tage nach *CCI-OP* im Vergleich mit *Sham*. Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse des *miChip-Arrays* dar (Tabelle 1). Es zeigte sich, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt unterschiedliche miRNAs differentiell reguliert waren, die meisten vier Stunden nach Induktion des neuropathischen Schmerzes durch *CCI*.

Tabelle 1: Ergebnisse *miChip-Array*

Name	<i>Sham</i> MW	<i>CCI</i> MW	rel. Expression	P-Wert
4 h				
miR-30b	17,93	15,65	0,87	0,0086
miR-100	14,34	11,18	0,78	0,0055
miR-24	14,21	13,69	0,96	0,0014
miR-10a	13,01	10,47	0,81	0,0027
miR-99a	7,75	6,48	0,84	0,0032
miR-582-3p	5,30	4,18	0,79	0,0063
miR-191	3,07	2,61	0,85	0,0073
miR-149	2,97	2,39	0,80	0,0013
miR-326	2,27	1,96	0,86	0,0076
miR-374	1,65	1,51	0,91	0,0030
let-7a/let-7c-2	1,62	1,41	0,87	0,0033
miR-151-5p	1,38	1,13	0,82	0,0087
miR-652	1,38	1,19	0,87	0,0032
miR-30e	1,15	0,98	0,85	0,0043
miR-324-5p	1,13	0,95	0,84	0,0037
miR-92a	0,97	0,90	0,92	0,0089
miR-320	0,64	0,56	0,86	0,0042
miR-541	0,57	0,46	0,81	0,0033
miR-139-5p	0,54	0,47	0,86	0,0084
miR-20b	0,40	0,44	1,09	0,0015
miR-489	0,32	0,27	0,85	0,0057
miR-879	0,31	0,26	0,85	0,0023
miR-666-3p	0,28	0,23	0,79	0,0020
miR-448	0,19	0,15	0,78	0,0028
miR-378	0,19	0,13	0,69	0,0080
miR-15b	0,16	0,20	1,27	0,0050
miR-1188	0,13	0,11	0,85	0,0053

1 d				
miR-720	599,00	482,98	0,81	0,0050
miR-330	4,01	3,72	0,93	0,0014
miR-291a-5p	0,66	0,74	1,11	0,0016
miR-455	0,41	0,35	0,84	0,0097
miR-702	0,22	0,16	0,73	0,0062
miR-192	0,20	0,24	1,17	0,0069
miR-693-3p	0,12	0,09	0,75	0,0099
6 d				
miR-15a	2,84	3,22	1,13	0,0029
12 d				
miR-181b	2,00	2,41	1,21	0,0087
miR-467b	1,12	0,92	0,83	0,0094
miR-380-3p	0,37	0,41	1,10	0,0066

Tabelle 1: Ergebnisse des *miChip*-Arrays. Dargestellt sind die signifikant veränderten microRNAs (miRNAs). In der ersten Spalte steht die jeweilige miRNA, in der zweiten und dritten der Mittelwert (MW) der Expression in der *Sham*- und *CCI*-Gruppe. In der vierten Spalte ist die relative Expression berechnet ($CCI\ MW / Sham\ MW$) und in der letzten Spalte der p-Wert. MiRNAs mit einer zu geringen Signalintensität wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Danach blieben fünf miRNAs in der 4 h-Gruppe und eine miRNA in der 1 d-Gruppe, die signifikante Expressionsunterschiede zwischen der *Sham*- und der *CCI*-Gruppe zeigten (fett gedruckt). *CCI*: chronic constriction injury.

MiRNAs mit einer zu geringen Signalintensität (s.o., Kap. 3.7) wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Danach blieben fünf miRNAs in der 4 h-Gruppe und eine miRNA in der 1 d-Gruppe, die signifikante Expressionsunterschiede zwischen der *Sham*- und der *CCI*-Gruppe zeigten (fett gedruckt in Tabelle 1). Die folgende Grafik (Abb. 8) veranschaulicht diese Ergebnisse noch einmal. Sie zeigt die Anzahl signifikant veränderter miRNAs zu den entsprechenden Zeitpunkten.

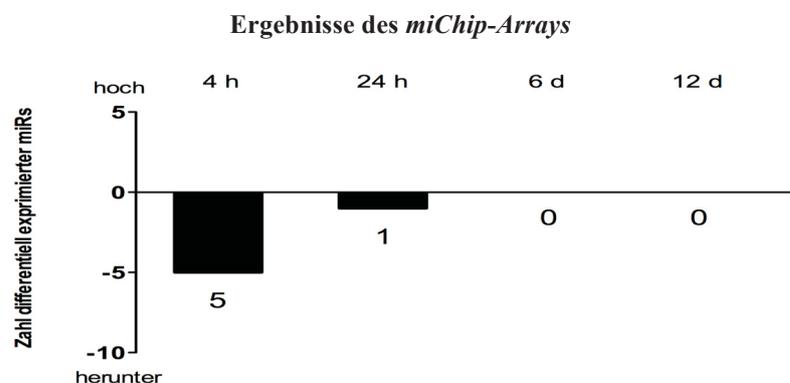


Abb. 8: Ergebnisse des *miChip*-Arrays. Anzahl signifikant veränderter miRNAs nach Ausschluss aller miRNAs mit einer zu geringen Signalintensität. Nach vier Stunden waren fünf miRNAs signifikant herunterreguliert und nach einem Tag noch eine miRNA. miRNA: microRNA.

Vier Stunden nach Induktion der *CCI* waren die miR-30b, -100, -10a, -99a und 582-3p signifikant herunterreguliert (Abb. 9a) und nach einem Tag die miR-720 (Abb. 9b). Die relativen Veränderungen (*fold change*) waren moderat und reichten von 0,78 bis 0,87.

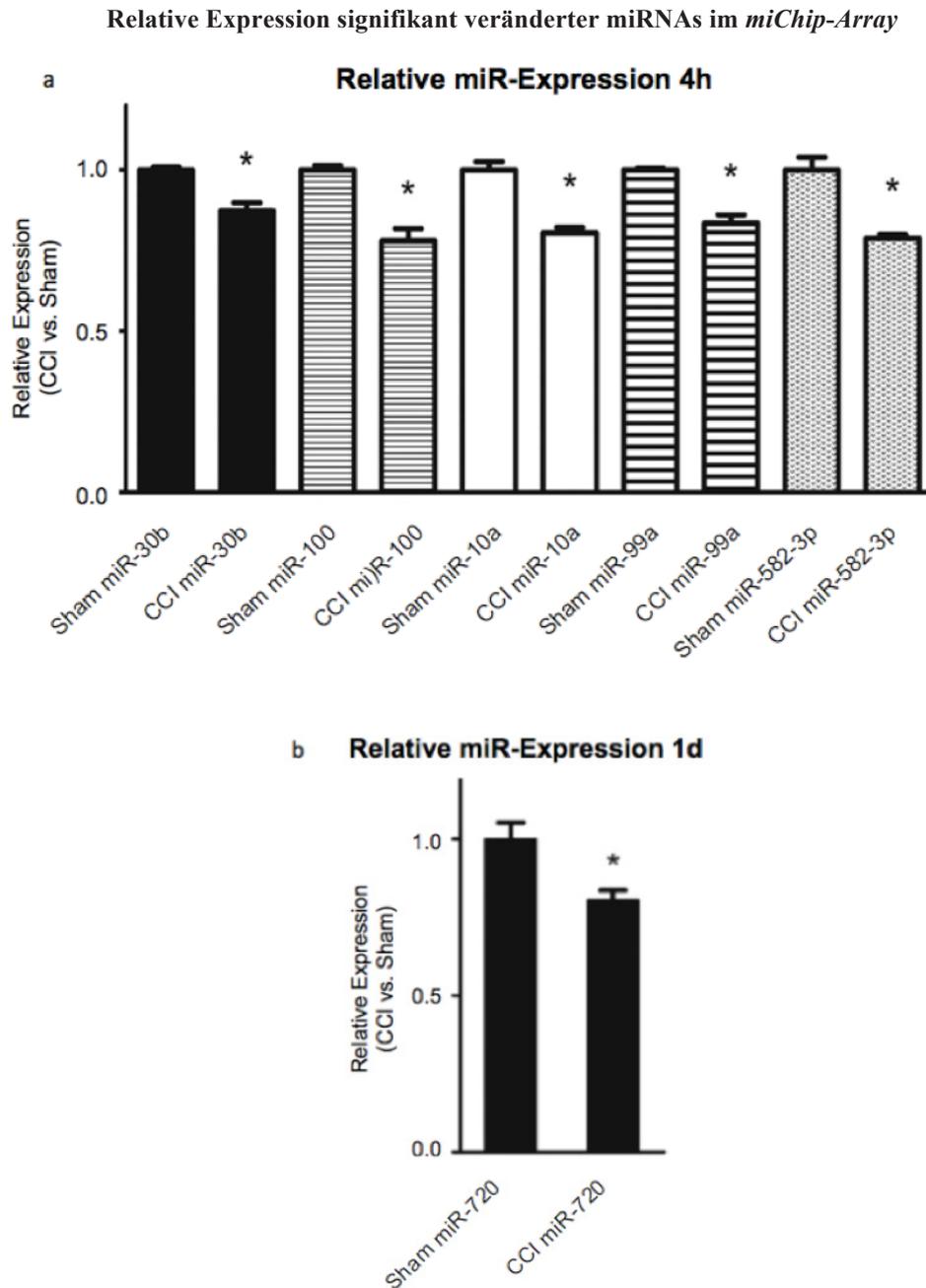


Abb. 9: Relative Expression signifikant veränderter microRNAs im *miChip*-Array. Vier Stunden nach *CCI* waren die miR-30b, -100, -10a, -99a und 582-3p signifikant herunterreguliert (a), nach einem Tag die miR-720 (b). Es wurden gepoolte Proben verwendet, d.h. die RNA aus den Proben zweier Tiere aus einer Gruppe wurde zusammengemischt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 3$, $*p < 0,05$ vs. *Sham*. *CCI*: chronic constriction injury, miR: microRNA, n: Anzahl der Proben.

4.5 Real-Time PCR

Aufgrund der signifikanten, wenn auch geringen Veränderungen der miRNA-Expression wurde die *qPCR* für folgende miRNAs durchgeführt: miR-10a, -30b, -99a, -100 und -720. Sie diente dazu, bei nicht *gepoolten* Proben und somit größeren n-Zahlen, die Expressionsunterschiede, die sich in den *Arrays* gezeigt haben, zu verifizieren. Die miR-582-3p wurde nicht untersucht, da für diese miRNA keine schmerzrelevanten *Targets* bekannt sind. Außerdem wurden noch *qPCRs* für folgende miRNAs durchgeführt: miR-1, -138, -let-7f, -133a, da diese potentiell schmerzrelevante Zielproteine regulieren (siehe Kapitel 1.2.6.)

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils die relative Expression der entsprechenden miR zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler. Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen.

Die miR-10a war im *miChip-Array* nur zum 4 h-Zeitpunkt signifikant herunterreguliert (*fc* 0,81, $p = 0,0027$) danach (1 d, 6 d, 12 d) wurde das Signifikanzniveau nicht mehr erreicht. Auch in der *qPCR* war die Expression vier Stunden nach *CCI-OP* vermindert (*fc* $0,8 \pm 0,09$), allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant ($p = 0,30$). Einen Tag nach Induktion der *CCI* betrug der *fc* $1,04 \pm 0,15$ ($p = 0,90$). Nach sechs und zwölf Tagen war die relative Expression der miR-10a in der *CCI*-Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden *Sham*-Tieren wieder vermindert, wenn auch nicht signifikant (6 d: *fc* $0,82 \pm 0,12$, $p = 0,37$; 12 d: *fc* $0,95 \pm 0,14$, $p = 0,84$). Die Ergebnisse sind in Abb. 10 und Tabelle 2 dargestellt.

