Aus der Klinik für Anästhesiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Differentielle Expression von microRNAs im Spinalganglion in einem chronisch neuropathischen Schmerzmodell der Ratte und Untersuchung einer Interaktion zwischen der microRNA-let-7c und dem *Nerve Growth Factor*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Victoria Valeria Prassek

(2017)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker
Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. I. Bauer
Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. O. Aktas

Meinen Eltern

Förderung

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

Auflistung der Publikationen

Victoria Prassek, Franziska Barthel, Inge Bauer, Lukas Schlösser, Henning Hermanns, Timo Brandenburger: „Differentielle Expression von microRNAs im Spinalganglion in einem chronisch neuropathischen Schmerzmodell der Ratte“. (Postervortrag beim Deutschen Anästhesiekongress 2012 in Leipzig).

Zusammenfassung

Neuropathische Schmerzen entstehen durch eine primäre Läsion oder Dysfunktion des somatosensorischen Nervensystems. Hierbei spielen Veränderungen auf Ebene der Genexpression eine wichtige Rolle. Die dazu führenden molekularen Prozesse sind noch nicht vollständig verstanden. Die Therapie neuropathischer Schmerzen mit den bisher verfügbaren Medikamenten ist unzureichend, sodass diese Patientengruppe an einer stark reduzierten Lebensqualität leidet. MiRNAs sind 21-25 Nucleotide lange, nicht-codierende RNAs, die über Repression oder Degradation von mRNAs den Proteingehalt negativ beeinflussen. Als Regulatoren der Genexpression wirken sie sich auf verschiedene physiologische und pathologische Vorgänge aus. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss dieser genregulatorischen Wirkung von miRNAs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen zu untersuchen. Daraus könnten sich neue Therapieansätze bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen ergeben. Hierzu wurde bei männlichen Wistar-Ratten über das *Chronic-Constriction-Injury*-Modell (CCI) ein Zustand der Neuropathie hervorgerufen. Dabei wurde in der Untersuchungsgruppe der *N. ischiadicus* freigelegt und ligiert (CCI). In der Kontrollgruppe wurde der Nerv freigelegt, aber nicht weiter modifiziert. Mithilfe eines Microarray wurde die differentielle Expression von miRNAs zu den vier Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage nach CCI- bzw. Scheinoperation in den zum Ischiasnerv gehörenden Spinalganglien untersucht. Dabei zeigte sich eine differentielle Expression von 47 miRNAs zum Zeitpunkt 4 Stunden, 3 miRNAs nach einem Tag, 26 miRNAs nach 6 Tagen sowie 27 miRNAs am 12. Tag nach Induktion der CCI. Es gab keine miRNA, die zu allen vier Untersuchungszeitpunkten differentiell exprimiert wurde. Die miRNA-let-7c zeigte im Ergebnis des Arrays in der Untersuchungsgruppe eine verminderte Expression nach 4 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis konnte in der quantitativen Real-Time PCR bestätigt werden. Die bioinformatische Analyse der möglichen mRNA-Interaktionspartner der miRNA-let-7c ergab u.a. die *3´Untranslated Region* (3´UTR) der mRNA des *Nerve Growth Factor* (NGF), einem bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligten Neurotrophin. Die Untersuchung der relativen Expression der mRNA des NGF mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR zu den o.g. Untersuchungszeitpunkten ergab einen signifikanten Anstieg am Tag 1 und 12 nach CCI-Induktion. Eine mögliche Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und der 3´UTR der mRNA des NGF wurde mittels Transfektion und Luciferase Assay untersucht. Hierzu wurden für let-7c und NGF kodierende Plasmide synthetisiert und über Transfektion in HEK 293 Zellen eingebracht. Im Luciferase Assay konnte keine Interaktion zwischen der 3´UTR der mRNA des NGF und der miRNA-let-7c nachgewiesen werden. Die Induktion neuropathischer Schmerzen durch CCI führt zu einer differentiellen Expression von miRNAs im Spinalganglion der Ratte. Die miRNA-let-7c gehört zu den differentiell exprimierten miRNAs am Untersuchungszeitpunkt 4 Stunden und entfaltet womöglich ihre genregulatorische Funktion in der frühen Entstehungsphase neuropathischer Schmerzen. Die bioinformatisch ermittelte Ziel-mRNA des NGF zeigte dabei am Tag 1 und 12 nach CCI-Intervention eine signifikante Zunahme, was für eine Beteiligung des NGF bei neuropathischen Schmerzen spricht. Im Luciferase Assay konnte keine Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und der NGF-mRNA gezeigt werden. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um den regulatorischen Effekt von miRNAs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen nachzuweisen.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	Mikro-
3´UTR	*3´Untranslated Region*
Abb.	Abbildung
AMPA	*α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid*
ANOVA	*Analysis of variance*
BMFZ	Biologisch Medizinisches Forschungszentrum
CCI	*Chronic Constriction Injury*
cDNA	*Complementary DNA*/komplementäre DNA
cRNA	*Coding RNA*/kodierende RNA
d	Tag
DNA	*Desoxyribonucleic Acid*/Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s²)
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HEK	*Human Embryonic Kidney*
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MCS	*Multiple Cloning Site*
min	Minute(n)
miRISC	*microRNA-induced silencing complex*
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mRNA	*messenger RNA*
n	Nano-
N.	*Nervus*
NGF	*Nerve-Growth-Factor*
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
PCR	*Polymerase-Chain-Reaction*/Polymerase-Kettenreaktion
Pre-miRNA	*Precursor microRNA*
Pri-miRNA	*Primary microRNA*
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
Ran-GTP	*Ras-Related Nuclear Protein-Guanosintriphosphat*
rcf	*Relative Centrifugal Force*
RIN	*RNA-Integrity Number*
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RLB	*Reporter Lysis Buffer*
RM	Rückenmark
RNA	*Ribonucleic Acid*/Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	*Revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	*Reverse Transkiptase-Polymerase-Chain-Reaction*
SCI	*Spinal Cord Injury*
sek	Sekunde(n)
siRNA	*Small interfering RNA*
SNL	*Spinal Nerve Ligation*
TLR	*Toll-like Receptor*
TRPA1	*Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily A, Member 1*
TRPV1	*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*
TU	*Transcription Unit*/Transkriptionseinheit
U	*Unit(s)* (Enzymeinheit)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl-β-D-Galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Definition des Begriffes „Schmerz“ 1
1.2 Neuropathische Schmerzen – Definition und klinisches Bild 1
1.3 Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen 3
1.3.1 Periphere Sensibilisierung: Veränderung der membranösen Beschaffenheit im peripheren Nervensystem infolge einer Nervenläsion 3
1.3.2 Periphere Sensibilisierung: Die Rolle des Immunsystems bei neuropathischen Schmerzen 4
1.3.3 Zentrale Sensibilisierung 5
1.4 Pharmakologische Therapie neuropathischer Schmerzen 6
1.5 Der *Nerve-Growth-Factor* (NGF) und neuropathische Schmerzen 8
1.6 MicroRNAs (miRNAs) 9
1.6.1 Grundlagen, Biogenese, Einflussnahme auf die Genexpression 9
1.6.2 MiRNAs im Kontext der Schmerzentstehung 11
1.7 Fragestellung der Arbeit 13
2 Material und Methoden 14
2.1 Material 14
2.1.1 Geräte 14
2.1.2 Chemikalien 14
2.1.3 Verwendete Enzyme 17
2.1.4 Bakterienkultur 17
2.1.5 Zellkultur 17
2.1.6 Kits 17
2.1.7 Verbrauchsmaterialien 18
2.1.8 Oligonukleotide 18
2.1.9 Plasmide 19
2.1.10 Bakterienstämme 19
2.1.11 Zelllinien 19
2.1.12 Analyseprogramme und im Internet genutzte Datenbanken 19
2.2 Methoden 20
2.2.1 Gewinnung des Gewebematerials 20
2.2.2 RNA Isolierung mit Trizol 21
2.2.3 Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration 22

2.2.4 miRNA Microarray 22
2.2.5 Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese) im Rahmen der Real-Time PCR zur Untersuchung der miRNA Expression 23
2.2.6 Die quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) zur Untersuchung der miRNA Expression 24
2.2.7 Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese) im Rahmen der Real-Time PCR zur Quantifizierung von mRNA 27
2.2.8 Real-Time PCR zur Untersuchung der mRNA Expression 27
2.2.9 Primer zur Synthese der einzuklonierenden Sequenz der miRNA-let-7c 28
2.2.10 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) im Rahmen der konventionellen PCR 28
2.2.11 Amplifizierung der miRNA-let-7c Sequenz aus den untersuchten Spinalganglien mithilfe der konventionellen PCR 29
2.2.12 Gelelektrophorese der PCR Produkte 30
2.2.13 Oligonuklotide für die Herstellung einer Klonierungssequenz für den NGF 31
2.2.14 Herstellung des NGF-*Inserts f*ür die Klonierung 32
2.2.15 Isolierung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel 33
2.2.16 Klonierung mit dem pGEM®-T Easy Vektor (Promega) 34
2.2.17 Herstellung kompetenter Zellen aus einem *Escherichia coli* (*E.coli*) XL1-blauen Bakterienstamm nach der Calciumchloridmethode ($CaCl_2$ – Methode) 36
2.2.18 Transformation von *E. coli* XL1-blauen kompetenten Zellen mit dem pGEM®-T Easy Vektor 37
2.2.19 Präparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Minikultur (Minipräp) mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen 38
2.2.20 Sequenzierung der Vektoren 38
2.2.21 Restriktionsverdau des pGEM®-T Easy Vektor 38
2.2.22 Klonieren von DNA-Fragmenten in den pcDNA und pMIR-REPORT Vektor 39
2.2.23 Transformation von *E.coli* XL1-blauen kompetenten Zellen mit dem pcDNA™3.1(+) Vektor und dem pMIR-REPORT System 42
2.2.24 Plasmidpräparation aus einer Bakterien-Maxikultur (Maxiprep) 42
2.2.25 Transfektion von HEK 293 Zellen mithilfe von Calciumphosphat 43
2.2.26 Luciferase Assay 45

2.2.27 β-Galaktosidase Assay 46
2.2.28 Statistik 47
3 Ergebnisse 49
3.1 miRNA Microarray 49
3.2 Relative Expression der miRNA-let-7c 50
3.3 TargetScan 52
3.4 Relative Expression des NGF 52
3.5 Plasmidsequenzierungen 53
3.6 Luciferase Assay 55
4 Diskussion 56
4.1 Methodik 57
4.2 Ergebnisse 60
4.3 Schlussfolgerungen 68
5 Literaturverzeichnis 70
6 Anhang 78
6.1 Ergebnis des miRNA Microarrays 78

1 Einleitung

1.1 Definition des Begriffes „Schmerz“

Die *International Association for the Study of Pain* (IASP) definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, welches mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung einhergeht oder mit Begriffen eines solchen schädigenden Umstands beschrieben wird“ [1].
Schmerz als klinisches Phänomen kann eine akute oder chronische Verlaufsform annehmen.

Akute Schmerzen besitzen eine biologisch sinnvolle Warnfunktion [2]. Sie signalisieren dem Körper, dass eine Schädigung droht oder bereits vorliegt [3]. Akute Schmerzen können daher zur Meidung eines schädigenden Einflusses auf den Körper führen und somit die körperliche Integrität aufrechterhalten [4].

Im Gegensatz zu akuten Schmerzen sind chronische Schmerzen nicht mehr als physiologisches Warnsystem zu verstehen. Sie haben diese Funktion verloren und sind als eigenständige Erkrankung im klinischen Alltag vorzufinden [5].

Der neuropathische Schmerz ist eine häufige Ursache für chronische Schmerzen [6]. Diese Studie soll einen Beitrag zur Aufklärung weiterer molekularer Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen leisten, aus denen sich u.U. neue Therapieansätze ableiten lassen.

1.2 Neuropathische Schmerzen – Definition und klinisches Bild

Neuropathische Schmerzen werden von der IASP definiert als „eine Schmerzentität, die durch eine Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems entsteht“. Verschiedene pathologische Veränderungen im Bereich des peripheren wie auch zentralen Nervensystems tragen zur Entstehung neuropathischer Schmerzen bei. Die Ursachen für die Entwicklung eines neuropathischen Schmerzsyndroms sind vielfältig. So können Erkrankungen wie Diabetes mellitus, *Acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS), Amyloidose, Multiples Myelom oder eine Schilddrüsenunterfunktion Ursachen für die Entstehung neuropathischer Schmerzen sein [7]. Darüber hinaus können

Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie die Multiple Sklerose oder das Parkinson-Syndrom Auslöser einer Neuropathie sein. Patienten, die eine Chemotherapie erhalten oder mit Medikamenten wie z.B. Cyclosporin, Phenytoin, Metronidazol oder Thalidomid behandelt werden, können über toxische Effekte dieser Substanzen ebenfalls eine Polyneuropathie entwickeln [7].

Die klinischen Ausprägungen neuropathischer Schmerzen lassen sich in eine Positiv- und Negativsymptomatik einteilen [3]. Zu den Positivsymptomen zählen Parästhesien („nichtschmerzhafte anhaltende kribbelnde Empfindung (Ameisenlaufen)“ [7]), Hyperalgesien (gesteigerte Antwort auf einen schmerzhaften Reiz, auch als Kälte- und Hitzehyperalgesie möglich: „Normalerweise nicht schmerzhafter Kalt-/Warmreiz auf der Haut löst Schmerz aus“ [7]), spontan einschießende Schmerzen („elektrisierende Schocks von Sekunden Dauer“ [7]), oberflächliche Dauerschmerzen („schmerzhafte, anhaltende Empfindung, oft brennend“ [7]), sowie die Allodynie. Im Rahmen einer Allodynie empfinden Patienten stärkste Schmerzen bei einem Reiz, der von Gesunden als nicht schmerzhaft wahrgenommen wird [8]. So kann z.B. das Anziehen und das damit verbundene Anliegen von Kleidung auf der Haut quälende Schmerzen auslösen [5]. Negativsymptome sind dagegen durch ein Defizit bei der Wahrnehmung sensorischer Phänomene gekennzeichnet [3]. Die Hypästhesie (verminderte Wahrnehmung nicht schmerzhafter Reize), Pallhypästhesie (Schwelle für die Empfindung von Vibrationsreizen ist erhöht), die Thermhypästhesie (herabgesetzte Kalt-/Warmempfindung) sowie eine allgemein verminderte Schmerzwahrnehmung (Hypalgesie) sind Merkmale einer Negativsymptomatik des neuropathischen Schmerzes [7].

Bei Betrachtung der hier aufgeführten Symptome ist eine starke Einschränkung der Lebensqualität in der betroffenen Patientengruppe denkbar [9]. Tatsächlich haben Studien belegt, dass Patienten, die an neuropathischen Schmerzen leiden, in ihrer körperlichen und emotionalen Funktionsfähigkeit eingeschränkt sind [10-12].

Derzeit leidet ca. 8 % der europäischen Bevölkerung an neuropathischen Schmerzen [13]. Die verfügbaren Therapieoptionen führen nur bei 40 – 60 % der Patienten zu einer Schmerzlinderung [14]. Beträgt diese Schmerzlinderung etwa 30 %, wird diese bereits als effektiv angesehen [15]. Die Entwicklung neuer,

wirkungsvollerer und Mechanismus-orientierter Therapiemöglichkeiten wäre daher sinnvoll, um diese Patientengruppe adäquater behandeln zu können.

1.3 Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen

Neuropathische Schmerzen führen auf molekularer Ebene zu Veränderungen der Genexpression im Bereich des somatosensorischen Nervensystems. Die genauen Mechanismen, die zu diesen Veränderungen führen, welche letztendlich in der Entstehung chronischer Schmerzen münden, sind größtenteils noch nicht geklärt und Gegenstand aktueller Forschung.
Eine Entschlüsselung dieser Mechanismen soll Grundlage für das so genannte „mechanismenbasierte Konzept“ sein, wonach bestimmten Symptomen ein definierter Pathomechanismus zugeordnet werden soll [7]. Schmerzpatienten sollen anhand dieser Pathomechanismen eingeteilt und behandelt werden.
Bisher orientiert sich die Therapie neuropathischer Schmerzen vorwiegend an der Behandlung der Erkrankung, die den Schmerzen zu Grunde liegt [14]. Durch das mechanismenbasierte Konzept sollen die Therapieoptionen erweitert werden, indem für jeden Patienten ein individuelles Behandlungsschema entwickelt wird, welches selektiv gegen bestimmte Pathomechansimen gerichtet ist [7].
Der Großteil der bisher aufgeklärten Prozesse wurde mithilfe von Tiermodellen erforscht [9]. In den nächsten Abschnitten werden die wesentlichen bisher bekannten Prozesse vorgestellt.

1.3.1 Periphere Sensibilisierung: Veränderung der membranösen Beschaffenheit im peripheren Nervensystem infolge einer Nervenläsion

Eines der häufigsten Symptome des neuropathischen Schmerzes ist die spontane Schmerzempfindung ohne das Vorhandensein eines schmerzinduzierenden Stimulus [5]. Diese spontan auftretenden Schmerzen werden durch Aktionspotenziale hervorgerufen, die an verschiedenen Stellen des nozizeptiven Systems – also auch außerhalb der eigentlichen Nozizeptoren- entstehen können, ohne dass vorher ein schmerzhafter Impuls stattgefunden hat (*ektope* Entstehung von Aktionspotentialen) [8]. Das *ektope* Aufkommen von Aktionspotentialen kann z.B. im Spinalganglion [16] oder auch in intakten Afferenzen, die in der Nachbarschaft von verletzten Nervenfasern liegen, beobachtet werden [17]. Die

gesteigerte Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen durch die Nervenläsion trägt maßgeblich zur Entstehung dieser *ektopen* Aktionspotentiale bei [9]. Durch die erhöhte Anzahl dieser Kanäle kommt es zur Senkung des Schwellenpotentials, wodurch Aktionspotentiale leichter ausgelöst werden können und damit eine höhere Sensibilität sowie Aktivität resultiert [18-20]. Nicht nur spannungsabhängige Natriumkanäle, sondern auch andere Ionenkanäle verändern nach einer Nervenläsion ihre Expressionsmuster auf Nervenfasern [8]. Eine Herabregulation des *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1)-Kanals auf verletzten Nervenfasern bei gleichzeitiger Expressionszunahme dieses Kanals auf nicht verletzten Fasern wurde beobachtet [8, 21]. Diese Veränderung kann vermutlich als Korrelat für die Hitzehyperalgesie gesehen werden [22]. Des Weiteren wurde nach Nervenläsionen die Expression von α-Adrenozeptoren auf primär afferenten Nozizeptoren beobachtet [23]. Die dadurch gewährleistete Kopplung zwischen Efferenzen des Sympathikus und Nozizeptoren scheint beim Menschen eine Rolle bei der Entwicklung neuropathischer Schmerzen zu spielen [3].

1.3.2 Periphere Sensibilisierung: Die Rolle des Immunsystems bei neuropathischen Schmerzen

Nervenläsionen führen zur Einwanderung von Makrophagen in den Bereich von Nerven und Spinalganglien, die verschiedene Zytokine, wie z.B. den Tumor-Nekrose-Faktor- α, freisetzen [9, 24]. Makrophagen phagozytieren den durch die Läsion entstandenen Zelldetritus und führen über die Präsentation von Antigenen zur T-Zell-Aktivierung [5]. Neben diesen beiden Zelltypen setzen auch andere periphere Immunzellen nach einer Nervenschädigung und der damit einhergehenden Entzündungsreaktion Botenstoffe wie z.B. Interleukin-1β, Bradykinin oder den *Nerve-Growth-Factor* (NGF) frei [5] (die Rolle des NGF bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen wird in Kapitel 1.5 noch genauer charakterisiert). Durch die Interaktion dieser Stoffe mit Rezeptoren auf der Oberfläche von Nozizeptoren kommt es zu deren Aktivierung [5, 25]. Die im vorherigen Abschnitt (1.3.1) beschriebenen Modifizierungen in der Expression verschiedener Membranrezeptoren werden durch die Ausschüttung dieser Botenstoffe bedingt [9, 26, 27]. In der Summe führen diese Prozesse zu den Symptomen der Hyperalgesie und Allodynie [3, 28]. Durch den Einsatz von

immunsuppressiven Medikamenten konnten neuropathische Symptome wie die taktile und mechanische Allodynie in präklinischen Studien abgemildert werden [29, 30].
Gemeinsam mit den in Kapitel 1.3.1. beschriebenen Mechanismen kommt es zur so genannten peripheren Sensibilisierung, welches als Überbegriff für die herabgesetzten Schwellenpotentiale sowie höhere Erregbarkeit an den Membranen der primär afferenten Nozizeptoren verstanden werden kann [31]

1.3.3 Zentrale Sensibilisierung

Ausgangspunkt der zentralen Sensibilisierung (d.h. höhere neuronale Aktivität in Strukturen des zentralen Nervensystems wie dem Rückenmark und dem Gehirn) ist die Hyperaktivität primär afferenter nozizeptiver Neuronen und der dadurch anfallende höhere Informationsfluss innerhalb der nozizeptiven Bahn [5, 9]. So kommt es auf präsynaptischer Seite (an den im Rückenmark endenden primär afferenten Nozizeptoren) zu einer gesteigerten Expression von N-Typ Calciumkanälen, wodurch es zu einer höheren Ausschüttung von Glutamat und Substanz P kommt [32]. Die gesteigerte Transmitterfreisetzung führt zu postsynaptischen Veränderungen in so genannten *Wide-Dynamic-Range Neurons* (WDR-Neurone) [9]. Diese Neurone sind als zweites Neuron nozizeptiver wie auch nicht-nozizeptiver Bahnen zu verstehen. Hier kommt es durch das höhere Angebot von Glutamat zur Phosphorylierung von NMDA- und AMPA- Rezeptoren [33] sowie zu einer höheren Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen [34]. Durch diese Veränderungen kommt es zu einer Verstärkung und Steigerung der synaptischen Übertragung zwischen erstem und zweitem Neuron der Schmerzbahn sowie zu gesenkten Erregungsschwellen der WDR-Neurone [8]. Das erniedrigte Schwellenpotential ermöglicht mechanosensitiven Aβ- und Aδ-Fasern, die nun sensibilisierten WDR-Neurone zu erregen [35, 36]. Diese neue funktionelle Verknüpfung führt zum Symptom der Allodynie [9].
Nozizeptive Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks stehen unter der inhibitorischen Kontrolle von GABAergen Interneuronen [9]. Periphere Nervenläsionen führen zu einem Verlust dieser inhibitorischen Interneurone [37]. Wird die Abnahme dieser Zellen verhindert, kommt es zu einer Abnahme mechanischer und thermischer Hyperalgesie [38].

Neben der *intraspinalen* inhibitorischen unterliegen die Neurone im Hinterhorn auch einer *supraspinalen* Kontrolle [39]. Diese Bahnen entspringen im *anterioren Gyrus cinguli*, in der *Amygdala* und *Hypothalamus* und durchlaufen den Hirnstamm über das *periaquäduktale* Grau sowie angrenzende Strukturen der *ventrolateralen Medulla* [5, 39]. Noradrenalin, Serotonin und endogene Opioide wirken hier als inhibitorische Transmitter [5]. Nach einer Nervenläsion kommt es zum Funktionsverlust dieser inhibitorischen Bahnen und infolge dessen zur zentralen Sensibilisierung und Schmerzchronifizierung [39-42].
Diese Zusammenhänge erklären auch, wieso trizyklische Antidepressiva und Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRIs) als Therapeutika bei Schmerzpatienten eingesetzt werden und eine gewisse Wirksamkeit entfalten [43].

1.4 Pharmakologische Therapie neuropathischer Schmerzen

Die pharmakologische Therapie neuropathischer Schmerzen gestaltet sich schwierig und verzeichnet beim Einsatz weit verbreiteter Analgetika (z.B. nichtsteroidale Antirheumatika oder Opioidanalgetika) kaum Erfolge [44, 45]. Durch die pharmakologische Therapie ist eine Verminderung der Schmerzen um maximal 50-80 % möglich [46]. Bei diesen Patienten kommt es im Durchschnitt lediglich zu einer Abnahme der Schmerzen, d.h. eine umfassende Schmerzfreiheit ist trotz pharmakologischer Therapie kaum möglich [12].
Die *Neuropathic Pain Special Interest Group* (NeuPSIG) der IASP ermöglichte die Entwicklung einer evidenzbasierten Richtlinientherapie gegen neuropathische Schmerzen [47]. Die empfohlenen Wirkstoffe werden drei Gruppen zugeordnet, *first-, second-, third- line medications*. Die Zuteilung der Wirkstoffe zu den einzelnen Gruppen ergibt sich aus deren Wirksamkeit in klinisch – randomisierten Studien [47]. Die Behandlung wird je nach Symptomatik stufenweise anhand dieser drei Gruppen durchgeführt [14]. Tabelle 1 umfasst die *First-Line* Präparate. Opioidanalgetika gehören nur unter bestimmten klinischen Voraussetzungen zu den *First-Line*-Medikamenten (akuter neuropathischer Schmerz, durch Krebserkrankung ausgelöste Neuropathie, Notwendigkeit einer schnellen Analgesie bei noch nicht abgeschlossener Dosisfindung eines *First-Line*-Präparates) [47].

Die aktuelle Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie [46] sieht die Umsetzung folgender Punkte als realistische Therapieziele bei der pharmakologischen Behandlung neuropathischer Schmerzen:

- Schmerzreduktion um 30-50%
- Verbesserung der Schlaf- und Lebensqualität
- Erhaltung der sozialen Aktivität, des sozialen Beziehungsgefüges und der Arbeitsfähigkeit

Wirkstoffgruppe	**Wirkungen**	**Neben-wirkungen**	**Kontraindikationen**	**Weiterer Nutzen**
Trizyklische Antidepressiva (Nortriptylin, Desipramin)	Wiederaufnahme-hemmung von Serotonin und Noradrenalin; Blockade von Natriumkanälen	Sedierung; anticholinerge Wirkungen	Herzerkrankungen; Glaukom; Epilepsie; Tramadoleinnahme	Behandlung von Depressionen und Schlaf-störungen
Selektive Serotonin- und Noradrenalin-wiederauf-nahmehemmer (SSNRIs) (Duloxetin, Venlafaxin)	Wiederaufnahme-hemmung von Serotonin und Noradrenalin	Übelkeit; Erbrechen	Duloxetin: Leber-funktionsstörung; Niereninsuffizienz; Alkoholabusus; Tramadoleinnahme Venlafaxin: Herzerkrankungen; Tramadoleinnahme	Therapie von Depressionen
Calciumkanal α2-δ Liganden (Gabapentin, Pregabalin)	Senkt Freisetzung von Glutamat, Noradrenalin und Substanz P	Sedierung; Schwindel; periphere Ödeme	Niereninsuffizienz	Kaum Interaktionen
Topisches Lidocain (Lidocain-Pflaster)	Natriumkanal-blockade	Erytheme; Hautausschlag	-	Keine systemischen Effekte
Opioidagonisten (u.a. Morphin, Oxycodon, Tramadol) (nur unter bestimmten Umständen „*first-line*“ [47])	μ-Rezeptor Agonisten: Oxycodon*:* auch κ-Rezeptor-antagonist; Tramadol: auch Serotonin- und Noradrenalinwieder-aufnahmehemmung	Übelkeit Erbrechen; Obstipation; Schwindel	Substanzabusus; Suizidrisiko; Gefahr eines Serotoninsyn-droms bei Kombination von Tramadol mit SSNRI und Trizyklika (s.o.)	Schneller analgetischer Wirkeintritt

Tabelle 1: *First-line* Medikation bei neuropathischen Schmerzen. Tabelle modifiziert übernommen aus Baron et al. 2010 [8].