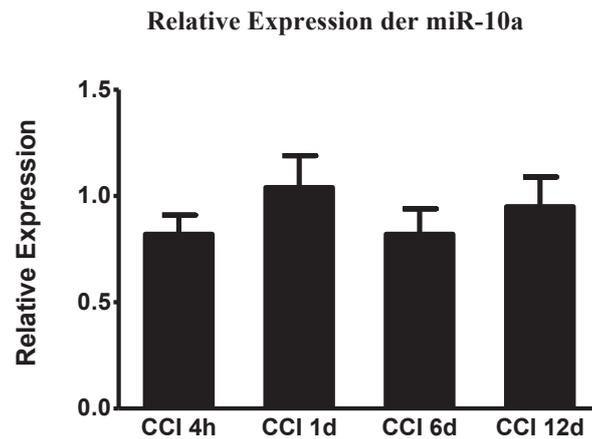


Abb. 10: Relative Expression der miR-10a in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA, CCI: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

Die Expression der miR-30b war im *miChip-Array* nur zum 4 h-Zeitpunkt signifikant erniedrigt (*fc* 0,87, $p = 0,0086$). Dieses Ergebnis konnte in der *qPCR* mit einer größeren *n*-Zahl und nicht-gepoolten Proben nicht bestätigt werden, wie aus Abb. 11 und Tabelle 2 zu entnehmen ist. Hier zeigte sich eine relative Expression in der CCI-Gruppe im Vergleich mit der Sham-Gruppe von $1,00 \pm 0,17$ ($p = 0,98$) vier Stunden nach CCI-OP. Insgesamt zeigten sich bei dieser miRNA nur geringe Schwankungen der relativen Expression (1 d: *fc* $0,94 \pm 0,14$, $p = 0,71$; 6 d: *fc* $1,01 \pm 0,17$, $p = 0,95$; 12 d: *fc* $0,97 \pm 0,12$, $p = 0,87$). Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Expressionsveränderungen.

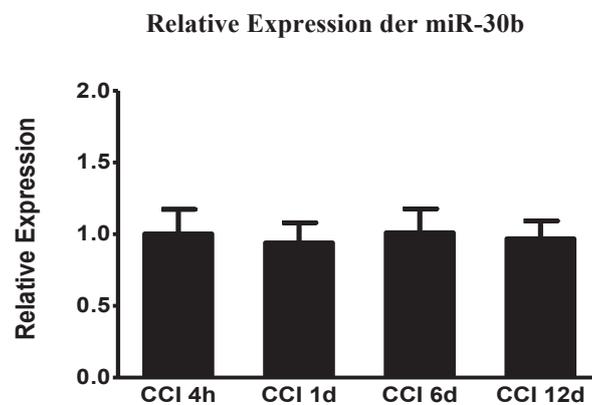


Abb. 11: Relative Expression der miR-30b in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA, CCI: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

Bei der miR-99a zeigte sich im *miChip-Array* ebenfalls lediglich vier Stunden nach Induktion der CCI eine signifikante Änderung der Expression (fc 0,84, $p = 0,0032$). Dieses konnte in der *qPCR* nicht bestätigt werden. Zwar zeigten sich starke Veränderungen der Expression mit einem *fold change* zwischen $0,44 \pm 0,10$, $p = 0,21$ nach vier Stunden und $1,51 \pm 0,29$, $p = 0,42$ nach einem Tag, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 12 und Tabelle 2).

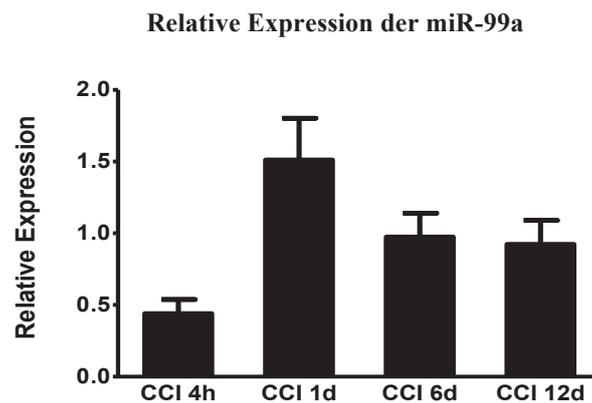


Abb. 12: Relative Expression der miR-99a in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA, CCI: *chronic constriction injury*, n: Anzahl der Proben.

Auch die miR-100 war im *miChip-Array* nur zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach vier Stunden signifikant herunterreguliert (fc 0,78, $p = 0,0055$), was allerdings ebenfalls nicht mit Hilfe der *qPCR* bestätigt werden konnte. Hier zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen in der Expression (Abb. 13 und Tabelle 2). Der *fold change* variierte allerdings sehr stark. Vier Stunden nach CCI-Operation war die relative Expression der miR-100 in der CCI-Gruppe deutlich geringer als in der Sham-Gruppe (fc 0,74 \pm 0,11, $p = 0,15$). Einen Tag und sechs Tage nach Induktion des neuropathischen Schmerzes durch CCI war der Unterschied zwischen der Sham- und CCI-Gruppe nicht mehr so groß (1 d: fc 0,94 \pm 0,32, $p = 0,83$; 6 d: fc 1,03 \pm 0,19, $p = 0,91$). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach zwölf Tagen war die Expression der miR-100 in der CCI-Gruppe mit einem fc von 0,69 \pm 0,08 ($p = 0,06$) wieder deutlich geringer als in der Sham-Gruppe. Das Signifikanzniveau wurde knapp verfehlt.

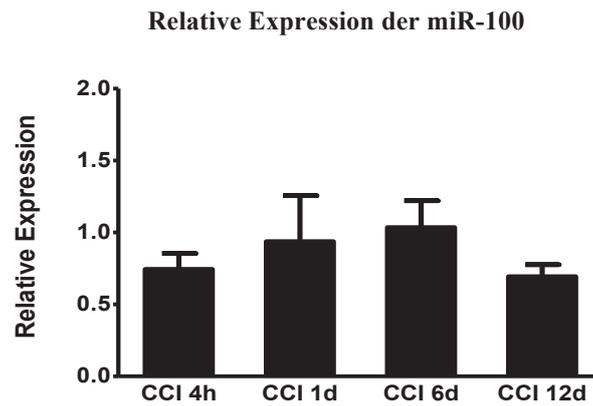


Abb. 13: Relative Expression der miR-100 in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA, CCI: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

Die miR-720 zeigte im *miChip-Array* die zweithöchste Expressionsrate aller untersuchten miRNAs im Rückenmark. Außerdem war sie in der CCI-Gruppe im Vergleich zu Sham einen Tag nach CCI-OP im *miChip-Array* signifikant herunterreguliert (*fc* 0,81; $p = 0,0050$), was allerdings nicht in der *qPCR* bestätigt werden konnte (Abb. 14 und Tabelle 2). Hier betrug der *fc* zum gleichen Untersuchungszeitpunkt $1,01 \pm 0,26$ ($p = 0,98$). Zwar zeigten sich auch in der *qPCR* große Unterschiede in der relativen Expression mit einem *fold change* zwischen 0,72 (4 h) und 1,33 (6 d), allerdings waren diese Veränderungen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant.

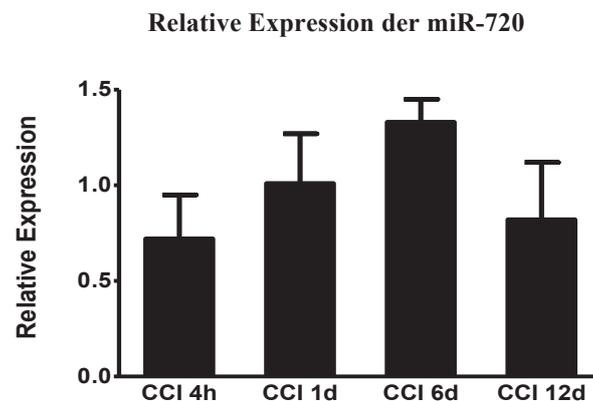


Abb. 14: Relative Expression der miR-720 in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA. CCI: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

Die miR-1 war im *miChip-Array* zu keinem der vier untersuchten Zeitpunkte signifikant verändert. Gleiches bestätigte sich auch in der *qPCR*. Der *fold change* schwankte zwischen $0,60 \pm 0,08$ ($p = 0,86$) nach zwölf Tagen und $1,21 \pm 0,31$ ($p = 0,73$) einen Tag nach Induktion des *CCI*. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 und Tabelle 2 dargestellt.

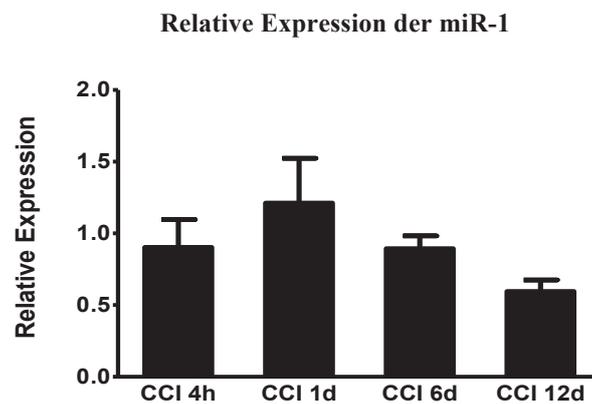


Abb. 15: Relative Expression der miR-1 in der *CCI*-Gruppe im Vergleich zur *Sham*-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA, *CCI*: *chronic constriction injury*, n: Anzahl der Proben.

Auch die Expression der miR-138 war sowohl im *miChip-Array* als auch in der *qPCR* zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert (Abb. 16 und Tabelle 2). Hier zeigten sich generell sehr geringe Unterschiede zwischen der *Sham*- und der *CCI*-Gruppe mit Werten für die relative Expression dieser miRNA in der *CCI*-Gruppe im Vergleich mit *Sham* zwischen $0,90 \pm 0,09$ ($p = 0,48$) nach sechs Tagen und $1,16 \pm 0,09$ ($p = 0,44$) einen Tag nach Schmerzinduktion.

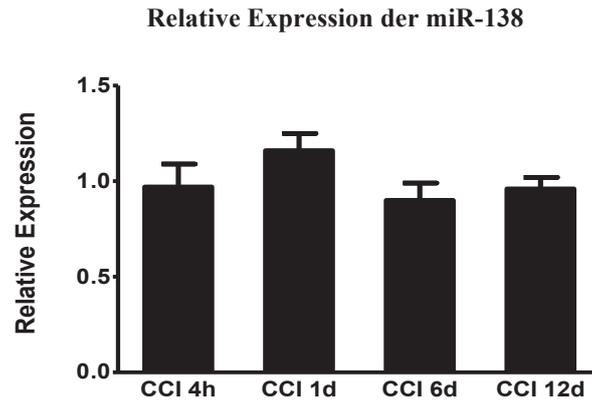


Abb. 16: Relative Expression der miR-138 in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA, CCI: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

Die Expression der let-7f war sowohl im *miChip-Array* als auch in der *qPCR* zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert. Insgesamt war diese miRNA in der CCI-Gruppe bis auf den letzten Untersuchungszeitpunkt zwölf Tage nach Induktion des neuropathischen Schmerzes durch CCI-OP im Vergleich zu Sham herunterreguliert (Abb. 17 und Tabelle 2). Die geringste relative Expression fand sich zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach vier Stunden. Hier betrug der *fc* $0,66 \pm 0,18$ ($p = 0,29$). Nach einem und nach sechs Tagen war die relative Expression in der CCI-Gruppe im Vergleich zu Sham noch vermindert (1 d: *fc* $0,73 \pm 0,18$, $p = 0,39$; 6 d: *fc* $0,79 \pm 0,14$, $p = 0,34$). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach zwölf Tagen betrug der *fc* $1,11 \pm 0,16$ ($p = 0,82$), verglichen mit Sham.

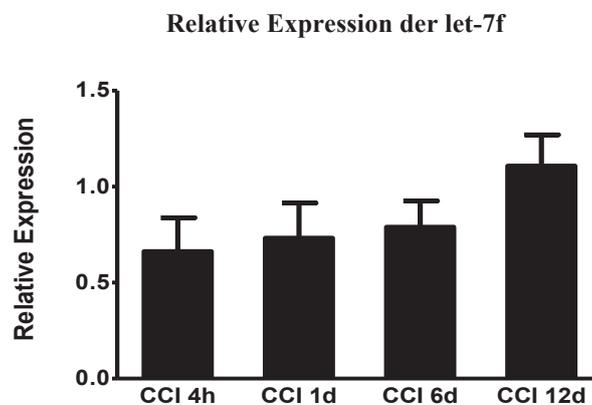


Abb. 17: Relative Expression der let-7f in der CCI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA. CCI: chronic constriction injury, n: Anzahl der Proben.

Die miR-133a war zu keinem Zeitpunkt im *miChip-Array* signifikant verändert, gleiches bestätigte sich auch in der *qPCR*, wie Abb. 18 und Tabelle 2 zeigen. Auch hier ergaben sich wieder relativ große Schwankungen der relativen Expression dieser miRNA in der *CCI*-Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden *Sham*-Tieren. Die geringste Expression fand sich sechs Tage nach *CCI-OP* mit einem *fc* von $0,68 \pm 0,10$ ($p = 0,12$). Demgegenüber zeigte sich einen Tag nach Induktion neuropathischer Schmerzen durch *CCI* eine deutlich höhere relative Expression (*fc* $1,34 \pm 0,27$, $p = 0,18$).

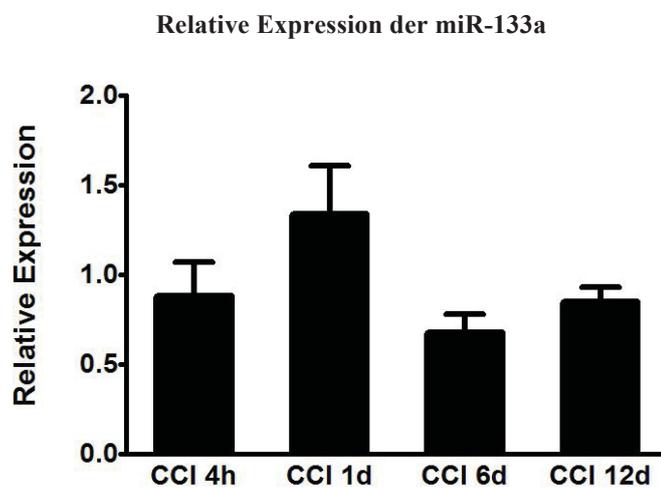


Abb. 18: Relative Expression der miR-133a in der *CCI*-Gruppe im Vergleich zur *Sham*-Gruppe, dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler, je $n = 6$ pro Zeitpunkt. miR: microRNA. *CCI*: *chronic constriction injury*, n: Anzahl der Proben.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung (t-Tests) sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 2) zusammengefasst. Der p-Wert war zu allen untersuchten Zeitpunkten größer als 0,05, daher liegen keine statistisch signifikanten Veränderungen vor.

Tabelle 2: Ergebnisse der statistischen Auswertung der *qPCRs*

miRNA	Zeitpunkt	rel. Expression	Standardfehler	P-Wert
miR-10a	4 h	0,82	0,09	0,30
	1 d	1,04	0,15	0,90
	6 d	0,82	0,12	0,37
	12 d	0,95	0,14	0,84
miR-30b	4 h	1,00	0,17	0,98
	1 d	0,94	0,14	0,71
	6 d	1,01	0,17	0,95
	12 d	0,97	0,12	0,87
miR-99a	4 h	0,44	0,10	0,21
	1 d	1,51	0,29	0,42
	6 d	0,97	0,17	0,93
	12 d	0,92	0,17	0,71
miR-100	4 h	0,74	0,11	0,15
	1 d	0,94	0,32	0,83
	6 d	1,03	0,19	0,91
	12 d	0,69	0,08	0,06
miR-720	4 h	0,72	0,23	0,39
	1 d	1,01	0,26	0,98
	6 d	1,33	0,12	0,18
	12 d	0,82	0,30	0,60

miRNA	Zeitpunkt	rel. Expression	Standardfehler	P-Wert
miR-1	4 h	0,90	0,19	0,88
	1 d	1,21	0,31	0,73
	6 d	0,89	0,09	0,86
	12 d	0,60	0,08	0,24
miR-138	4 h	0,97	0,12	0,89
	1 d	1,16	0,09	0,44
	6 d	0,90	0,09	0,48
	12 d	0,96	0,06	0,22
let-7f	4 h	0,66	0,18	0,29
	1 d	0,73	0,18	0,39
	6 d	0,79	0,14	0,34
	12 d	1,11	0,16	0,82
miR-133a	4 h	0,88	0,19	0,60
	1 d	1,34	0,27	0,18
	6 d	0,68	0,10	0,12
	12 d	0,85	0,08	0,54

Tabelle 2: Ergebnisse der statistischen Auswertung der *qPCRs*. Dargestellt ist die relative Expression (MW, Standardfehler) sowie der p-Wert jeder der neun untersuchten miRNAs in der CCI-Gruppe verglichen mit *Sham*. n = 6 je Gruppe. Die letzte Spalte zeigt, dass zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) vorlagen. *qPCR*: *Real-Time quantitative PCR*, miRNA/miR: microRNA, d: Tag, h: Stunde, n: Anzahl der Proben.

Wenn man nun die Ergebnisse des *miChip-Array* und der *qPCRs* miteinander vergleicht, so stellt man fest, dass sich bei der miR-10a, -99a und -100 ein ähnlicher Trend zeigt. Alle drei genannten miRNAs sind vier Stunden nach Induktion neuropathischer Schmerzen herunterreguliert, im *miChip-Array* sogar signifikant (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich der Ergebnisse von *miChip-Array* und *qPCR* ausgewählter miRNAs

miRNA	Zeitpunkt	relative Expression <i>miChip-Array</i> (p-Wert)	relative Expression <i>qPCR</i> (p-Wert)
miR-10a	4 h	0,81 (0,0027)	0,82 (0,30)
miR-30b	4 h	0,87 (0,0086)	1,00 (0,98)
miR-99a	4 h	0,84 (0,0032)	0,44 (0,21)
miR-100	4 h	0,78 (0,0055)	0,74 (0,15)

Tabelle 3: Vergleich der relativen Expression ausgewählter miRNAs zum 4 h-Zeitpunkt im *miChip-Array* und in der *qPCR*. Es zeigt sich, dass, mit Ausnahme der miR-30b, bei allen miRNAs die relative Expression der entsprechenden miRNA nach Induktion neuropathischer Schmerzen zu diesem frühen Zeitpunkt sowohl im *miChip-Array* als auch in der *qPCR* verringert ist. *qPCR*: Real-Time quantitative PCR. miRNA: microRNA, h: Stunde.

5 Diskussion

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, Expressionsveränderungen spinaler miRNAs bei induzierten chronischen neuropathischen Schmerzen bei der Ratte zu untersuchen. Bisher wurde noch keine systematische Untersuchung der zeitabhängigen Veränderungen der miRNA-Expression im Rückenmark der Ratte in einem Modell für chronischen neuropathischen Schmerz durchgeführt. Aufgrund der hohen klinischen Relevanz neuropathischer Schmerzen und der, wie bereits erwähnt, bisher unzureichenden therapeutischen Optionen, ist es wichtig, die grundlegenden Veränderungen auf Ebene der miRNAs im Rahmen neuropathischer Schmerzen zu untersuchen.

Zu Beginn stellte sich die Frage, welche miRNAs im Rückenmark von Ratten konstitutiv exprimiert sind. Es konnte im *miChip-Array* eine große Zahl von miRNAs nachgewiesen werden, hierbei waren die miR-494, -720, -690, -668, -875-3p, -24-1, -709, -207, -433 und -138 die zehn am höchsten exprimierten miRNAs.

Anschließend wurde untersucht, welche miRNAs nach Induktion neuropathischer Schmerzen im *CCI-Modell*, verglichen mit *Sham-Tieren*, differentiell exprimiert sind. Die Induktion neuropathischer Schmerzen mittels *CCI* führte in unserem Modell zu moderaten, aber signifikanten Änderungen der Expressionslevel von 27 miRNAs nach vier Stunden, sieben miRNAs nach einem Tag, einer miRNA nach sechs Tagen und drei miRNAs nach zwölf Tagen, jeweils verglichen mit der entsprechenden *Sham-Gruppe*.

Daraufhin wurden ausgewählte miRNAs mit schmerzrelevanten *Targets* mittels spezifischen *PCR-Assays* untersucht. Wir konnten zeigen, dass es bei den untersuchten spinalen miRNAs zu den gegebenen Zeitpunkten im gewählten experimentellen Ansatz für neuropathischen Schmerz nicht zu signifikanten Expressionsveränderungen in der *CCI-Gruppe* im Vergleich mit der *Sham-Gruppe* kommt. Die geringen signifikanten Veränderungen einiger miRNAs, die im *miChip-Array* nachgewiesen werden konnten, konnten bei der im Anschluss durchgeführten *qPCR* nicht bestätigt werden. Allerdings zeigte sich in den *qPCRs* eine in Stärke und Ausrichtung mit den Ergebnissen des *miChip-Arrays* vergleichbare Regulation. Es könnte daher trotz fehlender Signifikanz ein biologischer Effekt erzielt werden, insbesondere wenn man bedenkt, dass häufig

mehrere miRNAs zusammenwirken, um ein bestimmtes Protein zu regulieren und die miRNAs häufiger auch in *Clustern* (Gruppen aus mehreren miRNAs) reguliert werden.

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Tiermodelle für neuropathischen Schmerz

Um die zugrundeliegenden Mechanismen des neuropathischen Schmerzes erforschen zu können, wurden eine Reihe von Tiermodellen entwickelt (Bennett, Xie, 1988; Decosterd, Woolf, 2000; Kim, Chung, 1992; Seltzer u. a., 1990; Wall, Gutnick, 1974).

Gemeinsam ist vielen dieser Modelle, dass sie den *N. ischiadicus* für die Nervenschädigung nutzen. Dieser Nerv ist groß, leicht zugänglich und innerviert die Fußsohle, an der anschließend sensorische Testungen vorgenommen werden können (Hogan, 2002). Wir verwendeten das CCI-Modell zur Erzeugung neuropathischer Schmerzen, da dieses in unserer Arbeitsgruppe seit langem etabliert ist und zuverlässig zur Entstehung neuropathischer Schmerzen bei der Ratte führt.

Obwohl diese Tiermodelle sehr hilfreich bei der Erforschung der maladaptiven Veränderungen und der Plastizität des Nervensystems nach einer Nervenschädigung sind, können sie dennoch nicht als direktes Surrogat für neuropathischen Schmerz bei Menschen herangezogen werden, denn nicht alle Prozesse und Veränderungen sind eins zu eins auf den Menschen übertragbar. Außerdem können subjektive Symptome im Tiermodell nicht untersucht werden, so dass die Komplexität des neuropathischen Schmerzes des Menschen nicht vollständig im Tiermodell abgebildet werden kann. Dennoch korrespondieren Symptome wie die taktile *Allodynie* im Tiermodell mit neuropathischer mechanischer Hypersensibilität beim Menschen (Koltzenburg u. a., 1994; Rowbotham, Fields, 1996) und Medikamente, die bei Menschen zur Therapie neuropathischer Schmerzen eingesetzt werden (z. B. Gabapentin, Morphin, Fluoxetin), reduzieren auch bei Tieren die taktile *Allodynie* (LaBuda, Little, 2005). Außerdem ist es notwendig, ein standardisiertes Verfahren zur Induktion des neuropathischen Schmerzes sowie zur nachfolgenden Verhaltenstestung zu verwenden, um reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse zu generieren.

5.1.2 Untersuchte Zeitpunkte

Die Verhaltenstestungen bei den Versuchstieren bestätigten, dass die Neuropathie sechs Tage nach *CCI-OP* ausgebildet war und sich nach zwölf Tagen noch verstärkt hatte. Dementsprechend untersuchten wir die miRNA-Expressionslevel im Rückenmark der Ratten zu diesen Zeitpunkten. Die beiden früheren Zeitpunkte (4 h, 1 d) wählten wir, um auch den Prozess, der zur Entwicklung des Vollbildes des neuropathischen Schmerzes führt, abbilden zu können, obwohl zu diesen Zeitpunkten noch keine signifikante Verhaltensänderung bei den Ratten festzustellen ist. Kusuda et al. untersuchten die miRNA-Expression im Hinterstrangganglion und im Rückenmark der Maus in mehreren Schmerzmodellen. Zur Induktion einer Neuropathie verwendeten sie die *partial sciatic nerve injury* und untersuchten die miRNA-Expression nach einem, drei, sieben und 14 Tagen. Dabei zeigte sich im Rückenmark zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der Expression. Nach einer *Axotomie* zeigte sich zu den untersuchten Zeitpunkten (1, 3, 7 Tage) eine signifikante Reduktion der miR-1-Expression im Rückenmark, die anderen untersuchten miRNAs blieben unverändert (Kusuda u. a., 2011).

Es war unser Ziel, zu möglichst frühen Zeitpunkten eine Veränderung der Regulation von miRNAs nachzuweisen, denn diese Veränderungen stehen am Anfang einer Kette (Abb. 19). Zuerst muss die Expression der miRNAs verändert sein, um dann auf die Translation der mRNAs einwirken zu können, was letzten Endes zu einer Regulation der Proteinexpression führt. Wie schnell diese Mechanismen auf molekularer Ebene ablaufen, ist nicht genau bekannt.

Regulation der Proteinexpression durch miRNAs



Abb. 19: Regulation der Proteinexpression (vereinfachte Darstellung). Wird eine miRNA herunterreguliert, steigt die Translation der von ihr regulierten mRNA und somit auch die Proteinexpression. Wenn hingegen die Expression einer miRNA steigt, so sinkt die Translation der entsprechenden mRNA und somit auch die Proteinexpression. miRNA: microRNA. mRNA: messenger RNA.