1.5 Der *Nerve-Growth-Factor* (NGF) und neuropathische Schmerzen

Der NGF wurde erstmalig 1954 aus einem Sarkom der Maus isoliert und zunächst als ein Nukleoprotein-Partikel angesehen, welcher Wachstum und Differenzierung von sensorischen Zellen sowie Zellen des Sympathikus reguliert [48]. Seit 1956 wird der NGF als Protein und nicht mehr als Nukleoprotein-Partikel angesehen [49].

NGF gehört neben dem *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *Neurotrophin-3* (NT-3) und *Neurotrophin*-4 (NT-4) zur Familie der Neurotrophine und entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über die Bindung an den TrkA-Rezeptor (Tropomyosin-Rezeptor-Kinase) [50, 51]. Mit geringerer Affinität bindet NGF auch an den *Pan Neurotrophin Receptor* mit einer Größe von 75 kDa (p75NTR) [52].

Für die Entwicklung und Erhaltung des peripheren sensorischen Nervensystems sowie die Regenerierung nach einem Nervenschaden stellt der NGF einen wichtigen Faktor dar [53-55]. So wird das Überleben von Neuronen in Spinalganglien (DRG-Neuronen) während der frühen Entwicklung des Nervensystems über die Interaktion von NGF mit dem TrkA-Rezeptor ermöglicht [56]; ebenso die Aussprossung von Axonen aus diesen Zellen [56].

Trotz seiner *trophischen* Funktion auf das sensorische Nervensystem sprechen die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen für eine Beteiligung des NGF bei der Entstehung charakteristischer Symptome des neuropathischen Schmerzes, wie z.B. der Hyperalgesie (mechanischer wie auch thermischer Natur) sowie der Allodynie [57-59]. Mills et al induzierten bspw. durch die Injektion von NGF in den Hinterlauf von Ratten eine mechanische und thermische Hypersensitivität bei den Versuchstieren [60].

Eine Behandlung durch Antagonisierung des NGF (z.B. durch spezifische Antikörper) führte zur Abnahme dieser Symptomatik bei Ratten [61, 62].

Da vieles darauf hinweist, dass der NGF nicht nur bei der Auslösung neuropathischer, sondern auch nozizeptiver Schmerzen eine Rolle spielt [63-65], wird in Studien die Wirksamkeit von „Anti-NGF“-Analgetika bei der Behandlung verschiedener Schmerzentitäten untersucht [66]. Eine Möglichkeit, den NGF in seiner Expression und Wirkung zu beeinflussen, wäre die Hemmung der Translation seiner entsprechenden mRNA über genregulatorisch wirksame miRNAs. Ähnliche Studien wurden bereits zu verschiedenen schmerzrelevanten

Proteinen durchgeführt (bspw. Inhibition der Expression eines Natriumkanals in Spinalganglien CCI-behandelter Tiere durch *intrathekale* Verabreichung einer miRNA und daraus resultierender Reduktion neuropathischer Symptome [67]).

1.6 MicroRNAs (miRNAs)

1.6.1 Grundlagen, Biogenese, Einflussnahme auf die Genexpression

MiRNAs sind kurze (21-25 Nucleotide lange), nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression auf *posttranskriptioneller* Ebene regulieren [68-70].
Die genetische Information der miRNAs liegt -mit Ausnahme des Y-Chromosoms- auf allen Chromosomen verteilt vor [71]. Dabei stellen miRNAs evolutionsbiologisch hoch konservierte Moleküle dar. Etwa ein Drittel der miRNAs in *Caenorhabditis elegans* zeigen Homologe unter den humanen miRNAs [72].
MiRNAs werden hauptsächlich von der RNA–Polymerase II transkribiert [73, 74]. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Transkription bestimmter miRNAs auch durch die RNA-Polymerase III erfolgt [68]. Erstes Produkt der Transkription ist die pri–miRNA [71]. Im nächsten Schritt erfolgt die Spaltung der pri-miRNA durch die im Zellkern gelegene RNase III Drosha, wodurch die pre-miRNA entsteht [75]. Die pre-miRNA ist etwa 70 Basenpaare lang und zeigt die Form einer unvollständigen Haarnadelstruktur. Charakteristisch für Spaltprodukte von RNase III Endonukleasen sind ein 5´Phosphat Ende sowie ein etwa zwei Nucleotide langer 3´ Überhang, was für pre-miRNAs zutrifft [75, 76]. Die pre-miRNA wird durch Exportin 5 -ein Ran-GTP abhängiger Transporter- vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert [77, 78].
Im Zytoplasma erfolgt eine weitere Spaltung durch die RNase III Endonuclease Dicer. Dabei entsteht die 21-25 Nucleotide lange, teils doppelsträngige reife miRNA (miRNA:miRNA*), die aus dem eigentlichen miRNA Strang und ihrem Komplementärstrang (miRNA*) besteht [79, 80].
Ihre Funktion als Regulatoren der Translation nehmen miRNAs durch Einschleusung in einen Proteinkomplex wahr, der abhängig von der Literatur als *RNA-induced-silencing complex* (RISC) oder *miRNA-containing RNA-induced silencing complex* (miRISC) beschrieben wird [71, 81]. In den Effektorkomplex wird dabei der Strang der noch doppelsträngigen miRNA (miRNA:miRNA*) mit der

geringeren Stabilität am 5´Ende integriert [82, 83]. Der verbliebene Strang (miRNA*) wird abgebaut. Abbildung 1 veranschaulicht die hier beschriebenen Prozesse:

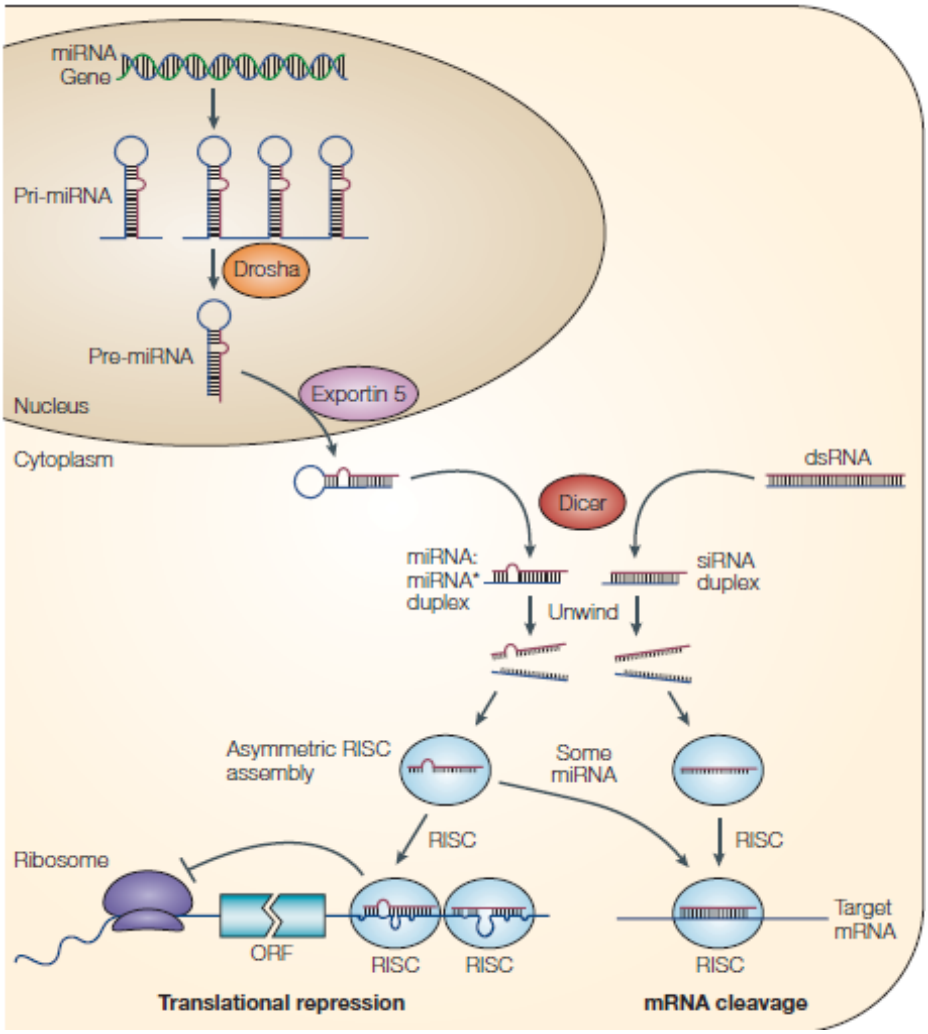


Abb. 1: Entstehung der miRNAs sowie deren Einfluss auf die Translation. Die pri-miRNA ist als erstes Transkript der miRNA zu verstehen. Durch das Enzym Drosha entsteht noch im Zellkern die ca. 70 Nucleotide lange pre-miRNA. Durch das Transportprotein Exportin 5 gelangt die pre-miRNA in das Cytoplasma. Das Enzym Dicer sorgt für die Entstehung der doppelsträngigen miRNA (miRNA:miRNA* Duplex). Nur ein Strang dieser doppelsträngigen miRNA wird in den RISC integriert und führt abhängig von seiner Komplementarität zur Ziel-mRNA entweder zur Hemmung der Translation selbst (*Tanslational Repression)* oder zum Abbau der mRNA (*mRNA cleavage)*. Zusätzlich ist auch ausschnittsweise die Biogenese und Funktion der siRNAs (*small interfering RNA*s) abgebildet. Abbildung und Legende (übersetzt) unverändert übernommen aus He et al 2004 [81].

MiRNAs regulieren die Genexpression auf *posttranskriptioneller* Ebene, d.h. nach erfolgter Synthese der entsprechenden mRNA [68, 81, 84, 85]. Der regulative Effekt der miRNAs führt zu einer verminderten Translation der mRNAs und somit

einer geringeren Proteinexpression. Dieser Prozess kann auf zweierlei Weise ablaufen: entweder wird die Translation inhibiert oder die gebundene mRNA wird abgebaut [68, 81, 86].
Hier scheint die Komplementarität zwischen der miRNA und ihrer Ziel-mRNA darüber zu entscheiden, welcher der beiden Prozesse abläuft: überschreitet der Grad der Komplementarität eine bestimmte Höhe, findet ein Abbau der mRNA statt, andernfalls beschränkt sich die Regulation auf eine Inhibition der Translation [87-89].
Das 5´Ende der miRNA ist wahrscheinlich für die Erkennung der jeweiligen mRNA von Bedeutung und zeigt i.d.R. eine gute Komplementarität zu den Basen der mRNA [84]. Untersuchungen an der als erstes entdeckten miRNA-lin-4 haben gezeigt, dass miRNAs (in einem RISC integriert) an bestimmten Sequenzen der 3´-*untranslated region* (3´UTR-Region) der mRNA binden und sich innerhalb dieser Region mehrere Bindungsstellen für miRNAs befinden [68, 90, 91].
Dabei kann eine miRNA verschiedene mRNAs regulieren und eine mRNA von unterschiedlichen miRNAs beeinflusst werden [92].
Zudem haben aktuelle Studien neue Wirkmechanismen von miRNAs aufgedeckt, die über die reine Wirkweise als Inhibitor der Translation hinausgehen: Eine Übertragung von miRNAs über *Exosomen* zu benachbarten Zellen nahm Einfluss auf die dort stattfindende Translation [93-96]. Eine weitere Studie ergab, dass die miRNA-let-7b aus Spinalganglien-Zellen freigesetzt werden kann und über die Bindung an den *Toll-Like Receptor-7* (TLR7) von *Nozizeptoren* sowie die damit einhergehende Aktivierung des TRPA1-Kanals zu deren Stimulation führt [96, 97].
Man geht davon aus, dass etwa ein Drittel aller menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden [98, 99].

1.6.2 MiRNAs im Kontext der Schmerzentstehung

MiRNAs nehmen als Regulatoren der Genexpression Einfluss auf verschiedene physiologische und pathologische Prozesse wie z.B. die Differenzierung von Zellen und deren Proliferation, spielen aber auch im Rahmen der Tumorentstehung eine wichtige Rolle [100, 101]. Bei der Entstehung chronischer Schmerzen kommt es zu vielfältigen Änderungen der Genexpression [102-104]. MiRNAs könnten auch bei diesen Prozessen eine regulatorische Rolle spielen und als neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung chronischer Schmerzen

genutzt werden [96, 105]. Es wurden bereits mehrere Studien veröffentlicht, die die Expressionsveränderungen von miRNAs in verschiedenen Schmerzmodellen untersucht haben. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht dieser Studien. Es konnte gezeigt werden, dass miRNAs ihre Expressionsmuster in verschiedenen experimentellen Modellen zur Auslösung von Schmerz verändern und diese Expressionsänderungen sowohl eine Abhängigkeit von der jeweiligen Schmerzkondition als auch von dem Zeitpunkt zeigen, der nach der Intervention untersucht wurde [96]. Allerdings gibt es bisher noch wenige Untersuchungen, die einen regulativen Effekt zwischen einer miRNA und der mRNA eines schmerzrelevanten Peptids/Proteins untersuchen. Daher wird in dieser Studie neben der reinen Expressionsuntersuchung von miRNAs auch ein Zusammenhang zwischen einer miRNA und einem schmerzrelevanten Zielgen untersucht. Hieraus könnten sich neue Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen bei neuropathischen Schmerzen ergeben.