Wir konnten in unseren Untersuchungen zwar teilweise deutliche Veränderungen der miRNA-Expression im Rückenmark feststellen, allerdings waren diese nicht signifikant. Es könnte durchaus sein, dass zu einem Zeitpunkt zwischen Tag 1 und 6 signifikante Veränderungen stattgefunden haben, welche für uns zu den untersuchten Zeitpunkten nicht nachweisbar waren.

5.1.3 Rückenmark als Untersuchungsmaterial

Bislang existieren wenige Erkenntnisse über die Auswirkung einer peripheren Nervenschädigung auf die miRNA-Expression im zentralen Nervensystem. Die meisten der bisherigen Studien untersuchten die Veränderungen im Hinterstrangganglion und somit im peripheren Nervensystem. Wir verwendeten das Rückenmark, um zu überprüfen, ob es auch im zentralen Nervensystem zu Veränderungen der miRNA-Expression nach Induktion neuropathischer Schmerzen kommt.

Kusuda et al. untersuchten die Auswirkungen von verschiedenen Schmerzformen (neuropathischer Schmerz, erzeugt mittels *partial sciatic ligation (PSL)* (Abb. 2), chronischer Entzündungsschmerz, Axotomie und akute Schmerzstimulation) auf die miRNA-Expression im Rückenmark und in den Hinterstrangganglien (Kusuda u. a., 2011). Dabei konzentrierten sie sich allerdings lediglich auf drei miRNAs, und zwar miR-1, -16 und -206.

Wir verwendeten zunächst einen globalen Ansatz, um die generelle Expression spinaler miRNAs bei Ratten zu untersuchen. Für die RNA-Isolation wurde das gesamte Rückenmark der Segmente L4-L6 verwendet. Da wir zwar im *miChip-Array* bei gepoolten Proben, nicht jedoch in den *qPCRs*, signifikante Expressionsunterschiede zwischen *Sham*- und *CCI*-Tieren feststellen konnten, kommt die Überlegung in Betracht, ob die vorhandenen geringen Veränderungen eventuell durch die Verwendung des gesamten Rückenmarks, anstatt nur des ipsilateralen, dorsalen Hinterhorns, bis unter die Nachweisgrenze abgeschwächt wurden. Diese Tatsache könnte auch erklären, warum Genda et al. in ihrer Studie (s.o, Kap. 1.2.7) signifikante Veränderungen der miRNA-Expression feststellen konnten. Sie verwendeten lediglich Gewebe des Hinterhorns. Es wäre denkbar, dass *CCI* unterschiedliche, eventuell sogar gegensätzliche Veränderungen in den Motoneuronen des Vorderhorns und den sensiblen Neuronen des Hinterhorns auslöst, und die Unterschiede somit nicht mehr

nachweisbar sind. Auf der anderen Seite verwendeten Kusuda et al. für ihre Untersuchungen nur das Gewebe des ipsilateralen, dorsalen Hinterhorns. Auch sie konnten bei neuropathischen Schmerzen, erzeugt durch *PSL*, keine signifikanten Veränderungen der miRNA-Expression im Rückenmark feststellen (Kusuda u. a., 2011). Für zukünftige Untersuchung kommt daher die Überlegung in Betracht, nur Gewebe des ipsilateralen, dorsalen Hinterhorns zu verwenden.

5.1.4 Bestimmung der miRNA-Expressionslevel mittels *miChip-Array*

Git et al. verglichen unterschiedliche Methoden, um die Expression von miRNAs zu untersuchen (Git u. a., 2010). Die Analyse der miRNA-Expression mit Hilfe verschiedener Messtechniken, wie z. B. *miRNA-Microarrays* und *qPCR-Assays* kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Dabei muss beachtet werden, dass es sich bei einem *Array* um eine *Screening*-Methode handelt, während die *qPCR* zum Nachweis spezifischer miRNAs dient. Zudem wurden in unserer Studie die Proben für den *Array* gepoolt, wie bereits oben beschrieben.

Ein häufiges Problem bei der Verwendung von *Microarrays* besteht darin, dass die miRNAs extrem kurz sind (ca. 20 Nukleotide), und somit oft die komplette Sequenz als Sonde dienen muss. Das wiederum führt zu einer erheblichen Varianz der Schmelz- und *Annealing*-Temperaturen von mehr als 20 °C und somit zu einer Abnahme der Bindungsspezifität (Git u. a., 2010). Weiterhin ist zu beachten, dass miRNA-Familien mit bis zu neun Mitgliedern (z. B. *hsa-let-7a* bis *-i*) existieren, die sich oft nur durch ein einziges Nukleotid unterscheiden und dennoch unterschiedliche Funktionen und Expressionsmuster haben und unterschiedlich reguliert sind (Roush, Slack, 2008). Eine sichere Differenzierung zwischen solchen miRNAs ist schwierig (Baskerville, Bartel, 2005; Miska u. a., 2004). Andere Methoden, wie zum Beispiel *Northern Blotting*, *Oligonukleotid-Macroarrays*, *qPCR* und *DNA-Microarrays*, zur Untersuchung der miRNA-Expression, liefern zwar auch zuverlässige Daten, allerdings wird deren Anwendung durch verschiedene Faktoren limitiert. Teilweise wird sehr viel Ausgangsmaterial benötigt oder die miRNA muss erst aufwändig vervielfältigt werden. Außerdem ist es mit diesen Methoden nicht immer möglich, zwischen verschiedenen miRNAs einer Familie zu differenzieren, die sich teils nur in einem einzigen Nukleotid unterscheiden.

Die von uns verwendeten *miChip-Microarrays* basieren auf der *LNA*-Technologie (siehe Kapitel 3.5), was durch die Vereinheitlichung der Hybridisierungsbedingungen für eine höhere Bindungsspezifität im Vergleich mit anderen *Microarrays*, welche nicht *LNA*-modifizierte DNA-Sonden verwenden, sorgt. Durch Modifikation des *LNA*-Gehaltes und der Länge der Sonden konnte eine Angleichung der Hybridisierungsbedingungen für alle untersuchten miRNAs erreicht werden. Des Weiteren wird beim *miChip-Array* nur sehr wenig Ausgangsmaterial (2,5 µg RNA) benötigt und es ist keine vorherige Anreicherung oder Vervielfältigung der RNA nötig, was einerseits die Arbeitsabläufe erleichtert und andererseits Fehler bei diesen Schritten ausschließt. Mit Hilfe des *miChip-Microarrays* kann also das miRNA-Expressionsmuster vieler verschiedener miRNAs gleichzeitig mit hoher Sensitivität und Genauigkeit bestimmt werden und es ist eine exakte Differenzierung zwischen miRNAs einer Familie mit geringen Unterschieden in der Nukleotidsequenz möglich (Castoldi u. a., 2006).

5.1.5 Bestimmung der miRNA-Expressionslevel mittels *qPCR*

Auch für die Untersuchung der miRNA-Expression mit Hilfe der quantitativen *Real-Time PCR* ergeben sich, neben den bereits erwähnten, wie geringe Länge, minimalen Unterschieden zwischen einzelnen Familienmitgliedern und unterschiedlichen Schmelztemperaturen durch unterschiedlichen GC-Gehalt, weitere Besonderheiten. Einerseits haben reife miRNAs keine Gemeinsamkeiten in ihrer Sequenz, wie z. B. der Poly-A-Schwanz bei *mRNAs*. Auf der anderen Seite weisen auch die unreifen Vorläufer (*pri-miRNA* und *pre-miRNA*) die gleichen Sequenzen wie die reife miRNA auf. Diese beiden Tatsachen erschweren eine selektive Vervielfältigung (Benes, Castoldi, 2010). Die von uns verwendeten TaqMan® *MicroRNA Assays* enthalten *Stem-Loop-Primer*. Die haarnadelförmige Struktur dieser Primer reduziert die Wahrscheinlichkeit, dass die Primer an unreife Vorstufen der miRNA binden, was die Spezifität des *Assays* erhöht (Chen u. a., 2005).

Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Anzahl der *qPCR*-Produkte zu, was eine exakte Quantifizierung des vervielfältigten *PCR*-Produkts zulässt. Dabei wird die Fluoreszenz von *Primer*-Dimeren und anderen fehlerhaften Amplifikationsprodukten, die im Rahmen der Reaktion entstehen können, nicht beeinflusst. Trotzdem haben diese

Nebenprodukte einen negativen Einfluss auf die Effizienz und Sensitivität des *qPCR-Assays*, weshalb vielleicht geringe, aber dennoch signifikante Veränderungen der miRNA-Expression, wie im *Array* nachgewiesen, mit Hilfe der *qPCR* nicht bestätigt werden konnten (Benes, Castoldi, 2010).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Expressionsmuster von miRNAs im Rückenmark der Ratte

Das Wissen über die Funktion und Bedeutung von miRNAs im zentralen Nervensystem nimmt seit Jahren stetig zu, insbesondere im Zusammenhang mit Zelldifferenzierung und malignen Tumoren.

Es zeigte sich, dass sich das Expressionsmuster von miRNAs in den einzelnen ZNS-Regionen ähnelt, wobei die Expressionslevel sich je nach Subregion unterscheiden (Hohjoh, Fukushima, 2007). In dieser Studie waren miR-124a, let-7f, miR-29a/b/c, miR-26a und miR-9 im Rückenmark am höchsten exprimiert. Eine andere Studie (Mishima u. a., 2007) konnte zeigen, dass die Expression von miR-124 im ZNS der Maus mehr als 100-mal höher war als in anderen Organen. In einer weiteren Studie konnten 93 miRNAs im Rückenmark der Maus nachgewiesen werden, von denen allerdings keine gewebespezifisch war (Tang u. a., 2007).

Mit dem in der vorliegenden Studie verwendeten *miRNA-Array* wurden die miR-494, -720, -690, -668, -875-3p, -24-1 -709, -207, -433 und -138 als die zehn miRNAs mit den höchsten Expressionsleveln im Rückenmark der Ratte identifiziert. Diese miRNAs wurden bisher nicht als hoch exprimiert im Rückenmark der Ratte beschrieben. In Übereinstimmung mit anderen, oben erwähnten Studien, gehören auch Mitglieder der let-7-Familie (z. B. let-7c und -7e) sowie die miRNA -124 und -34b-3p zur Gruppe der hoch exprimierten miRNAs.

Es gibt aber auch Unterschiede zwischen den vorliegenden Ergebnissen und der vorhandenen Literatur. Diese Unterschiede könnten Spezies-abhängigen Unterschieden geschuldet sein, da sich die meisten Studien auf die Untersuchung an Maus-Modellen konzentrieren, auch wenn dies nicht sehr wahrscheinlich erscheint. Außerdem könnte die Analyse von miRNA-Expressionsmustern mit unterschiedlichen Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, wie bereits in Kapitel 5.1.4 erwähnt.

In dem von uns durchgeführten *Array* zeigte sich, dass die miR-720 sehr hoch exprimiert ist. Ein hohes Expressionslevel der miR-720 wurde auch von Tang et al. beschrieben (Tang u. a., 2007). Sie vermuteten, dass diese miRNA einen ungewöhnlichen Reifungsprozess von der pre-miRNA zur reifen Form hat und somit in einem *Array* durch Kreuzreaktionen sowohl reife Formen als auch Vorstufen nachgewiesen werden könnten. Für eine spezifische *Array*-Analyse ist es also notwendig, die kurzen, reifen miRNAs vor der *Array*-Analyse zu isolieren, um Kreuzreaktionen mit den längeren pre-miRNAs zu verhindern (Tang u. a., 2007). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der miR-720 nicht um eine miRNA sondern um ein Fragment einer tRNA (Transfer-RNA) handelt (Schopman u. a., 2010). Daher wurde diese miRNA auch aus der Datenbank *miRBase* (www.mirbase.org) entfernt.

Insgesamt zeigten unsere *Microarray*-Daten, dass es ein spezifisches Expressionsmuster von miRNAs im Rückenmark der Ratte gibt, von denen einige stark exprimiert und bisher noch nicht beschrieben sind. Die Funktion dieser miRNAs in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Rückenmark muss noch weitergehend untersucht werden. Man könnte mögliche schmerzrelevante Ziel-Proteine dieser miRNAs mit Hilfe entsprechender Datenbanken identifizieren und dann untersuchen, ob sich die Expression dieser Proteine im Rahmen induzierter neuropathischer Schmerzen ändert.

5.2.2 Relative Expression spinaler miRNAs nach induziertem chronischem neuropathischem Schmerz der Ratte

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es im *CCI*-Modell für chronisch neuropathischen Schmerz der Ratte zu den von uns untersuchten Zeitpunkten nicht zu einer relevanten Regulation der miRNAs im Rückenmark kommt. Die Expressionsunterschiede, die sich in der *miChip*-Analyse zeigten, waren nur sehr moderat und konnten durch *qPCR*-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Damit decken sich unsere Ergebnisse mit denen von Kusuda et al., die ebenfalls keine Veränderungen von miRNAs im Rückenmark bei chronischen neuropathischen Schmerzen feststellen konnten. Es konnte lediglich eine differentielle Expression verschiedener miRNAs (miR-1, -16, -206) in den Hinterstrangganglien (*dorsal root ganglion, DRG*) und im Rückenmark bei entzündlichen

Schmerzen nachgewiesen werden. Bei neuropathischen oder akuten Schmerzen zeigten sich nur in den *DRGs* Veränderungen der miRNAs, nicht jedoch im Hinterhorn des Rückenmarks (Kusuda u. a., 2011). Weiterhin konnten sie feststellen, dass nach einer *Axotomie* (Nervendurchtrennung) die miR-1 im Hinterhorn über den gesamten Untersuchungszeitraum herunterreguliert war. In unseren Untersuchungen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expression der miR-1 im Rückenmark, weder in den *Arrays* noch in der *qPCR*.

Dennoch zeigten sich, wie bereits einleitend erwähnt (Kap. 5), bei einigen miRNAs sowohl im *miChip-Array* als auch in den *qPCRs* in Stärke und Ausrichtung vergleichbare Änderungen der relativen Expression (Tabelle 3).

Die im Folgenden beschriebenen möglichen *Targets* der von uns untersuchten miRNAs wurden mit Hilfe der Internetdatenbank microRNA.org (www.microrna.org) sowie der Metasuchmaschine *Entrez Gene* (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), welche vom *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* betrieben wird, identifiziert.

Ein *Target* der miR-10a ist BDNF. Wie bereits weiter oben (Kap. 1.1.2) erwähnt, trägt BDNF durch die Hemmung eines Kalium-Chlorid-Transporters zur Entstehung paradoxer Erregungen und spontaner Aktivität bei.

Der spannungsabhängige Natriumkanal *SCN3A* (*sodium channel, voltage gated, type III, alpha subunit*), auch bekannt als Na_v 1.3, ist ein *Target* sowohl der miR-10a als auch der miR-30b. Wenn die Expression dieser miRNAs, wie in unserer Studie, im Rahmen neuropathischer Schmerzen abnimmt, bedeutet das, dass die Translation der mRNA für *SCN3A* zunimmt und folglich mehr dieser spannungsabhängigen Natriumkanäle in die Membran eingebaut werden. Hains et al. konnten zeigen, dass es im Rahmen neuropathischer Schmerzen, hervorgerufen durch *CCI*, bei Ratten zu einer verstärkten Expression von *SCN3A* in den nozizeptiven Neuronen des Hinterhorns kommt (Hains u. a., 2004). Ebenso konnte das schmerztypische Verhalten der Versuchstiere durch intrathekale Gabe eines *Antisense*-Oligonukleotids, welches die Translation der mRNA unterbindet, gehemmt werden. Ein weiterer spannungsabhängiger Natriumkanal, welcher durch die miR-30b reguliert wird, ist *SCN9A* (*sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit*), auch bekannt als Na_v 1.7.

Es könnte also sein, dass die verringerte Expression von miR-10a und -30b im Rahmen neuropathischer Schmerzen über eine Zunahme der spannungsabhängigen Natriumkanäle zur Entstehung neuropathischer Schmerzen beiträgt.

Ein weiteres *Target* der miR-10a, und auch der let-7f, ist *WNK3* (*WNK lysine deficient protein kinase 3*), eine Proteinkinase, welche den transzellulären Chlorid-Transport reguliert. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, spielt der transmembranäre Chlorid-Gradient eine Rolle bei der Reaktion von Neuronen auf GABA im Rahmen der endogenen Schmerzhemmung (Kahle u. a., 2008).

Die *mRNA* des Glutamat-Rezeptors *GRIA4* (*glutamate receptor, ionotropic, AMPA4*) wird unter anderem von miR-99a und miR-100 reguliert. Die *AMPA*-Rezeptoren bilden eine Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren. Im Rahmen neuropathischer Schmerzen kommt es, wie bereits in Kap. 1.1.2 beschrieben, zu einem vermehrten Einbau von *AMPA*-Rezeptoren in die Zellmembran, was zu einer gesteigerten Sensibilität für den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat führt. Die verringerte Expression von miR-99a und miR-100, welche sich in unseren Untersuchungen abzeichnet, könnte zu einer gesteigerten Translation der *mRNA* des *GRIA4* und somit zu einer gesteigerten Rezeptordichte führen. Ein weiterer *AMPA*-Rezeptor ist *GRIA2* (*glutamate receptor, ionotropic, AMPA2*), welcher durch die miR-30b reguliert wird.

Auch wenn in den *qPCRs* das Signifikanzniveau verfehlt wurde, könnte trotzdem ein biologischer Effekt erzielt werden. Die miR-10a ist Teil einer miRNA-Familie, zu der unter anderem auch die miR-100 und miR-99a gehören (*gene family* MIPF0000033, www.mirbase.org). Eine miRNA-Familie stellt eine Gruppe von miRNAs, die von einem gemeinsamen Vorgänger abstammen und normalerweise ähnliche physiologische Funktionen haben (Zou u. a., 2014). Wie vorangehend beschrieben, werden viele schmerzrelevante Proteine durch mehrere miRNAs reguliert, sodass auch durch geringe, in unseren Untersuchungen nicht signifikante Expressionsänderungen auf miRNA-Ebene, ein Effekt auf die Expression von Zielproteinen denkbar wäre.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Induktion von neuropathischem Schmerz durch das *CCI*-Modell führt bei Ratten zu den von uns untersuchten Zeitpunkten nicht zu signifikanten Veränderungen der miRNA-Expression im Rückenmark. Allerdings konnte für einige miRNAs teilweise eine deutliche Veränderung der Expression dargestellt werden, welche durchaus biologisch relevant sein könnte. Die von diesen miRNAs möglicherweise regulierten Zielproteine tragen zu den bereits bekannten und gut untersuchten Veränderungen der Struktur und Funktion des schmerzleitenden Systems im Bereich des Rückenmarks bei. Eine entsprechende Studie zu den Veränderungen von miRNAs in den Hinterstrangganglien von Ratten, die nach dem *CCI*-Modell behandelt wurden, ist ein aktuelles Projekt unserer Arbeitsgruppe.

MiRNAs sind an vielen Prozessen im Rahmen der Entwicklung und Plastizität des Nervensystems beteiligt. Da weltweit sehr viele Menschen von neuropathischen Schmerzen betroffen sind und die Behandlungsansätze wie bereits einleitend beschrieben bislang nicht zufriedenstellend sind, ist es wichtig und notwendig, in diesem Bereich weiter zu forschen, um eventuell neue Behandlungsmethoden auf Ebene der miRNAs entwickeln zu können.

7 Literatur

Aldrich, B T; Frakes, E P; Kasuya, J; u. a. (2009): „Changes in expression of sensory organ-specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation“. In: *Neuroscience*. 164 (2), S. 711–723, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.033.

Ali, Z; Ringkamp, M; Hartke, T V; u. a. (1999): „Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey“. In: *Journal of Neurophysiology*. 81 (2), S. 455–466.

Allen, E; Xie, Z; Gustafson, A M; u. a. (2004): „Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*“. In: *Nature Genetics*. 36 (12), S. 1282–1290, DOI: 10.1038/ng1478.

Ambros, V (2004): „The functions of animal microRNAs“. In: *Nature*. 431 (7006), S. 350–355, DOI: 10.1038/nature02871.

Amir, R; Kocsis, J D; Devor, M (2005): „Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 25 (10), S. 2576–2585, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4118-04.2005.

Anand, P; Birch, R (2002): „Restoration of sensory function and lack of long-term chronic pain syndromes after brachial plexus injury in human neonates“. In: *Brain: A Journal of Neurology*. 125 (Pt 1), S. 113–122.

Aslam, A; Singh, J; Rajbhandari, S (2014): „Pathogenesis of painful diabetic neuropathy“. In: *Pain Research and Treatment*. 2014 , S. 412041, DOI: 10.1155/2014/412041.

Baba, H; Ji, R-R; Kohno, T; Moore, K A; Ataka, T; Wakai, A; Okamoto, M; Woolf, C J (2003): „Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn“. In: *Molecular and Cellular Neurosciences*. 24 (3), S. 818–830.

- Bai, G; Ambalavanar, R; Wei, D; Dessem, D (2007): „Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain“. In: *Molecular Pain*. 3 , S. 15, DOI: 10.1186/1744-8069-3-15.
- Bali, K; Selvaraj, D; Satagopam, V P; u. a. (2013): „Genome-wide identification and functional analyses of microRNA signatures associated with cancer pain“. In: *EMBO molecular medicine*., DOI: 10.1002/emmm.201302797.
- Baron, R (2006): „Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective“. In: *Nature Clinical Practice. Neurology*. 2 (2), S. 95–106, DOI: 10.1038/ncpneuro0113.
- Baron, R (2010): „Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment“. In: *Lancet Neurology*. 9 (8), S. 807–819, DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70143-5.
- Bartel, D P (2004): „MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function“. In: *Cell*. 116 (2), S. 281–297.
- Baskerville, S; Bartel, D P (2005): „Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 11 (3), S. 241–247, DOI: 10.1261/rna.7240905.
- Basyuk, E; Suavet, F; Doglio, A; u. a. (2003): „Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products“. In: *Nucleic Acids Research*. 31 (22), S. 6593–6597.
- Bee, L A; Dickenson, A H (2008): „Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin“. In: *Pain*. 140 (1), S. 209–223, DOI: 10.1016/j.pain.2008.08.008.
- Benes, V; Castoldi, M (2010): „Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available“. In: *Methods (San Diego, Calif.)*. 50 (4), S. 244–249, DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.026.
- Bennett, G J; Xie, Y K (1988): „A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man“. In: *Pain*. 33 (1), S. 87–107.

- Benn, S C; Woolf, C J (2004): „Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes“. In: *Nature Reviews. Neuroscience*. 5 (9), S. 686–700, DOI: 10.1038/nrn1477.
- Berezikov, E; Thuemmler, F; van Laake, L W; Kondova, I; Bontrop, R; Cuppen, E; Plasterk, R H A (2006): „Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain“. In: *Nature Genetics*. 38 (12), S. 1375–1377, DOI: 10.1038/ng1914.
- Binshtok, A M; Wang, H; Zimmermann, K; Amaya, F; Vardeh, D; Shi, L; Brenner, G J; Ji, R-R; Bean, B P; Woolf, C J; Samad, T A (2008): „Nociceptors are interleukin-1beta sensors“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 28 (52), S. 14062–14073, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008.
- Blumberg, H; Jänig, W (1984): „Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma“. In: *Pain*. 20 (4), S. 335–353.
- Bohnsack, M T; Czaplinski, K; Gorlich, D (2004): „Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 10 (2), S. 185–191.
- Boivie, J; Hansson, P; Lindblom, U (1994): „Touch, temperature, and pain in health and disease: mechanisms and assessments“. In: Seattle: IASP Press. — ISBN: 0-931092-08-6
- Bonhoeffer, T; Yuste, R (2002): „Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function“. In: *Neuron*. 35 (6), S. 1019–1027.
- Borchert, G M; Lanier, W; Davidson, B L (2006): „RNA polymerase III transcribes human microRNAs“. In: *Nature Structural & Molecular Biology*. 13 (12), S. 1097–1101, DOI: 10.1038/nsmb1167.
- Bouhassira, D; Lantéri-Minet, M; Attal, N; Laurent, B; Touboul, C (2008): „Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population“. In: *Pain*. 136 (3), S. 380–387, DOI: 10.1016/j.pain.2007.08.013.
- Braasch, D A; Corey, D R (2001): „Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA“. In: *Chemistry & Biology*. 8 (1), S. 1–7.
- Brandenburger, T; Castoldi, M; Brendel, M; Grievink, H; Schlösser, L; Werdehausen, R; Bauer, I; Hermanns, H (2012): „Expression of spinal cord microRNAs in a rat model

of chronic neuropathic pain“. In: *Neuroscience Letters*. 506 (2), S. 281–286, DOI: 10.1016/j.neulet.2011.11.023.

Cafferty, W B J; McGee, A W; Strittmatter, S M (2008): „Axonal growth therapeutics: regeneration or sprouting or plasticity?“. In: *Trends in Neurosciences*. 31 (5), S. 215–220, DOI: 10.1016/j.tins.2008.02.004.

Campbell, J N (2001): „Nerve lesions and the generation of pain“. In: *Muscle & Nerve*. 24 (10), S. 1261–1273.