Modell	**Organ**	**Untersuchungs-technik**	**Untersuchungs-zeitpunkt**	**Diff. exprimierte miRNAs**	**Studie**
CCI	Hinterhorn d. RM	Taq Man Array (Life Technologies)	7d 14d	8↑, 13↓/375 20↑, 45↓/375	[106]
	RM	Microarray (Exiqon)	4h 1d 6d 12d	5↓/349 1↓/349 0/349 0/349	[107]
	Hippocampus	Taq Man Array (Life Technologies)	7d	47↑, 7↓/373	[108]
SCI	RM	Microarray (Invitrogen)	12h	5↑, 5↓	[109]
	RM	Microarray (Exiqon)	4d 14d	4↑ 32↓	[110]
SNL	#DRG	Microarray	14d	102↑,6↓/350	[111]
	√DRG	(Agilent)	14d	0/350	
	#DRG	Taq Man Array	4 Wochen	Ungeklärt	[112]
	√DRG	(Life Technologies)	4 Wochen	4↑,59↓/365	

Tabelle 2: Auswahl von Microarray-Studien zur Untersuchung der differentiellen Expression von miRNAs in verschiedenen Schmerzmodellen. DRG, *Dorsal Root Ganglion*; #DRG, durch Intervention direkt betroffenes DRG; √DRG, durch Intervention nicht direkt geschädigtes DRG; CCI, *Chronic Contriction Injury*; SCI, *Spinal Cord Injury*; SNL, *Spinal Nerve Ligation*. Tabelle modifiziert übernommen nach Sakai et al 2014 [96].

1.7 Fragestellung der Arbeit

Neuropathische Schmerzen stellen eine mit den bisher verfügbaren Analgetika nur unzureichend zu behandelnde Erkrankung dar. Daher sind neue Therapieansätze notwendig, um die Therapierbarkeit und damit die Lebensqualität der Patienten zu verbessern. MiRNAs könnten hierbei einen neuen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

Folgende Fragen wurden in der vorliegenden Studie untersucht:

- Führt die Induktion einer CCI zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entstehung und Ausbildung des neuropathischen Schmerzes zu veränderten Expressionsmustern von miRNAs im Spinalganglion der Ratte?
- Falls zutreffend, gibt die bioinformatische Analyse der potentiellen Zielstrukturen einer differentiell exprimierten miRNA Hinweise auf eine mRNA, die eine Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielen könnte?
- Besteht eine funktionelle Interaktion zwischen dieser miRNA und ihrer potentiellen Ziel-mRNA?

Um die Fragen zu beantworten, wurde folgender methodischer Ansatz gewählt: Zur Bestimmung von differentiell exprimierten miRNAs wurde ein Microarray durchgeführt. Mit quantitativer Real-Time PCR wurde das Expressionsergebnis einer miRNA aus der Microarrayuntersuchung validiert. Die bioinformatische Analyse mit der Frage nach einer schmerzrelevanten Ziel-mRNA der miRNA erfolgte durch Target Scan. Die abschließende Untersuchung einer möglichen Interaktion erfolgte über Transfektion von HEK 293 Zellen mit Plasmiden, die die untersuchten Sequenzen enthielten und einem Luciferase Assay.

Die Ergebnisse der Studie könnten einen möglichen neuen Signalweg bzw. eine pathophysiologische Kaskade bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen aufzeigen. Daraus könnten sich neue Therapieansätze bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen ergeben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Agarosegelkammer	LTF Labortechnik, Wasserburg
Bakterien Inkubator BD 23	Binder, Tuttlingen
Feinwaage LA 230 S	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop AE 30	Motic, Wetzlar
Mikrobiologische Sicherheits-Werkbank HERA safe	Kendro, Langenselbold
Multi-Detektions-Reader Synergy 2	BioTEK, Winooski, VT, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Real-Time-PCR-Cycler 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Rotierender Plattformschüttler Unimax 1010 mit Heizmodul 1000	Heidolph, Schwabach
Spannungsquelle E 143 Power Supply	Consort, Belgien
Thermocycler C 1000™	Bio-Rad, München
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR, Langenfeld
UV-Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Vortexer REAX top	Heidolph, Schwabach
Waage BP 1200	Sartorius, Göttingen
Zellinkubator CB 210	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Chemikalien

5x Reporter Lysis Buffer	Promega, Madison, WI, USA
5x M-MLV Puffer	Promega, Madison, WI, USA

10x EZ Puffer	Axon, Kaiserslautern
10x Reaktionspuffer B	Axon, Kaiserslautern
Agarose	Roth, Karlsruhe
ATP, Na-salt	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Coenzym A, Na-salt	Sigma, Steinheim
Chloroform	VWR, Fontenay sous Bois, Frankreich
DNA-Leiter, 100 bp extended	Roth, Karlsruhe
dNTPs (je 10 mM)	Promega, Madison, WI USA
dNTPs (je 2,5 mM)	Axon, Kaiserslautern
DTT	Roth, Karlsruhe
EDTA, Na-salt	Sigma, Steinheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Glucose	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Steinheim
Hefeextrakt	Fluka, Buchs, Schweiz
High Capacity RNA-to-cDNA MasterMix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
Luciferin	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Roth, Karlsruhe
$(MgCO_3)Mg(OH)_2\ 5H_2O$ (Magnesiumcarbonathydroxid-Pentahydrat)	Sigma, Steinheim
$MgSO_4\ 7H_2O$ (Magnesiumsulfat-heptahydrat)	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$ (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
M-MLV-RT (200 U)	Promega, Madison, WI, USA
$MgCl_2$ (25 mM)	Axon, Kaiserslautern
$Na_2HPO_4\ 2H_2O$	

(Dinatriumhydrogenphosphat)	Fluka, Buchs, Schweiz
NaH_2PO_4 $2H_2O$	
(Natriumdihydrogenphosphat)	Fluka, Buchs, Schweiz
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
Na_2EDTA	Sigma, Steinheim
ONPG	
(o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)	Acros, Geel, Belgien
Orange G	Chroma/Waldeck GmbH & Co KG, Münster
Random Primer	Promega, Madison, WI, USA
RNase Inhibitor (25 U)	Promega, Madison, WI, USA
RT Kit TaqMan Micro RNA	
Reverse Transkription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TaqMan Universal PCR MasterMix	
No AmpErase®UNG	Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey USA
TaqMan 2x Gene Expression	Applied Biosystems, Foster City
Master Mix	CA, USA
TaqMan MicroRNA Assay:	
U6 snRNA- 5x: RT 001973	
U6 snRNA- 20x: TM 001973	
hsa-let 7c-5p- 5x: RT 00379	
hsa-let 7c-5p- 20x: TM 000379	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan Gene Expression Assay:	
NGF- 20x: Rn 01533872_m1	
GAPDH- 20x: Rn 01462661_g1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tricine	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Steinheim
TRIzol® Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA USA

Trypan Blue Solution	Fluka, Steinheim
Trypton	Fluka, Buchs, Schweiz

2.1.3 Verwendete Enzyme

Spe I, GQ (10 U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
Bam H I (10 U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
Hind III (10 U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
EcoRI (12 U/µl)	Promega, Madison, WI, USA
RNase A	Roth, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Axon, Kaiserslautern
5x T4 DNA Ligase (1 U/µl)	Invitrogen, Darmstadt

2.1.4 Bakterienkultur

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl- β-D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
X-GAL (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Galactosid)	Roth, Karlsruhe
$CaCl_2$ (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt

2.1.5 Zellkultur

DMEM Medium (Cat.No.: P04-01555)	PAN^{TM} Biotech GmbH, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Steinheim

2.1.6 Kits

QIAEX® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

60 mm Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
92x16 mm Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
96 WellMultiply®-PCR Plate	Sarstedt, Nümbrecht
Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates	Nunc, Roskilde, Dänemark
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht
LIA-Platte, weiß, 96 Well	Greiner bio-one, Frickenhausen
MicroAmp™ Splash free 96-Well Base	Applied Biosystems, Foster City,CA,USA
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Parafilm	Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen mit Filter (10, 200, 1000 µl)	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Tube (13, 15, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.8 Oligonukleotide

Folgende Primer wurden für die Synthese des Klonierungsprodukts der miRNA-let-7c verwendet.

Let- 7c cloning_vorwärts:

5’- agtcgtaagcttGATGTGAGAAGAGGTTTCGTG -3’ (Hind III)

Let- 7c cloning_rückwärts:

5’- agtcgtggatccCACAAGCAGAATCCCAACAATC-3’ (BamH I)

Die hier dargestellten Oligonukelotide wurden für die Herstellung der Klonierungssequenz des NGF-Beta Polypeptids verwendet.

NGF Oligo_vorwärts:
5´ctagtCCCACCTGCCCCCTCCACACTCTCCTGGGCCCCTCC**CTACCTCA**GCC
TGTAAATTATTTTAAATTATAAGGACTGCATGATAATTTATCGa 3´ (SpeI)
NGF Oligo_rückwärts:
5´agcttCGATAAATTATCATGCAGTCCTTATAATTTAAAATAATTTACAGGCT**GA**
GGTAGGGAGGGGCCCAGGAGAGTGTGGAGGGGGCAGGTGGGa 3´ (HindIII)

2.1.9 Plasmide

In dieser Studie wurden drei verschiedene Plasmide eingesetzt. Zunächst wurde der pGEM®-T Easy Vektor von Promega zur Vervielfältigung des zu untersuchenden *Insert* der miRNA-let-7c verwendet. Anschließend wurde die miRNA-Sequenz in den pcDNA™3.1 (+/) Vektor (Invitrogen) kloniert. Das mögliche *Target* dieser miRNA wurde in die Plasmide des pMIR-REPORT™ Systems von Applied Biosystems kloniert. Der Aufbau der Vektoren sowie nähere Informationen sind in den Kapiteln 2.2.16 (pGEM-T Easy) und 2.2.22 (pcDNA und pMIR-REPORT System) zu finden.

2.1.10 Bakterienstämme

XL1-Blue Competent Cells	Agilent Technologies Sales&Services GmbH& Co.KG, Frankfurt am Main

2.1.11 Zelllinien

HEK 293 Zellen (ATCC® CRL-1573™)	LGC Standards GmbH, Wesel

2.1.12 Analyseprogramme und im Internet genutzte Datenbanken

PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Nucleotiddatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/
TargetScan	http://www.targetscan.org/
Clustal W2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

miRBase	http://www.mirbase.org/
Calculator	http://www.sciencelauncher.com/MWcalc.html
REST 2009	http://www.gene-quantification.de/rest.html
Primer 3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
Ensemble Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
GraphPad Prism version 6, GraphPad Software	San Diego, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung des Gewebematerials

In dieser Studie wurden die Spinalganglien von jungen, männlichen Wistar-Ratten (Gewicht 290-310 g, Alter etwa 3 Monate) zur Untersuchung herangezogen. Die Versuchstiere wurden von tiermedizinischen Doktorandinnen und Humanmedizinern unserer Klinik nach dem *Chronic Constriction Injury* (CCI) Modell operiert [113]. Die Untersuchungen wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ: 8.87-51.04.20.09.343). Alle Tiere wurden von der hauseigenen Zucht der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Zur Auslösung einer CCI wurde der *N. ischiadicus* im mittleren Bereich des Oberschenkels freipräpariert und mit vier Catgut Ligaturen locker umschlungen. Dieses Vorgehen führte zur Ausbildung einer peripheren Mononeuropathie, die sich bei den Versuchstieren in Form von Hyperalgesie und Allodynie zeigte. Bei den Kontrolltieren (*Sham*-Gruppe) wurde der Nerv freigelegt und nicht weiter modifiziert.

Je nach Möglichkeit wurden ein bis drei mit dem *N. ischiadicus* assoziierte Spinalganglien entnommen, die in den Segmenten L3-L5 lagen. Die Entnahme der Spinalganglien erfolgte dabei zu folgenden Zeitpunkten nach der Operation:

- 4 Stunden (4 h)
- 1 Tag (1 d)
- 6 Tage (6 d)
- 12 Tage (12 d)

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Spinalganglien bei -80°C gelagert.

Jede Gruppe (*Sham* vs. CCI zu den vier o.g. Untersuchungszeitpunkten) umfasste jeweils 6 Versuchstiere (n=6).

Für den Nachweis der Entwicklung neuropathischer Schmerzen wurden Verhaltenstests zur Erfassung der mechanischen Allodynie und thermalen Hyperalgesie an den Hinterpfoten der Versuchstiere durchgeführt. Die kontralaterale Seite diente dabei als Kontrolle. Die Tests erfolgten vor dem jeweiligen operativen Eingriff sowie zu den vorgegebenen Zeitpunkten direkt vor Entnahme der Spinalganglien. Die mechanische Allodynie wurde mittels *von Frey-Filamenten* (Ø 0,5 mm) erfasst. Anhand einer Abnahme des Pfotenrückzugsschwellenwerts (dies entspricht verstärktem Schmerzempfinden) wurde die Ausbildung neuropathischer Schmerzen verifiziert. Die thermale Hyperalgesie wurde mit einem unter der Hinterpfote des Versuchstiers platzierten Infrarotlicht getestet. Hier galt die Abnahme der Pfotenrückzugslatenz als Indikator für die Ausbildung neuropathischer Schmerzen [114]. Die Tiere zeigten dabei ab dem Untersuchungszeitpunkt 6 d verminderte Pfotenrückzugsschwellenwerte bzw. -latenzen [107].

2.2.2 RNA Isolierung mit Trizol

Die Spinalganglien wurden in 1 ml TRIzol® Reagent homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden für 15 sec manuell geschüttelt und 2-3 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 g für 15 min bei 4 °C. Die obere wässrige RNA-enthaltende Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Zum Ausfällen der RNA wurde der Probe 0,5 ml Isopropylalkohol (100 %) beigefügt und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 12000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Dem RNA-Pellet wurde 1 ml Ethanol (75 %) zugesetzt. Die Probe wurde gevortext und bei 7500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Waschschritt wurde wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet 10-15 min unter dem Abzug bei RT getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 95 °C heißem, RNase – freiem Wasser resuspendiert. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert.

2.2.3 Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde durch photometrische Messung von 1 µl der jeweiligen Probe bei 260 und 280 nm bestimmt. Der Quotient 260/280 nm gab hierbei einen Hinweis auf den Reinheitsgrad der Präparation. Eine reine RNA weist einen Quotient von 1,8-2,0 auf. Die RNA-Qualität wurde mithilfe eines Nano-Chips (*Eukaryote Total RNA Nano*) des Herstellers Agilent im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestimmt. Dabei wurde RNA, die eine *RNA Integrity Number* (RIN) von mindestens > 7,0 aufwies, als RNA mit guter Qualität gewertet.

2.2.4 miRNA Microarray

In dieser Studie wurde mittels Real-Time PCR das Expressionsmuster der miRNA-let-7c in Spinalganglien von Ratten untersucht. In einem ersten Schritt wurde ein miRNA Microarray des Herstellers Agilent durchgeführt, um eine Übersicht über alle differentiell exprimierten miRNAs zu den vier Untersuchungszeitpunkten zu erhalten. Der Array wurde im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Karl Köhrer durchgeführt und statistisch ausgewertet.

Die Qualitätskontrolle der Proben erfolgte mit dem *RNA 6000 Nano Chip*. Anschließend wurden je vier biologische Replikate pro Untersuchungszeitpunkt (4 Stunden (4 h), 1 Tag (1 d), 6 Tage (6 d) und 12 Tage (12 d)) und Kondition (scheinoperierte Tiere (= *Sham* Tiere) und CCI–behandelte Tiere) für die cRNA Synthese ausgewählt. Nach der RNA-Quantifizierung am Nanodrop wurden jeweils 100 ng Gesamt-RNA in das *miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit Protocol* eingesetzt. Für die miRNA Analyse wurden folgende *Agilent G4473B Rat miRNA (V2) Microarrays (8x15K)* verwendet (Barcode – Nr.):

253118910102 *(Slide 1)*, 253118910103 *(Slide 2)*, 253118910066 *(Slide 3)*, 253118910066 *(Slide 4)*, 2253118910069 *(Slide 5)*.

Die Primärdatenanalyse wurde mit der *Feature Extraction Software Vers. 10.7.1.1*. (Agilent) durchgeführt. Dabei wurden sechs Qualitätsparameter zur Evaluierung der Microarrayslides überprüft *(Evaluation Metrics for miRNA)*. Die

Sekundärdatenanalyse erfolgte mithilfe der *Genespring GX Software, Version 11.5.1.* Hiermit erfolgten die Qualitätskontrolle und die statistische Analyse. Für die statistische Analyse wurden die Rohdaten der Fluoreszenzen der einzelnen Arrays in die *Genespring GX Software, Version 11.5.1*, importiert und entsprechend den Konditionen (CCI oder *Sham*) und Zeitpunkten (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) gruppiert. Mithilfe des t-Test (*t-Test unpaired, unequal variance*, p≤0,05) wurden signifikant differentiell exprimierte miRNAs ermittelt.

2.2.5 Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese) im Rahmen der Real-Time PCR zur Untersuchung der miRNA Expression

Zur Bestimmung der differentiellen miRNA-Expression mithilfe der Real-Time PCR erfolgte im ersten Schritt die Umschreibung der zu untersuchenden miRNA in cDNA. Die Umschreibung wurde mit TaqMan miRNA Assays von Applied Biosystems durchgeführt. Es wurde RNA in einer Konzentration von 2 ng/µl eingesetzt. Der Reverse Transkription-Master Mix zum Umschreiben einer Probe enthielt folgende Komponenten (Tabelle 3):

Komponente	Volumen (in µl)
100 mM dNTPs (mit dTTP)	0,15
MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 50 U/µl	1,00
10x Reverse Transkription Puffer	1,50
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,19
Nuclease-freies Wasser	4,16
Total	7

Tabelle 3: Komponenten des Master Mix für die Reverse Transkription (Angaben für einen Versuchsansatz)

Die Substanzen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Herstellen des Master Mix wurden 7 µl Master Mix mit 5 µl RNA (Konzentration 2 ng/µl) der jeweiligen Probe in einem Reaktionsgefäß zusammengebracht, gevortext und zentrifugiert. Es wurde 3 µl des RT Primers (5x) hinzugegeben, wieder gevortext und zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte unter folgenden Bedingungen im Thermocycler (C 1000^{TM} Bio Rad Laboratories GmbH) (Tabelle 4):

Zeit (min)	Temperatur (°C)
30	16
30	42
5	85
∞	4

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkription bei der Real-Time PCR

Bis zur Verwendung in der Real-Time PCR wurden die cDNA Proben bei – 80 °C gelagert.

2.2.6 Die quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) zur Untersuchung der miRNA Expression

Die PCR ist ein Verfahren, das in die drei Teilschritte Denaturierung (Auftrennen des DNA-Doppelstrangs in einen Einzelstrang), Primeranlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Elongation*, Ergänzung des DNA- Einzelstrangs zum Doppelstrang) eingeteilt werden kann.

Im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie ist die qRT-PCR mittels TaqMan^{TM}-Sonden etabliert. TaqMan^{TM}-Sonden sind Oligonukleotide, die spezifisch für die zu untersuchende cDNA Sequenz sind. Diese Sonden tragen an ihrem 5´ Ende einen *Reporter* und an ihrem 3´ Ende einen *Quencher*. *Reporter* und *Quencher* sind Fluoreszenzfarbstoffe. Befinden sich *Reporter* und *Quencher* in räumlicher Nähe zueinander, nimmt der *Quencher* das vom Reporter abgebebene Fluoreszenzsignal auf, sodass dieses von außen nicht gemessen werden kann [115]. Trifft die Polymerase während des PCR-Zyklus auf das Oligonucleotid mit *Reporter* und *Quencher*, baut sie dieses aufgrund ihrer 5´ 3´ -Exonukleaseaktivität ab. Aus dem Abbau resultiert die räumliche Trennung des *Reporters* und *Quenchers*. Der *Quencher* unterdrückt nicht mehr die Fluoreszenz, die vom *Reporter* ausgeht. Das Emissionsspektrum des *Reporters* kann detektiert werden (Abbildung 2).

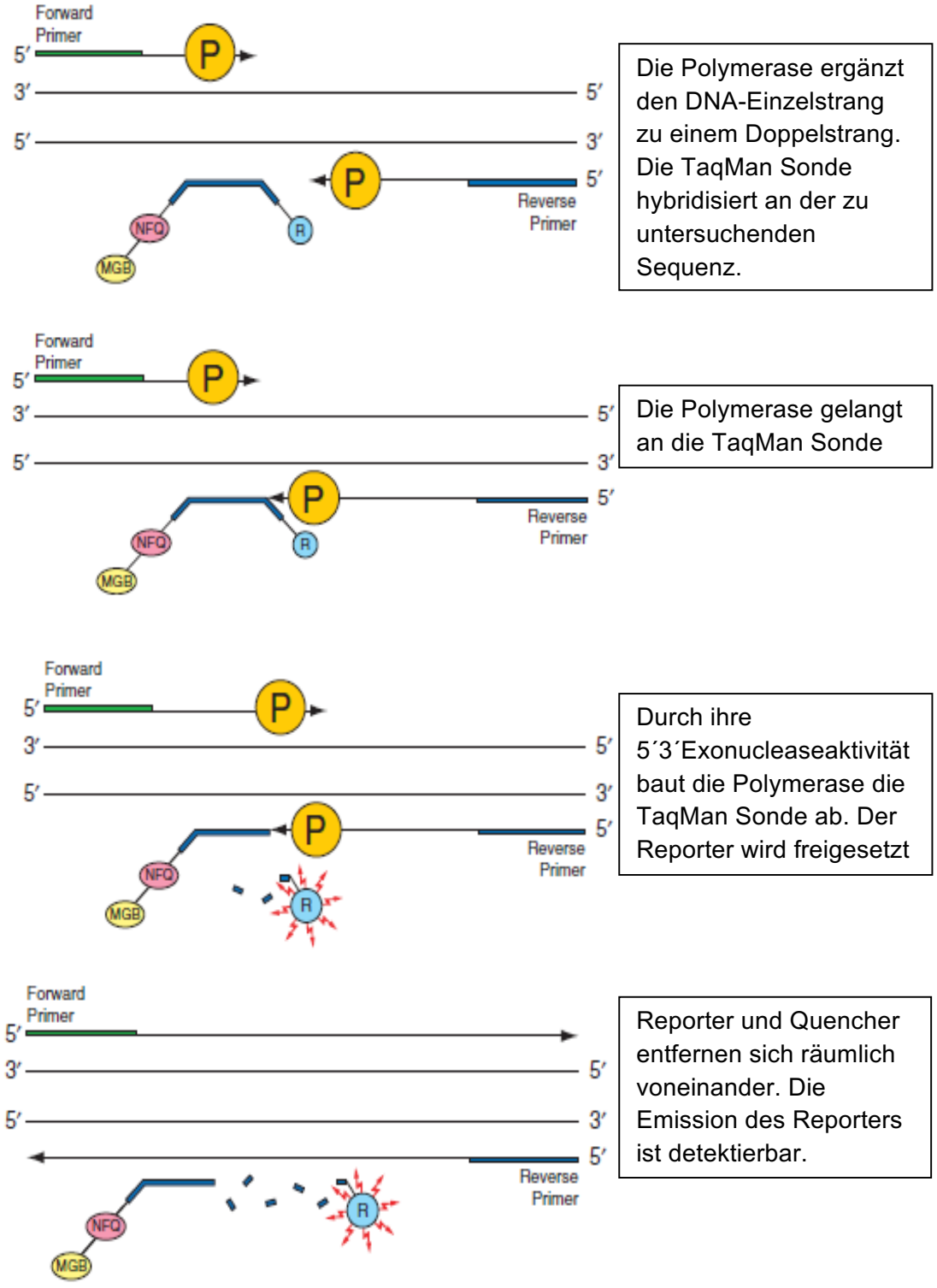


Abb. 2: **Prinzip der Real-Time PCR mittels TaqMan™ - Sonden.** P= Polymerase. R= Reporter. NFQ+MGB=Quencher. Quelle dieser modifiziert übernommenen Abbildung: Protokoll von Applied Biosystems „TaqMan® Small RNA Assays“ (Part Number 4364031 Rev. E 01/2011) S. 28-29.

Für den Reaktionsansatz wurden folgende Komponenten benötigt (Tabelle 5):

Komponente	Volumen (µl)
TaqMan MicroRNA Assay (20x)	1
cDNA	1
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG[a]	10
Nukleasefreies Wasser	8
Total	20

Tabelle 5: Komponenten des Reaktionsansatzes für die Real-Time PCR

Zunächst wurden zwei Master Mixe jeweils für die zu untersuchende miRNA und den *Housekeeper* U6 hergestellt. Es wurden für jede Probe jeweils 19 µl des Master Mix in ein Well einer 96 Well Platte pipettiert. Dies erfolgte für jede Probe im Doppelansatz. Danach wurde in jedes Well jeweils 1 µl der zu untersuchenden cDNA pipettiert. Die geeignete Verdünnung für die jeweilige miRNA wurde zuvor in einer Verdünnungsreihe bestimmt. Für den *Housekeeper* U6 ergab sich hierbei eine Verdünnung von 1:100 als geeignet. Die 96 Well Platte wurde mit einer Klebefolie abgedichtet und bei 4 °C zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Real-Time PCR wurde im 7300 Real Time PCR Cycler von Applied Biosystems durchgeführt. Die Bedingungen sowie die jeweilige Phase im Real-Time PCR- Zyklus zeigt Tabelle 6:

Temperatur (°C)	Zeit	Reaktionsschritt
95	10 min	Enzymaktivierung
95 (40 Zyklen)	15 sek	Denaturierung
60 (40 Zyklen)	1 min	Primeranlagerung + Ergänzung des DNA-Einzelstrangs zum Doppelstrang

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen und -schritte der Real-Time PCR

2.2.7 Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese) im Rahmen der Real-Time PCR zur Quantifizierung von mRNA

Die Untersuchung der mRNA-Expression des NGF erfolgte mit TaqMan ® Gene Expression Assays von Applied Biosystems. Für die reverse Transkription wurde 1 µg RNA als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die RNA wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 32 µl gebracht. In jeden Reaktionsansatz wurden hierzu 8 µl High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix pipettiert. Die Proben wurden anschließend in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen umgeschrieben (Tabelle 7):

25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	∞

Tabelle 7: Thermocyclerbedingungen zur reversen Transkription im Rahmen der Real-Time PCR zur Untersuchung der Genexpression

2.2.8 Real-Time PCR zur Untersuchung der mRNA Expression

Das zu Grunde liegende Prinzip der Real-Time PCR zur Untersuchung der Genexpression ist das gleiche wie das bereits unter 2.2.6 beschriebene. Lediglich die Herstellung des Reaktionsansatzes und der verwendete *Housekeeper* (in diesem Fall GAPDH) unterschieden sich. Jeder Reaktionsansatz enthielt 1 µl eines für die zu untersuchende mRNA spezifischen Assays (TaqMan Gene Expression Assay 20x), sowie 10 µl des TaqMan 2x Gene Expression Master Mix. Hierzu wurden 9 µl cDNA gegeben. Die geeignete Verdünnung wurde zuvor in einer Standardreihe ermittelt. Die Proben wurden im Doppelansatz auf eine 96 well-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bei 4 °C zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Real-Time PCR wurde im 7300 Real Time PCR Cycler von Applied Biosystems durchgeführt. Die Bedingungen entsprechen den in Tabelle 6 beschriebenen.