Campbell, J N; Raja, S N; Meyer, R A; Mackinnon, S E (1988): „Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury“. In: *Pain*. 32 (1), S. 89–94.

Campbell J N; Meyer, R A (2006): „Mechanisms of neuropathic pain“. In: *Neuron*. 52 (1), S. 77–92, DOI: 10.1016/j.neuron.2006.09.021.

Castoldi, M; Schmidt, S; Benes, V; Hentze, M W; Muckenthaler, M U (2008): „miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes“. In: *Nature Protocols*. 3 (2), S. 321–329, DOI: 10.1038/nprot.2008.4.

Castoldi, M; Schmidt, S; Benes, V; Noerholm, M; Kulozik, A E; Hentze, M W; Muckenthaler, M U (2006): „A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 12 (5), S. 913–920, DOI: 10.1261/rna.2332406.

Cerutti, L; Mian, N; Bateman, A (2000): „Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain“. In: *Trends in Biochemical Sciences*. 25 (10), S. 481–482.

Chattopadhyay, M; Zhou, Z; Hao, S; Mata, M; Fink, D J (2012): „Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy“. In: *Molecular pain*. 8 , S. 17, DOI: 10.1186/1744-8069-8-17.

Chen, C; Ridzon, D A; Broomer, A J; Zhou, Z; Lee, D H; Nguyen, J T; Barbisin, M; Xu, N L; Mahuvakar, V R; Andersen, M R; Lao, K Q; Livak, K J; Guegler, K J (2005): „Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR“. In: *Nucleic Acids Research*. 33 (20), S. e179, DOI: 10.1093/nar/gni178.

Chen, G; Park, C-K; Xie, R-G; Berta, T; Nedergaard, M; Ji, R-R (2014): „Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice“. In: *Brain: A Journal of Neurology*. 137 (Pt 8), S. 2193–2209, DOI: 10.1093/brain/awu140.

Chomczynski, P; Sacchi, N (1987): „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“. In: *Analytical Biochemistry*. 162 (1), S. 156–159, DOI: 10.1006/abio.1987.9999.

Costigan, M; Befort, K; Karchewski, L; Griffin, R S; D’Urso, D; Allchorne, A; Sitariski, J; Mannion, J W; Pratt, R E; Woolf, C J (2002): „Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury“. In: *BMC Neuroscience*. 3 , S. 16.

Costigan, M; Scholz, J; Woolf, C J (2009): „Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage“. In: *Annual Review of Neuroscience*. 32 , S. 1–32, DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.

Coull, J A M; Beggs, S; Boudreau, D; Boivin, D; Tsuda, M; Inoue, K; Gravel, C; Salter, M W; De Koninck, Y (2005): „BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain“. In: *Nature*. 438 (7070), S. 1017–1021, DOI: 10.1038/nature04223.

Cox, J J; Reimann, F; Nicholas, A K; Thornton, G; Roberts, E; Springell, K; Karbani, G; Jafri, H; Mannan, J; Raashid, Y; Al-Gazali, L; Hamamy, H; Valente, E M; Gorman, S; Williams, R; McHale, D P; Wood, J N; Gribble, F M; Woods, C G (2006): „An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain“. In: *Nature*. 444 (7121), S. 894–898, DOI: 10.1038/nature05413.

Decosterd, I; Woolf, C J (2000): „Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain“. In: *Pain*. 87 (2), S. 149–158.

Denli, Ahmet M; Tops, Bastiaan B J; Plasterk, Ronald H A; Ketting, René F; Hannon, Gregory J (2004): „Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex“. In: *Nature*. 432 (7014), S. 231–235, DOI: 10.1038/nature03049.

Devigili, G; Tugnoli, V; Penza, P; Camozzi, F; Lombardi, R; Melli, G; Broglio, L; Granieri, E; Lauria, G (2008): „The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from

symptoms to neuropathology“. In: *Brain: A Journal of Neurology*. 131 (Pt 7), S. 1912–1925, DOI: 10.1093/brain/awn093.

Djohuri, L; Koutsikou, S; Fang, X; McMullan, S; Lawson, S N (2006): „Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 26 (4), S. 1281–1292, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3388-05.2006.

Dougherty, P M; Palecek, J; Zorn, S; Willis, W D (1993): „Combined application of excitatory amino acids and substance P produces long-lasting changes in responses of primate spinothalamic tract neurons“. In: *Brain Research. Brain Research Reviews*. 18 (2), S. 227–246.

Ducreux, D; Attal, N; Parker, F; Bouhassira, D (2006): „Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia“. In: *Brain: A Journal of Neurology*. 129 (Pt 4), S. 963–976, DOI: 10.1093/brain/awl016.

Duggan, A W (1995): „Release of neuropeptides in the spinal cord“. In: *Progress in Brain Research*. 104 , S. 197–223.

Dworkin, R H; Backonja, M; Rowbotham, M C; Allen, R R; Argoff, C R; Bennett, G J; Bushnell, M C; Farrar, J T; Galer, B S; Haythornthwaite, J A; Hewitt, D J; Loeser, J D; Max, M B; Saltarelli, M; Schmader, K E; Stein, C; Thompson, D; Turk, D C; Wallace, M S; Watkins, L R; Weinstein, S M (2003): „Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations“. In: *Archives of Neurology*. 60 (11), S. 1524–1534, DOI: 10.1001/archneur.60.11.1524.

Dworkin, R H; O’Connor, A B; Backonja, M; Farrar, J T; Finnerup, N B; Jensen, T S; Kalso, E A; Loeser, J D; Miaskowski, C; Nurmikko, T J; Portenoy, Russell K; Rice, Andrew S C; Stacey, Brett R; Treede, Rolf-Detlef; Turk, Dennis C; Wallace, Mark S (2007): „Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations“. In: *Pain*. 132 (3), S. 237–251, DOI: 10.1016/j.pain.2007.08.033.

Dyck, P J; Dyck, P J; Larson, T S; O’Brien, P C; Velosa, J A (2000): „Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve growth factor study group“. In:

Diabetes Care. 23 (4), S. 510–517.

Fields, H L; Rowbotham, M; Baron, R (1998): „Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation“. In: *Neurobiology of Disease*. 5 (4), S. 209–227, DOI: 10.1006/nbdi.1998.0204.

Fineberg, S K; Kosik, K S; Davidson, B L (2009): „MicroRNAs potentiate neural development“. In: *Neuron*. 64 (3), S. 303–309, DOI: 10.1016/j.neuron.2009.10.020.

Von Frey, M (1897): „Über den Gebrauch von Reizhaaren“. In: *I. Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz*. Leipzig: Hirzel (Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut), S. 208–217.

Genda, Y; Arai, M; Ishikawa, M; Tanaka, S; Okabe, T; Sakamoto, A (2013): „microRNA changes in the dorsal horn of the spinal cord of rats with chronic constriction injury: A TaqMan® Low Density Array study“. In: *International Journal of Molecular Medicine*. 31 (1), S. 129–137, DOI: 10.3892/ijmm.2012.1163.

Giraldez, A J; Cinalli, R M; Glasner, M E; Enright, A J; Thomson, J M; Baskerville, S; Hammond, S M; Bartel, D P; Schier, A F (2005): „MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 308 (5723), S. 833–838, DOI: 10.1126/science.1109020.

Git, A; Dvinge, H; Salmon-Divon, M; Osborne, M; Kutter, C; Hadfield, J; Bertone, P; Caldas, C (2010): „Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 16 (5), S. 991–1006, DOI: 10.1261/rna.1947110.

Greco, S J; Rameshwar, P (2007): „MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (39), S. 15484–15489, DOI: 10.1073/pnas.0703037104.

Griffin, JW (2006): „The roles of growth factors in painful length-dependent axonal neuropathies“. In: *Emerging Strategies for the Treatment of Neuropathic Pain*. Seattle: IASP Press, S. pp. 271–290. — ISBN: 0-931092-61-2

Grishok, A; Pasquinelli, A E; Conte, D; Li, N; Parrish, S; Ha, I; Baillie, D L; Fire, A; Ruvkun, G; Mello, C C (2001): „Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing“. In: *Cell*. 106 (1), S. 23–34.

Hains, B C; Klein, J P; Saab, C Y; Craner, M J; Black, J A; Waxman, S G (2003): „Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 23 (26), S. 8881–8892.

Hains, B; Saab, C; Klein, J; Craner, M; Waxman, S (2004): „Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 24 (20), S. 4832–4839, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0300-04.2004.

Hansen, T; Olsen, L; Lindow, M; Jakobsen, K D; Ullum, H; Jonsson, E; Andreassen, O A; Djurovic, S; Melle, I; Agartz, I; Hall, H; Timm, S; Wang, A G; Werge, T (2007): „Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology“. In: *PloS One*. 2 (9), S. e873, DOI: 10.1371/journal.pone.0000873.

Harris, J A; Corsi, M; Quartaroli, M; Arban, R; Bentivoglio, M (1996): „Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain“. In: *Neuroscience*. 74 (1), S. 7–12.

He, Lin; Hannon, Gregory J (2004): „MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation“. In: *Nature reviews. Genetics*. 5 (7), S. 522–531, DOI: 10.1038/nrg1379.

Hendrich, J; Van Minh, A; Hebllich, F; Nieto-Rostro, M; Watschinger, K; Striessnig, J; Wratten, J; Davies, A; Dolphin, A C (2008): „Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105 (9), S. 3628–3633, DOI: 10.1073/pnas.0708930105.

Hogan, Q (2002): „Animal pain models“. In: *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 27 (4), S. 385–401.

Hohjoh, H; Fukushima, T (2007): „Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines

hybridization signals at every step of washing“. In: *Gene*. 391 (1-2), S. 39–44, DOI: 10.1016/j.gene.2006.11.018.

Htut, M; Misra, P; Anand, P; Birch, R; Carlstedt, T (2006): „Pain phenomena and sensory recovery following brachial plexus avulsion injury and surgical repairs“. In: *Journal of Hand Surgery (Edinburgh, Scotland)*. 31 (6), S. 596–605, DOI: 10.1016/j.jhsb.2006.04.027.

Hutvagner, G; McLachlan, J; Pasquinelli, A E; Bálint, E; Tuschl, T; Zamore, P D (2001): „A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 293 (5531), S. 834–838, DOI: 10.1126/science.1062961.

Hutvagner, G; Zamore, P D (2002): „A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 297 (5589), S. 2056–2060, DOI: 10.1126/science.1073827.

IASP Taxonomy (2014): „Pain Terms“. Abgerufen am 29.01.2014 von http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions#Neuropathicpain.

Jackson, R J; Standart, N (2007): „How do microRNAs regulate gene expression?“. In: *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*. 2007 (367), S. re1, DOI: 10.1126/stke.3672007re1.

Janning, W.; Knust, E. (2008): In: *Genetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 237–243.

Jensen, T S; Baron, R; Haanpää, M; Kalso, E; Loeser, J D; Rice, A; Treede, R-D (2011): „A new definition of neuropathic pain“. In: *PAIN*. 152 (10), S. 2204–2205, DOI: 10.1016/j.pain.2011.06.017.

Jimenez-Mateos, E M; Henshall, D C (2013): „Epilepsy and microRNA“. In: *Neuroscience*. 238 , S. 218–229, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.027.

Ji, R-R; Kohno, T; Moore, K A; Woolf, C J (2003): „Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?“. In: *Trends in Neurosciences*. 26 (12), S. 696–705.

- Kahle, K; Ring, A; Lifton, R (2008): „Molecular physiology of the WNK kinases“. In: *Annual Review of Physiology*. 70 , S. 329–355, DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100651.
- Karp, X; Ambros, V (2005): „Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 310 (5752), S. 1288–1289, DOI: 10.1126/science.1121566.
- Keller, A F; Beggs, S; Salter, M W; De Koninck, Y (2007): „Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain“. In: *Molecular Pain*. 3 , S. 27, DOI: 10.1186/1744-8069-3-27.
- Ketting, R F; Fischer, S E; Bernstein, E; Sijen, T; Hannon, G J; Plasterk, R H (2001): „Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*“. In: *Genes & Development*. 15 (20), S. 2654–2659, DOI: 10.1101/gad.927801.
- Khan, G M; Chen, S-R; Pan, H-L (2002): „Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats“. In: *Neuroscience*. 114 (2), S. 291–299.
- Khvorova, A; Reynolds, A; Jayasena, S D (2003): „Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias“. In: *Cell*. 115 (2), S. 209–216.
- Kim, J; Krichevsky, A; Grad, Y; Hayes, G D; Kosik, K S; Church, G M; Ruvkun, G (2004): „Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (1), S. 360–365, DOI: 10.1073/pnas.2333854100.
- Kim, S H; Chung, J M (1992): „An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat“. In: *Pain*. 50 (3), S. 355–363.
- Klede, M; Handwerker, H O; Schmelz, M (2003): „Central origin of secondary mechanical hyperalgesia“. In: *Journal of Neurophysiology*. 90 (1), S. 353–359, DOI: 10.1152/jn.01136.2002.
- Kloosterman, W P; Plasterk, R H A (2006): „The diverse functions of microRNAs in animal development and disease“. In: *Developmental Cell*. 11 (4), S. 441–450, DOI:

10.1016/j.devcel.2006.09.009.