2.2.9 Primer zur Synthese der einzuklonierenden Sequenz der miRNA-let-7c

Die hier gezeigten Primer wurden für die Synthese des Klonierungsprodukts der miRNA let-7c verwendet. Die genomische Sequenz wurde mithilfe der Datenbanken http://www.ensembl.org/index.html und http://www.mirbase.org/ ermittelt. Die Primer wurden mit der Software Primer 3 konzipiert (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/). Bezogen wurden die Primer bei Eurofins MWG Operon. Der unterstrichene Teil entspricht der Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme.

Let- 7c cloning_vorwärts:
5'- agtcgtaagcttGATGTGAGAAGAGGTTTCGTG -3' (Hind III)
Let- 7c cloning_rückwärts:
5'- agtcgtggatccCACAAGCAGAATCCCAACAATC-3' (BamH I)

2.2.10 Reverse Transkription (cDNA-Synthese) im Rahmen der konventionellen PCR

Die reverse Transkription im Rahmen der konventionellen PCR wurde mithilfe der M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase*) des Herstellers Promega durchgeführt. Für die cDNA Synthese wurde 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zunächst wurde die RNA mit 1 µl Random Primer (0,5 µg) versetzt. Danach wurde die RNA 5 min bei 70 °C denaturiert, um Sekundärstrukturen innerhalb der Probe zu beseitigen. Die Proben wurden sofort für 2 min auf Eis inkubiert, um die Reorganisation der Sekundärstrukturen zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden zu jeder Probe folgende Komponenten hinzugefügt (Tabelle 8):

M-MLV 5x Reaction Buffer	5 µl
dNTPs (je 10 mM)	1,25 µl
Rekombinante RNasin® Ribonuclease Inhibitor (25 U)	0,75 µl
M-MLV-RT (200 U)	1 µl
H_2O	Ad 25 µl Gesamtvolumen

Tabelle 8: Komponenten für die reverse Transkription im Rahmen der konventionellen PCR

Die Reaktionsgefäße wurden nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Bis zum Einsatz in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.11 Amplifizierung der miRNA-let-7c Sequenz aus den untersuchten Spinalganglien mithilfe der konventionellen PCR

Zur Synthese einer ausreichenden Menge der einzuklonierenden miRNA-let-7c Sequenz wurde diese mithilfe der PCR aus einer Probe der untersuchten Spinalganglien synthetisiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten (Tabelle 9):

10 x EZ Puffer	2,5 µl
dNTP (2,5 mM)	1 µl
TaqPolymerase	0,25 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0 µl
Primer vorwärts	0,5 µl
Primer rückwärts	0,5 µl
cDNA	1 µl
H_2O	Ad 25 µl

Tabelle 9: Komponenten für den PCR Reaktionsansatz zur Amplifizierung der miRNA-let-7c Sequenz aus einer Spinalganglienprobe

Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler durchgeführt (Tabelle 10):

Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	Abhängig vom jeweiligen Primer (50-68 °C)	30 sec	26-35 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

Tabelle 10: Reaktionsschritte und -bedingungen für die konventionelle PCR zur Amplifizierung der miRNA-let-7c Sequenz aus einer Spinalganglienprobe

2.2.12 Gelelektrophorese der PCR Produkte

Die PCR-Produkte wurden in Agarosegelen mit einer Konzentration von 2 % elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) wurde in 1x TAE Puffer (bestehend aus Tris Base 40 mM (MG 121,14), EDTA Na-Salz 1 mM (MG 416,2), 20 mM Eisessig) gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen des Gels wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) zu 100 ml Gellösung gegeben. Ethidiumbromid gewährleistet die Sichtbarkeit der aufgetrennten Nukleotidfragmente im Gel mithilfe von UV-Licht. Die Gele wurden je nach Probenanzahl in unterschiedlich große Horizontalkammern mit variabel einzusetzenden Kämmen gegossen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern die PCR-Produkte beim Anlegen einer Spannung ihrer Größe nach vom negativen zum positiven Pol im elektrischen Feld. Dabei wandern größere Fragmente weniger weit als kürzere Fragmente. Somit erfolgt eine Auftrennung der einzelnen Fragmente, die anhand ihrer Lokalisation im Gel im Vergleich zu einem Größenmarker einer Größe und damit einem bestimmten Produkt zugeordnet werden können. Abbildung 3 zeigt dabei das Bild der gelelektrophoretischen Auftrennung der einzuklonierenden miRNA-let-7c Sequenz nach Synthese des Fragments aus den untersuchten Spinalganglien (s. Kapitel 2.2.11).

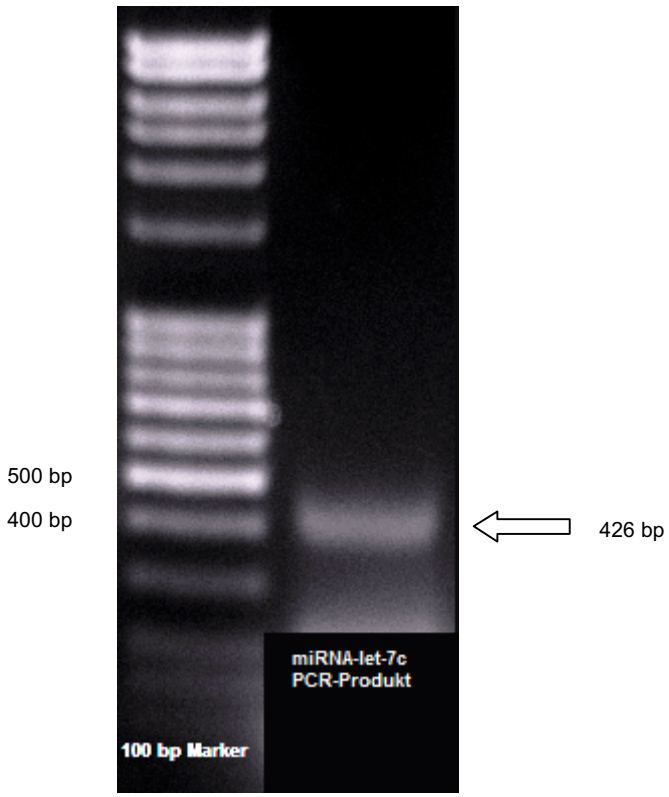


Abb.3: Gelelektrophoretisches Bild des miRNA-let-7c PCR-Produkts. Der Pfeil markiert das PCR-Produkt der einzuklonierenden miRNA-let-7c Sequenz nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel (Fragmentgröße: 426 Basenpaare (bp)).

2.2.13 Oligonuklotide für die Herstellung einer Klonierungssequenz für den NGF

Die Klonierungssequenz für den NGF (es wurde die Sequenz des NGF-Beta-Polypeptids verwendet, da diese laut bioinformatischer Analyse ein mögliches *Target* der miRNA-let-7c darstellt, s. hierzu Abschnitt 3.3) wurde mithilfe synthetischer Oligonukleotide hergestellt. Die genomische Sequenz wurde mit der Nucleotiddatenbank auf http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ ermittelt. Die fett gedruckten Basen stellen die über TargetScan in Erfahrung gebrachte Bindestelle der miRNA-let-7c an dieses Oligonukleotid dar. Unterstrichen sind die Erkennungssequenzen der in Klammern angegebenen Restriktionsenzyme. Bezogen wurde dieses Oligonukleotid bei Eurofins MWG Operon.

NGF Oligo_vorwärts:
5´ctagtCCCACCTGCCCCCTCCACACTCTCCTGGGCCCCTCC**CTACCTCA**GCCTGTAAATTATTTTAAATTATAAGGACTGCATGATAATTTATCGa 3´ (SpeI)
NGF Oligo_rückwärts:
5´agcttCGATAAATTATCATGCAGTCCTTATAATTTAAAATAATTTACAGGCT**GAGGTAG**GGAGGGGCCCAGGAGAGTGTGGAGGGGGCAGGTGGGa 3´ (HindIII)

2.2.14 Herstellung des NGF-*Inserts f*ür die Klonierung

Die Herstellung der Beta-Polypeptid Sequenz des NGF aus einer DRG Probe für die spätere Klonierung ist im Gegensatz zur Synthese der miRNA-let-7c Sequenz (s. Kapitel 2.2.11) nicht gelungen. Daher wurde aus zwei gegenläufig orientierten Oligomeren, die der Sequenz dieses Polypeptids entsprachen, ein synthetisches Klonierungsprodukt hergestellt. Dafür wurden jeweils 2 µl des vorwärts- und rückwärts- orientierten und einfach konzentrierten Oligomeres mit 4 µl T4 Ligase Buffer (5x, Invitrogen) in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler für 2 min bei 95 °C inkubiert und anschließend die Temperatur pro Minute um 1°C bis auf 4 °C gesenkt. Es entstand das doppelsträngige *Insert*, das zu Klonierungszwecken genutzt werden kann. Abbildung 4 zeigt das gelelektrophoretische Bild des NGF-Klonierungsprodukts.

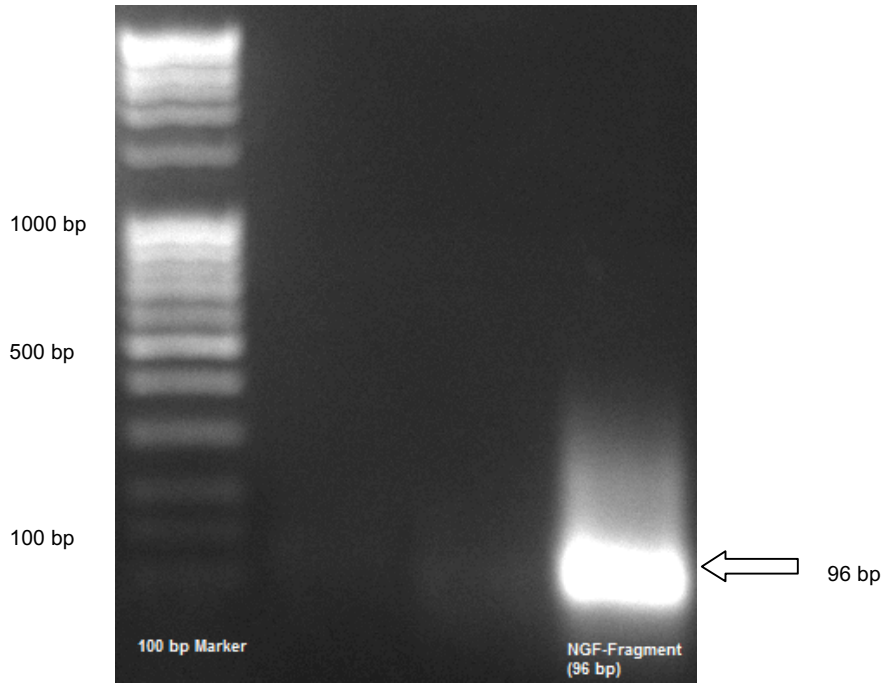


Abb. 4: Gelektrophoretisches Bild des NGF-Klonierungsprodukts. Der Pfeil markiert das aus zwei gegenläufig orientierten Oligomeren hergestellte NGF-Klonierungsprodukt (Fragmentlänge: 96 Basenpaare (bp)).

2.2.15 Isolierung von PCR-Produkten bzw. DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

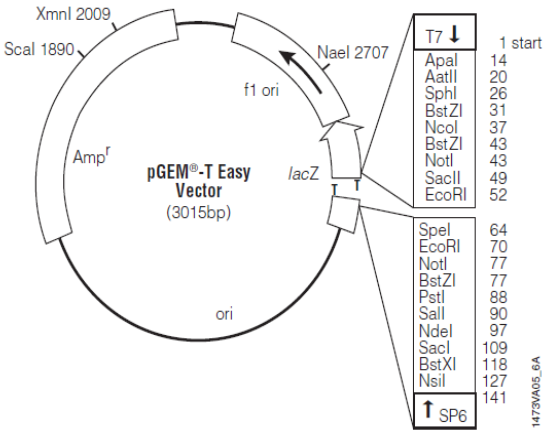
Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit verwendet.

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht zügig aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Proben wurden gewogen und mit 300 µl des QX1 Puffers pro 100 mg Gel versetzt. Dieser Puffer sorgt für die Auflösung des Agarosegels. Danach wurde 10 µl QIAEX II zu den Proben gegeben. Die Proben wurden 10 min bei 50°C inkubiert, um die Agarose vollständig aufzulösen und die DNA Fragmente an die QIAEX II Partikel binden zu lassen. Alle 2 min wurden die Proben gevortext. Zu beachten war hier, dass die Lösung den richtigen pH-Wert behielt, um eine optimale DNA Bindung an die QIAEX II Partikel zu gewährleisten. Der optimale pH-Wert liegt bei ≤ 7,5, erkennbar an der bestehenden Gelbfärbung der Lösung. Die Proben wurden für 30 sek bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit (≥ 10000 x g) zentrifugiert. Durch diesen Schritt bildete sich ein Pellet und ein Überstand, der abpipettiert wurde. Zur Entfernung von Agaroseresten wurde 500 µl QX1 Puffer zu den Proben gegeben. Die Proben wurden gevortext und für 30 sek zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert. Um verbliebene Salze aus den Proben zu entfernen, wurde das Pellet mit 500 µl PE Puffer versetzt. Die Proben wurden 30 sek zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Das Pellet wurde 10-15 min bei Raumtemperatur getrocknet, bis es eine weiße Farbe angenommen hatte. Es wurde in 20 µl H_2O aufgelöst, gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 30 sek zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gereinigten DNA-Fragmente und wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrop 1000 Systems spektrophotometrisch bestimmt.
Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.16 Klonierung mit dem pGEM®-T Easy Vektor (Promega)

pGEM ®-T Easy Vektoren (zum Aufbau s. Abbildung 5) sind lineare Vektoren, die an beiden 3´ Enden einen einsträngigen Thymidin-Überhang besitzen. Dieser Überhang gewährleistet einen größeren Erfolg der Klonierung, da er einen direkten Anknüpfungspunkt für PCR-Produkte mit einem 3´ Überhang aus Adeninresten darstellt. Dieser entsteht nur nach Amplifikation der DNA mit bestimmten Polymerasen. Die in dieser Studie verwendete Taq-Polymerase gehört zu dieser Gruppe von Enzymen.



pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
lacZ start codon	180
lac operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
lac operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Abb. 5: pGEM®-T Easy Vektor; Quelle: Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega; Part# TM042, revised 12/10)

Für die Klonierung, d.h. für das Einbringen des zu untersuchenden PCR-Produkts in den Vektor, wurden folgende Komponenten benötigt (Tabelle 11):

Reaktionskomponenten	**Standard-reaktion**	**Positivkontrolle**	**Hintergrund-kontrolle**
2x Rapid Ligation Buffer	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PCR-Produkt	X µl *	-	-
Control Insert DNA	-	2 µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Nukleasefreies Wasser auf ein Endvolumen von	**10 µl**	**10 µl**	**10 µl**

Tabelle 11: Komponenten zur Klonierung eines PCR-Produkts in den pGEM®-T Easy Vector

* Zur Bestimmung der einzusetzenden PCR-Produkt (*Insert)*-Menge wurde folgende Berechnung durchgeführt (Menge u.a. abhängig vom geeigneten molaren Verhältnis zwischen *Insert* und Vektor):

((Menge d. Vektors (in ng) x Größe des *Inserts* (in kb)) ÷ (Größe des Vektors (in kb)) multipliziert mit dem geeigneten molaren Verhältnis zwischen *Insert* und Vektor (in dieser Studie 3:1) = Menge des *Insert* (in ng).

Die Reaktionsansätze wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.17 Herstellung kompetenter Zellen aus einem *Escherichia coli* (*E.coli*) XL1-blauen Bakterienstamm nach der Calciumchloridmethode ($CaCl_2$ – Methode)

Die für die Transformation genutzten kompetenten Zellen wurden aus einer *E. coli* XL1 Stocklösung hergestellt. Hierzu wurde die $CaCl_2$-Methode angewendet.
In einem ersten Schritt wurde LB Medium (5 ml) mit 10 µg/ml Tetracyclin versetzt. Hierzu wurde der *E. coli* XL1 - Stamm gegeben und bei 37°C und 276 rpm über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 200 ml frisches LB Medium übertragen, welches abermals mit Tetracyclin (10 µg/ml) versetzt wurde. Dieser Ansatz wurde so lange bei 37°C und 276 rpm geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD 600) der Suspension von ca. 0,3 erreicht war. Die Zellen wurden auf vier 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 4°C und 3000 rcf für 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 25 ml, ca. 8°C kaltem $CaCl_2$ (100 mM) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach bei 4°C und 3000 rcf für 10 min zentrifugiert. Es bildete sich erneut ein Zellpellet, welches in 2,5 ml, 8°C kaltem $CaCl_2$ (100 mM) (zusätzlich mit einem Glycerolanteil von 15 %) resuspendiert wurde. Die Zellen wurden eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt (300 µl/ je Reaktionsgefäß) und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die transformationskompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.18 Transformation von *E. coli* XL1-blauen kompetenten Zellen mit dem pGEM®-T Easy Vektor

Die transformationskompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl der Klonierungsreaktion vermischt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis.
Danach wurden die Zellen 5 min lang einer Temperatur von 37 °C ausgesetzt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt führt zu einer verbesserten Aufnahme des Plasmids in die Bakterienzellen. Jedem Reaktionsansatz wurde 1 ml LB Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C und 276 rpm geschüttelt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 5000 rpm. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl verworfen. In dem noch verbliebenen LB-Medium wurden die Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden auf Petrischalen ausplattiert. Diese enthielten LB-Medium, das mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt war. Zusätzlich wurde jeder Schale jeweils 40 µl IPTG (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid, 30 mg/ml, 126 mM) und 40 µl X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid, 20 mg/ml, 49 mM) beigefügt.
IPTG und X-Gal dienen der Selektion von Bakterienkolonien nach dem Blau-Weiß-Screening. Bakterien, die ein Plasmid mit Insert (=untersuchte DNA-Sequenz) aufgenommen haben, bilden weiße Kolonien. Kolonien, die kein Plasmid oder Plasmid ohne Insert aufgenommen haben, bilden blaue Kolonien. Grundlage hierfür ist die Unterbrechung des lac Z-Gens auf dem pGEM®-T Easy Vektor, in dessen Bereich das Insert einkloniert werden soll. Dieses Gen codiert einen Teil des Enzyms β-Galaktosidase. Die intakte β-Galaktosidase spaltet Aglycon (5-Brom-4-Chlorindol) von X-Gal ab. Durch den Luftsauerstoff kommt es zur Oxidation von Aglycon zu blauem Indigo, das die Blaufärbung der Kolonien bedingt. Ist das lacZ Gen durch ein Insert unterbrochen (und damit keine funktionsfähige β-Galaktosidase mehr vorhanden), kann diese enzymatische Reaktion nicht mehr stattfinden und die Kolonien zeigen eine weiße Färbung.
Die Platten wurden über Nacht (12-16 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5-10 weiße Kolonien (enthalten Plasmid mit Insert, s.o.) gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C und 276 rpm geschüttelt.

2.2.19 Präparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Minikultur (Minipräp) mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen

Zunächst wurden die Bakterienzellen aus einer 3,5 ml Übernachtkultur geerntet, indem diese bei 21 °C und 6800 rcf für 3 min zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in 250 µl P1 Puffer durch Resuspendierung aufgelöst. Hierzu wurde 250 µl P2 Puffer gegeben. Die Proben wurden vorsichtig durchmischt. Danach wurde jede Probe mit 350 µl N3 Puffer versetzt. Es folgte erneut eine vorsichtige Durchmischung. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 21°C und 18000 rcf zentrifugiert. Der Plasmid-enthaltende Überstand wurde in die *QIAprep spin column* pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden für 1 min bei 18000 rcf unter 21 °C zentrifugiert. Die Membran wurde mit PE Puffer unter Zentrifugation gewaschen. Das Eluieren der DNA aus der Membran erfolgte mit 50 µl EB Puffer.
Die Proben wurden für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des Nanodrop 1000 Systems. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.20 Sequenzierung der Vektoren

Die Sequenzierungen wurden im Biologisch Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Dazu wurden 500-600 ng der zu sequenzierenden DNA in einer Konzentration von 100-250 ng/µl eingesetzt. Die übermittelten Sequenzen wurden mithilfe der Programme Chromas und Clustal W2 – Multiple Sequence Alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) analysiert.

2.2.21 Restriktionsverdau des pGEM®-T Easy Vektor

Das Klonieren der gewünschten let-7c Sequenz in den pGEM®-T Easy Vektor war ein Zwischenschritt auf dem Weg zum Einklonieren des Abschnitts in den pcDNA™ 3.1(+) Vektor. Dieser erfolgte zur weiteren Amplifizierung der Sequenz. Zunächst wurde das let-7c *Insert* aus dem pGEM®-T Easy Vektor

herausgeschnitten. Dies erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und BamHI. Der Zielvektor pcDNA^{TM} 3.1(+) wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, wodurch komplementäre Enden (*sticky ends*) entstanden, die Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation zwischen Vektor und *Insert* sind. Für den Restriktionsverdau wurden zu 2 µg der DNA 0,5 µl des jeweiligen Enzyms (10 U/µl) sowie 2 µl des entsprechenden Puffers (10x) gegeben. Mit Milli-Q H_2O wurde der Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Es folgte eine Inkubationszeit von 1,5-2 h bei 37°C. Zur Enzyminaktivierung wurden die Proben 15 min bei 65 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte mit einer Gelelektrophorese (1% Agarosegel).
Die Inserts wurden mithilfe der unter 2.2.15 beschriebenen Methode aus dem Gel isoliert und danach in den nächsten Vektor einkloniert.

2.2.22 Klonieren von DNA-Fragmenten in den pcDNA und pMIR-REPORT Vektor

Bei den für die Transfektion verwendeten Vektoren handelte es sich um den pcDNA^{TM}3.1(+) Vektor (Invitrogen) für die miRNA-let-7c sowie das pMIR-REPORT^{TM} System (Applied Biosystems) für die NGF-Sequenz (wobei die NGF Sequenz ohne Zwischenschritt direkt in ihren Zielvektor kloniert wurde).
Der pcDNA^{TM}3.1 (+) Vektor hat eine Größe von 5,4 kbp und wurde speziell für hochstabile und transiente Genexpressionen in Säugetierzellen entwickelt (für Aufbau des Vektors s. Abbildung 6).

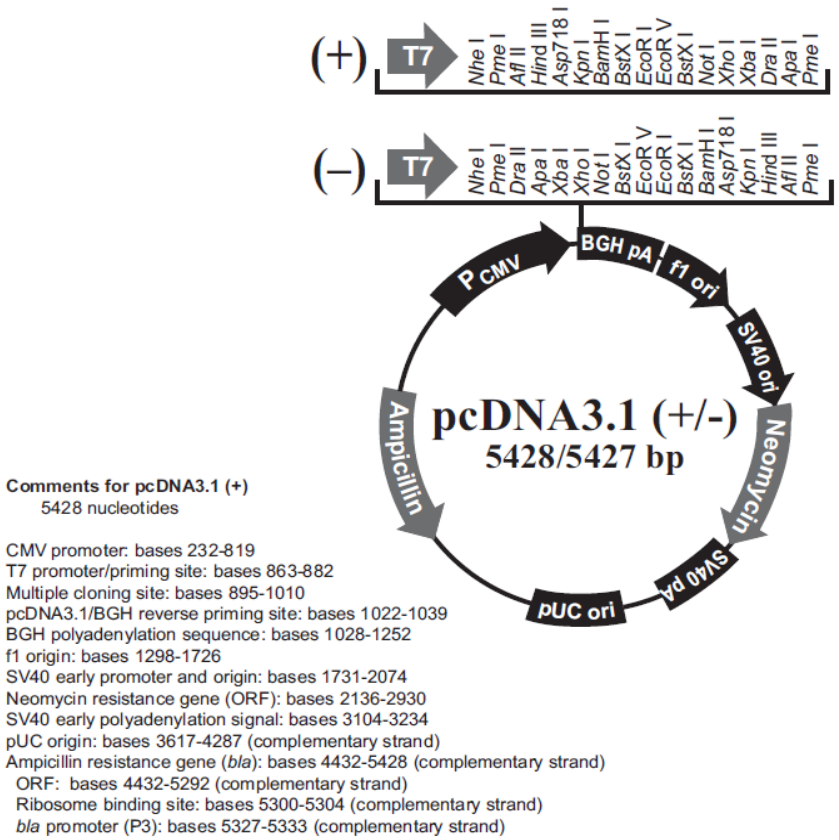


Abb. 6: pcDNA Vektor (Invitrogen); Quelle: User Manual pcDNA ™ 3.1 (+/-), Invitrogen™, Catalog nos. V790-20 and V795-20, Version J, 5 August 2008, 28-0104

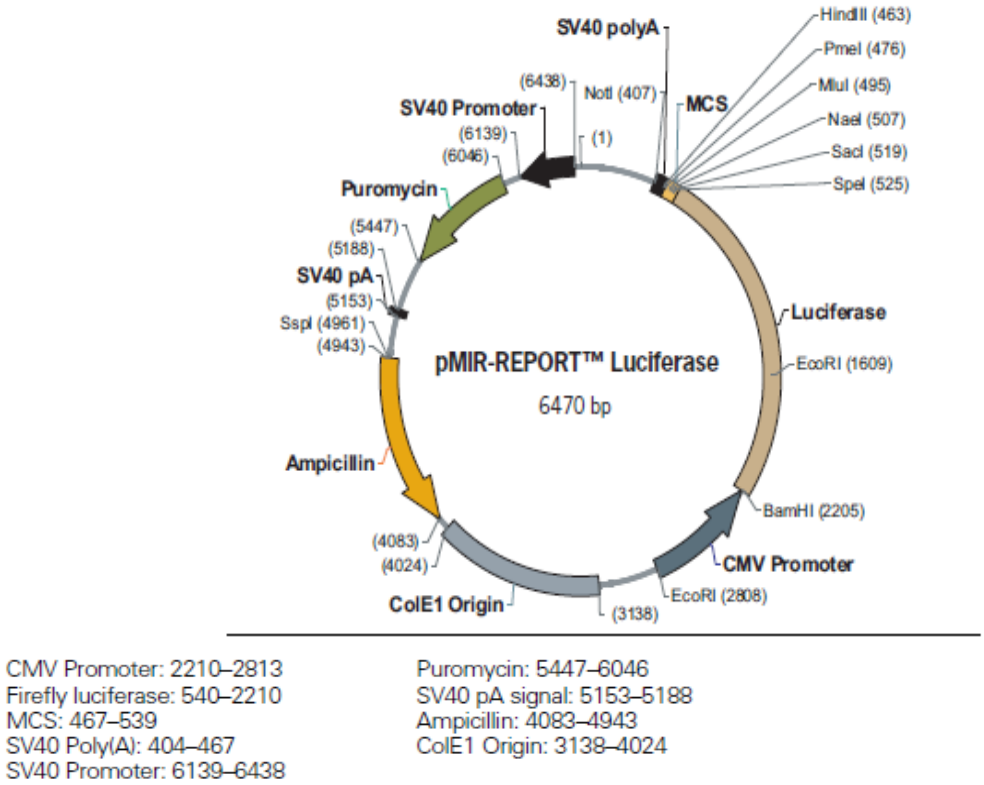


Abb. 7: pMIR-REPORT™ Luciferase Vektor; Quelle: Protokoll "pMIR-Report™ System, miRNA Expression Reporter Vector" (Applied Biosystems, Partnumber AM 5795, Revision D, Revision Date: October 24, 2008).