Klotz, L-O (2012): „Posttranscriptional regulation of connexin-43 expression“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 524 (1), S. 23–29, DOI: 10.1016/j.abb.2012.03.012.

Kohama, I; Ishikawa, K; Kocsis, J D (2000): „Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 20 (4), S. 1538–1549.

Kohno, T; Ji, R-R; Ito, N; Allchorne, A J; Befort, K; Karchewski, L A; Woolf, C J (2005): „Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord“. In: *Pain*. 117 (1-2), S. 77–87, DOI: 10.1016/j.pain.2005.05.035.

Koltzenburg, M; Torebjörk, H E; Wahren, L K (1994): „Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain“. In: *Brain: A Journal of Neurology*. 117 (Pt 3), S. 579–591.

Kress, M; Hüttenhofer, A; Landry, M; Kuner, R; Favereaux, A; Greenberg, D; Bednarik, J; Heppenstall, P; Kronenberg, F; Malcangio, M; Rittner, H; Uçeyler, N; Trajanoski, Z; Mouritzen, P; Birklein, F; Sommer, C; Soreq, H (2013): „microRNAs in nociceptive circuits as predictors of future clinical applications“. In: *Frontiers in molecular neuroscience*. 6 , S. 33, DOI: 10.3389/fnmol.2013.00033.

Kusuda, R; Cadetti, F; Ravanelli, M I; Sousa, T A; Zanon, S; De Lucca, F L; Lucas, G (2011): „Differential expression of microRNAs in mouse pain models“. In: *Molecular Pain*. 7 , S. 17, DOI: 10.1186/1744-8069-7-17.

Kye, M-J; Liu, T; Levy, S F; Xu, N L; Groves, B B; Bonneau, R; Lao, K; Kosik, K S (2007): „Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 13 (8), S. 1224–1234, DOI: 10.1261/rna.480407.

LaBuda, C J; Little, P J (2005): „Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat“. In: *Journal of Neuroscience Methods*. 144 (2), S. 175–181, DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.11.008.

Lagos-Quintana, M; Rauhut, R; Lendeckel, W; Tuschl, T (2001): „Identification of novel genes coding for small expressed RNAs“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 294 (5543), S. 853–858, DOI: 10.1126/science.1064921.

Lagos-Quintana, M; Rauhut, R; Yalcin, A; Meyer, J; Lendeckel, W; Tuschl, T (2002): „Identification of tissue-specific microRNAs from mouse“. In: *Current Biology: CB*. 12 (9), S. 735–739.

LaMotte, R H; Shain, C N; Simone, D A; Tsai, E F (1991): „Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms“. In: *Journal of Neurophysiology*. 66 (1), S. 190–211.

Latremoliere, A; Woolf, C J (2009): „Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity“. In: *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*. 10 (9), S. 895–926, DOI: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.

Lee, R C; Feinbaum, R L; Ambros, V (1993): „The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*“. In: *Cell*. 75 (5), S. 843–854.

Lee, Y; Ahn, C; Han, J; Choi, H; Kim, J; Yim, J; Lee, J; Provost, P; Rådmark, O; Kim, S; Kim, V N (2003): „The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing“. In: *Nature*. 425 (6956), S. 415–419, DOI: 10.1038/nature01957.

Li, C-Y; Song, Y-H; Higuera, E S; Luo, Z D (2004): „Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 24 (39), S. 8494–8499, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2982-04.2004.

Li, Haixia; Shen, Le; Ma, Chao; Huang, Yuguang (2013): „Differential expression of miRNAs in the nervous system of a rat model of bilateral sciatic nerve chronic constriction injury“. In: *International journal of molecular medicine*. 32 (1), S. 219–226, DOI: 10.3892/ijmm.2013.1381.

Lim, L P; Lau, N C; Garrett-Engele, P; Grimson, A; Schelter, J M; Castle, J; Bartel, D P; Linsley, P S; Johnson, J M (2005): „Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs“. In: *Nature*. 433 (7027),

S. 769–773, DOI: 10.1038/nature03315.

Liu, G; Keeler, B E; Zhukareva, V; Houlé, J D (2010): „Cycling exercise affects the expression of apoptosis-associated microRNAs after spinal cord injury in rats“. In: *Experimental Neurology*. 226 (1), S. 200–206, DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.08.032.

Liu, N-K; Wang, X-F; Lu, Q-B; Xu, X-M (2009): „Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury“. In: *Experimental Neurology*. 219 (2), S. 424–429, DOI: 10.1016/j.expneurol.2009.06.015.

Livak, K J; Flood, S J; Marmaro, J; Giusti, W; Deetz, K (1995): „Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization“. In: *PCR Methods and Applications*. 4 (6), S. 357–362.

Lund, E; Güttinger, S; Calado, A; Dahlberg, J E; Kutay, U (2004): „Nuclear export of microRNA precursors“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 303 (5654), S. 95–98, DOI: 10.1126/science.1090599.

Lu, Y; Perl, E R (2005): „Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II)“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 25 (15), S. 3900–3907, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0102-05.2005.

Magerl, W; Wilk, S H; Treede, R D (1998): „Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans“. In: *Pain*. 74 (2-3), S. 257–268.

Makeyev, Eugene V; Zhang, Jiangwen; Carrasco, Monica A; Maniatis, Tom (2007): „The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing“. In: *Molecular cell*. 27 (3), S. 435–448, DOI: 10.1016/j.molcel.2007.07.015.

May, A (2008): „Chronic pain may change the structure of the brain“. In: *Pain*. 137 (1), S. 7–15, DOI: 10.1016/j.pain.2008.02.034.

Merskey, H; Bogduk, N (1994): *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. Seattle: IASP Press. — ISBN: 0-931092-

05-1

Mirauccourt, L S; Dallel, R; Voisin, D L L (2007): „Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKCgamma interneurons“. In: *PloS One*. 2 (11), S. e1116, DOI: 10.1371/journal.pone.0001116.

Mishima, T; Mizuguchi, Y; Kawahigashi, Y; Takizawa, T; Takizawa, T (2007): „RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS“. In: *Brain Research*. 1131 (1), S. 37–43, DOI: 10.1016/j.brainres.2006.11.035.

Miska, E A; Alvarez-Saavedra, E; Townsend, M; Yoshii, Akira; Sestan, N; Rakic, P; Constantine-Paton, M; Horvitz, H R (2004): „Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain“. In: *Genome Biology*. 5 (9), S. R68, DOI: 10.1186/gb-2004-5-9-r68.

Moore, K A; Kohno, T; Karchewski, L A; Scholz, J; Baba, H; Woolf, C J (2002): „Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 22 (15), S. 6724–6731, DOI: 20026611.

Moss, A; Beggs, S; Vega-Avelaira, D; Costigan, M; Hathway, G J; Salter, M W; Fitzgerald, M (2007): „Spinal microglia and neuropathic pain in young rats“. In: *Pain*. 128 (3), S. 215–224, DOI: 10.1016/j.pain.2006.09.018.

Nakahara, K; Carthew, R W (2004): „Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation“. In: *Current Opinion in Cell Biology*. 16 (2), S. 127–133, DOI: 10.1016/j.ceb.2004.02.006.

Nakanishi, K; Nakasa, T; Tanaka, N; Ishikawa, M; Yamada, K; Yamasaki, K; Kamei, N; Izumi, B; Adachi, N; Miyaki, S; Asahara, H; Ochi, M (2010): „Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice“. In: *Spinal Cord*. 48 (3), S. 192–196, DOI: 10.1038/sc.2009.89.

Nassar, M A; Baker, M D; Levato, A; Ingram, R; Mallucci, G; McMahon, S B; Wood, J N (2006): „Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice“. In: *Molecular Pain*. 2 , S. 33, DOI: 10.1186/1744-8069-2-33.

- Nelson, P T; Hatzigeorgiou, A; Mourelatos, Z (2004): „miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 10 (3), S. 387–394.
- Nelson, P T; Keller, J N (2007): „RNA in brain disease: no longer just „the messenger in the middle““. In: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 66 (6), S. 461–468, DOI: 10.1097/01.jnen.0000240474.27791.f3.
- Niederberger, E; Kynast, K; Lötsch, J; Geisslinger, G (2011): „MicroRNAs as new players in the pain game“. In: *Pain*. 152 (7), S. 1455–1458, DOI: 10.1016/j.pain.2011.01.042.
- Niv, D; Maltzman-Tseikhin, A (2005): „Postherpetic neuralgia: the never-ending challenge“. In: *Pain Practice: The Official Journal of World Institute of Pain*. 5 (4), S. 327–340, DOI: 10.1111/j.1533-2500.2005.00035.x.
- Noguchi, K; Dubner, R; De Leon, M; Senba, E; Ruda, M A (1994): „Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a subpopulation of dorsal root ganglion neurons“. In: *Journal of Neuroscience Research*. 37 (5), S. 596–603, DOI: 10.1002/jnr.490370506.
- Obata, K; Yamanaka, H; Fukuoka, T; Yi, D; Tokunaga, A; Hashimoto, N; Yoshikawa, H; Noguchi, K (2003): „Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats“. In: *Pain*. 101 (1-2), S. 65–77.
- Oh, HS; Seo, WS (2015): „A Comprehensive Review of Central Post-Stroke Pain“. In: *Pain Management Nursing: Official Journal of the American Society of Pain Management Nurses.*, DOI: 10.1016/j.pmn.2015.03.002.
- Okamoto, M; Baba, H; Goldstein, P A; Higashi, H; Shimoji, K; Yoshimura, M (2001): „Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury“. In: *The Journal of Physiology*. 532 (Pt 1), S. 241–250.
- Perkins, D O; Jeffries, C D; Jarskog, L F; Thomson, J M; Woods, K; Newman, M; Parker, J; Jin, J; Hammond, S M (2007): „microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder“. In: *Genome Biology*. 8 (2), S. R27, DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r27.

- Pfaffl, M. W. (2004): „Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung“. In: *BIOSpektrum*. 10 (Sonderausgabe PCR), S. 92–95.
- Pfaffl, M W; Horgan, G W; Dempfle, L (2002): „Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR“. In: *Nucleic Acids Research*. 30 (9), S. e36.
- Pillai, R S; Bhattacharyya, S; Filipowicz, W (2007): „Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?“. In: *Trends in Cell Biology*. 17 (3), S. 118–126, DOI: 10.1016/j.tcb.2006.12.007.
- Poh, K-W; Yeo, J-F; Ong, W-Y (2011): „MicroRNA changes in the mouse prefrontal cortex after inflammatory pain“. In: *European Journal of Pain (London, England)*. 15 (8), S. 801.e1–12, DOI: 10.1016/j.ejpain.2011.02.002.
- Polgár, E; Hughes, D I; Arham, A Z; Todd, A J (2005): „Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 25 (28), S. 6658–6666, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1490-05.2005.
- Rahman, W; D’Mello, R; Dickenson, A H (2008): „Peripheral nerve injury-induced changes in spinal alpha(2)-adrenoceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses“. In: *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*. 9 (4), S. 350–359, DOI: 10.1016/j.jpain.2007.11.010.
- Roush, S; Slack, F J (2008): „The let-7 family of microRNAs“. In: *Trends in Cell Biology*. 18 (10), S. 505–516, DOI: 10.1016/j.tcb.2008.07.007.
- Rowbotham, M C; Fields, H L (1996): „The relationship of pain, allodynia and thermal sensation in post-herpetic neuralgia“. In: *Brain: A Journal of Neurology*. 119 (Pt 2), S. 347–354.
- Saab, C Y; Waxman, S G; Hains, B C (2008): „Alarm or curse? The pain of neuroinflammation“. In: *Brain Research Reviews*. 58 (1), S. 226–235, DOI: 10.1016/j.brainresrev.2008.04.002.
- Saeed, A I; Sharov, V; White, J; Li, J; Liang, W; Bhagabati, N; Braisted, J; Klapa, M;

Currier, T; Thiagarajan, M; Sturn, A; Snuffin, M; Rezantsev, A; Popov, D; Ryltsov, A; Kostukovich, E; Borisovsky, I; Liu, Z; Vinsavich, A; Trush, V; Quackenbush, J (2003): „TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis“. In: *BioTechniques*. 34 (2), S. 374–378.

Saegusa, H; Kurihara, T; Zong, S; Kazuno, A; Matsuda, Y; Nonaka, T; Han, W; Toriyama, H; Tanabe, T (2001): „Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel“. In: *The EMBO Journal*. 20 (10), S. 2349–2356, DOI: 10.1093/emboj/20.10.2349.

Sakai, Atsushi; Saitow, Fumihito; Miyake, Noriko; Miyake, Koichi; Shimada, Takashi; Suzuki, Hidenori (2013): „miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability“. In: *Brain: a journal of neurology*. 136 (Pt 9), S. 2738–2750, DOI: 10.1093/brain/awt191.

Saugstad, Julie A (2010): „MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration“. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 30 (9), S. 1564–1576, DOI: 10.1038/jcbfm.2010.101.

Von Schack, D; Agostino, M J; Murray, B S; Li, Y; Reddy, P S; Chen, J; Choe, S E; Strassle, B W; Li, C; Bates, B; Zhang, L; Hu, H; Kotnis, S; Bingham, J D; Liu, Wei; Whiteside, Garth T; Samad, Tarek A; Kennedy, Jeffrey D; Ajit, S K (2011): „Dynamic changes in the microRNA expression profile reveal multiple regulatory mechanisms in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain“. In: *PloS One*. 6 (3), S. e17670, DOI: 10.1371/journal.pone.0017670.

Schaefer, A; O’Carroll, D; Tan, C L; Hillman, D; Sugimori, M; Llinas, R; Greengard, P (2007): „Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs“. In: *The Journal of Experimental Medicine*. 204 (7), S. 1553–1558, DOI: 10.1084/jem.20070823.

Schäfers, M; Lee, D H; Brors, D; Yaksh, T L; Sorkin, L S (2003): „Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 23 (7), S. 3028–3038.

Scholz, J; Broom, D C; Youn, D-H; Mills, C D; Kohno, T; Suter, M R; Moore, K A;

- Decosterd, I; Coggeshall, R E; Woolf, C J (2005): „Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 25 (32), S. 7317–7323, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1526-05.2005.
- Scholz, J; Woolf, C J (2007): „The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia“. In: *Nature Neuroscience*. 10 (11), S. 1361–1368, DOI: 10.1038/nn1992.
- Schopman, N; Heynen, S; Haasnoot, J; Berkhout, B (2010): „A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA“. In: *RNA biology*. 7 (5), S. 573–576, DOI: 10.4161/rna.7.4.13141.
- Schratt, G (2009): „microRNAs at the synapse“. In: *Nature Reviews. Neuroscience*. 10 (12), S. 842–849, DOI: 10.1038/nrn2763.
- Schratt, G M; Tübing, F; Nigh, E A; Kane, C G; Sabatini, M E; Kiebler, M; Greenberg, M E (2006): „A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development“. In: *Nature*. 439 (7074), S. 283–289, DOI: 10.1038/nature04367.
- Schwarz, D S; Hutvagner, G; Du, T; Xu, Z; Aronin, N; Zamore, P D (2003): „Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex“. In: *Cell*. 115 (2), S. 199–208.
- Seltzer, Z; Dubner, R; Shir, Y (1990): „A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury“. In: *Pain*. 43 (2), S. 205–218.
- Sheets, P L; Heers, C; Stoehr, T; Cummins, T R (2008): „Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine“. In: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 326 (1), S. 89–99, DOI: 10.1124/jpet.107.133413.
- Shi, G; Shi, J; Liu, K; Liu, N; Wang, Y; Fu, Z; Ding, J; Jia, L; Yuan, W (2013): „Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury“. In: *Glia*. 61 (4), S. 504–512, DOI: 10.1002/glia.22451.
- Da Silva, A; Pieniazek, N (2003): „Latest Advances and Trends in PCR-based

Diagnostic Methods“. In: *Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS*. Springer, S. pp. 397–412.

Singh, S K; Pal Bhadra, M; Girschick, H J; Bhadra, U (2008): „MicroRNAs--micro in size but macro in function“. In: *The FEBS Journal*. 275 (20), S. 4929–4944, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06624.x.

Smirnova, L; Gräfe, A; Seiler, A; Schumacher, S; Nitsch, R; Wulczyn, F G (2005): „Regulation of miRNA expression during neural cell specification“. In: *The European Journal of Neuroscience*. 21 (6), S. 1469–1477, DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x.

Soares, S; von Boxberg, Y; Lombard, M-C; Ravaille-Veron, M; Fischer, I; Eyer, J; Nothias, F (2002): „Phosphorylated MAP1B is induced in central sprouting of primary afferents in response to peripheral injury but not in response to rhizotomy“. In: *The European Journal of Neuroscience*. 16 (4), S. 593–606.

Song, J-J; Smith, S K; Hannon, G J; Joshua-Tor, L (2004): „Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 305 (5689), S. 1434–1437, DOI: 10.1126/science.1102514.

Standart, N; Jackson, R J (2007): „MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation“. In: *Genes & Development*. 21 (16), S. 1975–1982, DOI: 10.1101/gad.1591507.

Suter, M R; Wen, Y-R; Decosterd, I; Ji, R-R (2007): „Do glial cells control pain?“. In: *Neuron Glia Biology*. 3 (3), S. 255–268, DOI: 10.1017/S1740925X08000100.

Sutton, M A; Schuman, E M (2006): „Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory“. In: *Cell*. 127 (1), S. 49–58, DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.014.

Tandrup, T; Woolf, C J; Coggeshall, R E (2000): „Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve“. In: *The Journal of Comparative Neurology*. 422 (2), S. 172–180.

Tang, X; Gal, J; Zhuang, X; Wang, W; Zhu, H; Tang, G (2007): „A simple array platform for microRNA analysis and its application in mouse tissues“. In: *RNA (New York, N.Y.)*. 13 (10), S. 1803–1822, DOI: 10.1261/rna.498607.

Thompson, S W; Woolf, C J; Sivilotti, L G (1993): „Small-caliber afferent inputs produce a heterosynaptic facilitation of the synaptic responses evoked by primary afferent A-fibers in the neonatal rat spinal cord in vitro“. In: *Journal of Neurophysiology*. 69 (6), S. 2116–2128.

Torrance, N; Smith, B H; Bennett, M I; Lee, A J (2006): „The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey“. In: *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*. 7 (4), S. 281–289, DOI: 10.1016/j.jpain.2005.11.008.

Torsney, C; MacDermott, A B (2006): „Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 26 (6), S. 1833–1843, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4584-05.2006.

Treede, R-D; Jensen, T S; Campbell, J N; Cruccu, G; Dostrovsky, J O; Griffin, J W; Hansson, P; Hughes, R; Nurmikko, T; Serra, J (2008): „Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes“. In: *Neurology*. 70 (18), S. 1630–1635, DOI: 10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59.

Varendi, K; Kumar, A; Härma, M-A; Andressoo, J-O (2014): „miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF“. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 71 (22), S. 4443–4456, DOI: 10.1007/s00018-014-1628-x.

Vera-Portocarrero, L P; Zhang, E-T; Ossipov, M H; Xie, J Y; King, T; Lai, J; Porreca, F (2006): „Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization“. In: *Neuroscience*. 140 (4), S. 1311–1320, DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.03.016.

Vo, N K; Cambronne, X A; Goodman, R H (2010): „MicroRNA pathways in neural development and plasticity“. In: *Current Opinion in Neurobiology*. 20 (4), S. 457–465, DOI: 10.1016/j.conb.2010.04.002.

Wall, P D; Gutnick, M (1974): „Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma“. In: *Nature*. 248 (5451), S. 740–743.

Wang, Y; Stricker, H M; Gou, D; Liu, L (2007): „MicroRNA: past and present“. In: *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 12 , S. 2316–2329.

Watanabe, K; Konno, S; Sekiguchi, M; Sasaki, N; Honda, T; Kikuchi, S (2007): „Increase of 200-kDa neurofilament-immunoreactive afferents in the substantia gelatinosa in allodynic rats induced by compression of the dorsal root ganglion“. In: *Spine*. 32 (12), S. 1265–1271, DOI: 10.1097/BRS.0b013e318059aef8.

Wienholds, E; Kloosterman, W P; Miska, E; Alvarez-Saavedra, E; Berezikov, E; de Bruijn, E; Horvitz, H R; Kauppinen, S; Plasterk, R H A (2005): „MicroRNA expression in zebrafish embryonic development“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 309 (5732), S. 310–311, DOI: 10.1126/science.1114519.

Wightman, B; Ha, I; Ruvkun, G (1993): „Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*“. In: *Cell*. 75 (5), S. 855–862.

Witting, N; Kupers, R C; Svensson, P; Jensen, T S (2006): „A PET activation study of brush-evoked allodynia in patients with nerve injury pain“. In: *Pain*. 120 (1-2), S. 145–154, DOI: 10.1016/j.pain.2005.10.034.

Woolf, C J; Shortland, P; Coggeshall, R E (1992): „Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents“. In: *Nature*. 355 (6355), S. 75–78, DOI: 10.1038/355075a0.

Woolf, C J; Thompson, S W; King, A E (1988): „Prolonged primary afferent induced alterations in dorsal horn neurones, an intracellular analysis in vivo and in vitro“. In: *Journal De Physiologie*. 83 (3), S. 255–266.

Wu, G; Ringkamp, M; Hartke, T V; Murinson, B B; Campbell, J N; Griffin, J W; Meyer, R A (2001): „Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 21 (8), S. RC140.

Wu, G; Ringkamp, M; Murinson, B B; Pogatzki, E M; Hartke, T V; Weerahandi, H M; Campbell, J N; Griffin, J W; Meyer, R A (2002): „Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 22 (17), S. 7746–7753.

Yang, L; Zhang, F-X; Huang, F; Lu, Y-J; Li, G-D; Bao, L; Xiao, H-S; Zhang, X (2004):

„Peripheral nerve injury induces trans-synaptic modification of channels, receptors and signal pathways in rat dorsal spinal cord“. In: *The European Journal of Neuroscience*. 19 (4), S. 871–883.

Yekta, S; Shih, I-H; Bartel, D P (2004): „MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA“. In: *Science (New York, N.Y.)*. 304 (5670), S. 594–596, DOI: 10.1126/science.1097434.

Yoshimura, M; Yonehara, N (2006): „Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain“. In: *Neuroscience Research*. 56 (1), S. 21–28, DOI: 10.1016/j.neures.2006.04.015.

Zhang, H-Y; Zheng, S-H; Zhao, J-H; Zhao, W; Zheng, L-F; Zhao, D; Li, J-M; Zhang, X-F; Chen, Z-B; Yi, X-N (2011): „MicroRNAs 144, 145, and 214 are down-regulated in primary neurons responding to sciatic nerve transection“. In: *Brain Research*. 1383 , S. 62–70, DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.067.

Zhao, J; Lee, M-C; Momin, A; Cendan, C-M; Shepherd, S T; Baker, M D; Asante, C; Bee, L; Bethry, A; Perkins, J R; Nassar, M A; Abrahamsen, B; Dickenson, A; Cobb, B S; Merckenschlager, M; Wood, J N (2010): „Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and pain thresholds“. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 30 (32), S. 10860–10871, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1980-10.2010.

Zou, Q; Mao, Y; Hu, L; Wu, Y; Ji, Z (2014): „miRClassify: an advanced web server for miRNA family classification and annotation“. In: *Computers in Biology and Medicine*. 45 , S. 157–160, DOI: 10.1016/j.combiomed.2013.12.007.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Inge Bauer, Herrn PD Dr. Henning Hermanns und Herrn Dr. Timo Brandenburger für die Überlassung des Themas der Arbeit.

Frau Prof Dr. Inge Bauer danke ich für die stetige Unterstützung und Beratung vom ersten Tag an, vor allem aber in der Endphase des Promotionsvorhabens.

Ein ebenso großes Dankeschön gebührt Herrn Dr. Timo Brandenburger, der mir stets mit Rat und Tat beiseite stand, sei es bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen, bei der Auswertung der Ergebnisse und während des Schreibprozesses. Danke für die gute Betreuung und die Beantwortung unzähliger Fragen.

Herrn Prof. Aktas danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Henning Hermanns für die Betreuung sowie Frau Dr. Franziska Barthel und Frau Andrea Urban für die Durchführung des tierexperimentellen Teils. Herrn Dr. Mirco Castoldi danke ich für die Durchführung und Auswertung der miChip-Arrays.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Anästhesiologie und des Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des BMFZ sowie den weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Ich danke meinem Freund, der mich mit seinem unerschütterlichen Optimismus stets motiviert und unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich noch ganz besonders meinen Eltern und meiner Familie danken für die umfassende Unterstützung vom ersten Tag des Medizinstudiums an. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

22.11.2016, Maike Brendel