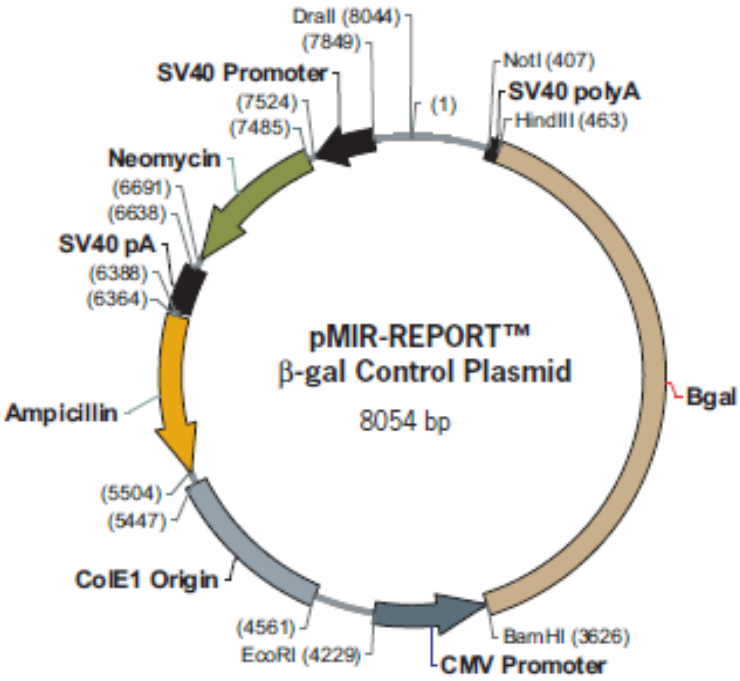


Figure 2. pMIR-REPORT β-gal Control Plasmid

CMV Promoter: 3627–4232
β-gal: 463–3627
SV40 Poly(A): 404–463
SV40 Promoter: 7524–7849
Neomycin: 6691–7485
SV40 pA signal: 6388–6638
Ampicillin: 5504–6364
ColE1 Origin: 4561–5447

Abb. 8: **pMIR-REPORT™ β-gal *Control Plasmid*** ; Quelle: Protokoll "pMIR-Report™ System, miRNA Expression Reporter Vector" (Applied Biosystems, Partnumber AM 5795, Revision D, Revision Date: October 24, 2008)

Das pMIR- REPORT™ System von Applied Biosystems umfasst dagegen zwei Vektoren (s. Abbildungen 7 und 8).

Gemeinsam bilden sie ein System, mit dem eine quantitative Messung der miRNA Interaktion mit ihrem potentiellen *Target* durchgeführt werden kann. Der pMIR-REPORT™ Luciferase Vektor enthält ein Luciferase Reportergen, in dessen 3´UTR-Region die *Multiple Cloning Site* (MCS) liegt, in die das *Insert* kloniert werden kann. Der β-gal Vektor dient der Normierung der Ergebnisse, die z.B. aufgrund von Unterschieden bei der Transfektionseffizienz notwendig ist.

Vor der Klonierung wurde der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten wie das *Insert*. Dieser Schritt wurde wie in Kapitel 2.2.21 beschrieben durchgeführt. Der Vektor für die Klonierung der NGF-Sequenz wurde mit den Restriktionsendonukleasen SpeI und HindIII geschnitten. Der Restriktionsverdau

des Vektors, in den die Sequenz der miRNA-let-7c kloniert werden sollte, erfolgte mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI.
Die Ligation erfolgte mithilfe der T4 DNA Ligase von Invitrogen (0,1 U). Es wurden 30 fmol Vektor sowie 90 fmol Insert eingesetzt. Dazu wurden 4 µl des Ligase Reaction Buffers (5x Invitrogen) pipettiert und 1µl der T4 DNA Ligase (0,1 U). Der Ligationsansatz wurde mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde 1 µl einer 0,5 M EDTA Lösung zugegeben. Das ligierte Produkt wurde bis zur Transformation bei 4°C gelagert.

2.2.23 Transformation von *E.coli* XL1-blauen kompetenten Zellen mit dem pcDNA™3.1(+) Vektor und dem pMIR-REPORT System

Dieser Schritt wurde, wie für den pGEM®-T Easy Vector beschrieben, durchgeführt (s. Kapitel 2.2.18). Die sich anschließenden Schritte der Übernachtkultur, des Minipreps sowie Sequenzierung entsprachen ebenfalls dem oben beschriebenen Vorgehen (s. Kapitel 2.2.19+2.2.20).

2.2.24 Plasmidpräparation aus einer Bakterien-Maxikultur (Maxiprep)

Für jedes Plasmid wurden jeweils 3 Kolonien gepickt und in einer Übernachtkultur (5 ml LB + 5 µl Ampicillin) bei 37 °C und 276 rpm geschüttelt. Hieraus wurden je Plasmid 200 µl entnommen und in 200 ml LB Medium (+ 200 µl Ampicillin) gegeben. Es erfolgte eine weitere Übernachtkultur bei 37°C und 276 rpm. Die Isolierung der Plasmide aus dieser Übernachtkultur erfolgte mithilfe des Plasmid Maxi Kit von Qiagen.
Hierfür wurde die Übernachtkultur mit einem Gesamtvolumen von etwa 200 ml auf vier 50 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Proben wurden für 30 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in P1 Puffer gelöst und in ein Reaktionsgefäß übertragen. Hierzu wurden 10 ml P2 Puffer pipettiert. Die Proben wurden vorsichtig geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 10 ml P3 Puffer dazugegeben und erneut geschwenkt. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 20 min. Danach

wurden die Proben bei 4000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Mulltrichter gefiltert und in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Ein weiterer Zentrifugationsschritt erfolgte (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in die zuvor äquilibrierte QIAGEN-tip 500-Säule übertragen. Die Säule wurde zwei Mal mit QC Puffer gewaschen. Die Eluierung der DNA erfolgte mit 15 ml QF Puffer. Zu dem Eluat wurde 10,5 ml Isopropanol (100%) pipettiert. Die Probe wurde durchmischt und für 1 h bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml Ethanol (70%) gewaschen. Die Proben wurden erneut für 1 h bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert. Die Proben wurden für 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl TRIS Puffer (pH-Wert 8) gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mithilfe des Nanodrop 1000 Systems bestimmt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.25 Transfektion von HEK 293 Zellen mithilfe von Calciumphosphat

Aussäen der Zellen

Zur Transfektion wurden sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche *Human Embryonic Kidney* (HEK 293) Zellen verwendet. Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe von Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mithilfe von Trypan Blue bestimmt.

Es wurden ca. 1 Mio. Zellen je 60 mm Zellkulturschale ausgesät. Das Gesamtvolumen je Zellkulturschale wurde mit DMEM Medium des Herstellers PAN ^{TM} BIOTECH GmbH auf 4 ml gebracht. Je Gruppe wurden 4 Zellkulturschalen angesetzt (Gruppe 1: pcDNA Vektor + miRNA-let-7c; Gruppe 2 = Kontrollgruppe: pcDNA Vektor ohne miRNA- let-7c). Die Zellen wurden nach dem Aussäen bei 37 °C und einem CO_2 Wert von 5 % über Nacht inkubiert.

Transfektion

Zwei Stunden vor Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Für die Transfektion wurde sterilisierte 2x HBSS (***H**epes **B**uffered **S**aline **S**olution*) Lösung (pH Wert: 7,08 +/- 0,05) benötigt (Tabelle 12).

NaCl	20,0 g
KCl	0,93 g
Na_2HPO_4 x $2H_2O$ (2,5 mM)	0,334 g
Glucose	2,5 g
Hepes	12,5 g
MQ Wasser	Ad 250 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung einer 10x konzentrierten HBSS Lösung

Je Gruppe wurden zwei Reaktionsgefäße vorbereitet. In ein Reaktionsgefäß wurden 1100 µl der 2x HBSS Lösung pipettiert. In das andere Gefäß wurde die DNA mit Milli-Q Wasser auf ein Volumen von 990 µl gebracht und 110 µl 2,5 M Calciumchlorid (filtersterilisiert, in Milli-Q gelöst) dazugegeben. Die Vektoren wurden in folgender Menge eingesetzt (Tabelle 13):

pMIR-REPORT Luciferase Vector + Zielsequenz (NGF)	1 µg
pMIR-REPORT β- Galaktosidase Vektor	1 µg
pcDNA 3.1 + miRNA (let-7c)	10 µg
pcDNA 3.1 ohne miRNA	10 µg

Tabelle 13: Benötigte DNA-Vektor-Mengen je 60 mm Zellkulturschale

Die DNA wurde zu der 2x HBSS Lösung pipettiert. Eine Trübung der Probe zeigte das Ausfällen der DNA durch Calciumphosphat an. Jede Zellkulturschale wurde mit 500 µl der DNA-HBSS Lösung versetzt und die Zellen bei 37 °C und einem CO_2 von 5 % über Nacht inkubiert. Nach etwa 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet.

Ernten der Zellen

Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 2 ml 4°C kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde durch 1 ml frisches PBS ersetzt. Die Zellen wurden mithilfe eines Schabers abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 12000 g und 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Die Zellpellets wurden in 50 µl einfach konzentriertem *Reporter Lysis Buffer* (RLB, Promega) gelöst. Die Proben wurden gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei 12000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.26 Luciferase Assay

Die Untersuchung einer Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und dem NGF wurde mit einem Luciferase Assay durchgeführt.
Es wurde die Luciferase aus dem Leuchtkäfer genutzt, die Luciferin in Anwesenheit von Sauerstoff, ATP und Magnesiumionen zu AMP, Kohlendioxid und Licht umsetzt. Das dabei emittierte Licht ist proportional zur Luciferaseaktivität.
Ein Sequenzabschnitt des pMIR-Report Vektors kodiert für diese Luciferase. Hinter der für die Luciferase kodierenden Region liegt die *Multiple Cloning Site* (MCS), in die die NGF-Sequenz kloniert wurde. Die MCS wiederum liegt innerhalb einer Region auf dem Plasmid, die nach der Transkription der Luciferase in deren 3´UTR Region liegt. Ist die einklonierte NGF-Sequenz Interaktionspartner der miRNA-let-7c, kommt es zur Bindung der miRNA an die 3´UTR der Luciferase. Dies führt zu einer verminderten Translation und somit zu einer geringeren Luciferaseaktivität in der Probe. Dadurch läuft die oben beschriebene Reaktion weniger stark ab. Das Lichtsignal wird abgeschwächt. Für die Durchführung des Assays wurde das ***W****orking* ***L****uciferase* ***A****ssay* ***R****eagent* (WLAR-Lösung) benötigt. WLAR setzt sich aus neun Volumina ***L****uciferase* ***A****ssay* ***R****eagent* ***S****tock* (LARS) und einem Volumen Luciferin-Lösung (Acros) zusammen. Die Luciferin-Lösung ist sehr lichtempfindlich, sodass die Lichtexpositionszeit möglichst kurz gehalten wurde.
Es wurden für jede Probe 5 µl Zellextrakt in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Dazu wurden 100 µl der WLAR-Lösung pipettiert. Das Gesamtvolumen je Well wurde mittels einfach konzentriertem RLB (Promega) auf 110 µl aufgefüllt. Als Leerwert wurden 10 µl RLB und 100 µl WLAR-Lösung verwendet. Die Messung im Luminometer schloss sich unmittelbar danach an. Tabelle 14 zeigt die Zusammensetzung der LARS-Lösung.

LARS (Luciferase Assay Reagent Stock)	
Tricine, pH-Wert 8	22 mM
$(MgCO_3)_4Mg(OH)_25H_2O$	1,177 mM
$MgSO_47H_2O$	2,94 mM
EDTA, Na-Salz	0,11 mM
DTT	36,3 mM
Coenzym A, Na-Salz	297 µM
ATP, Na-Salz	583 µM

Tabelle 14: Komponenten von LARS (Luciferase Assay Reagent Stock)

2.2.27 β-Galaktosidase Assay

Um die Ergebnisse des Luciferase Assay zu normalisieren, wurde das Enzym β-Galaktosidase als interner Standard verwendet. Für die Aktivitätsmessung dieses Enzyms wurde der ONPG Test angewendet. Dafür wurde jedem Transfektionsansatz das pMIR-Report™ β-gal Control Plasmid zugefügt.
Tabelle 15 zeigt, welche Komponenten für jeden Reaktionsansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert wurden:

100x Mg-Lösung (bestehend aus 0,1 M $MgCl_2$+4,5 M β- Mercaptoethanol)	3 µl
1x O-Nitrophenyl-β-D-Galactosidase (ONPG) 4 mg/ml	66 µl
Zellextrakt	30 µl (der verdünnten Probe)
0,1 M Natriumphosphat (pH-Wert 7,5)	201 µl
Gesamtvolumen	300 µl

Tabelle 15: Komponenten für den β – Galaktosidase Assay

Als Leerwert diente 1x RLB (anstelle von 30 µl Zellextrakt).
Die Platte wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dabei entwickelte jeder Ansatz eine gelbe Farbe. Die gelbe Farbe beruht auf der β-Galaktosidase-katalysierten Hydrolyse von ONPG zu Galaktose und o-Nitrophenol (gelbe Farbe).
Bei der colorimetrischen Messung (420 nm) wurden OD Werte zwischen 0,2 und 0,8 erzielt. Um einen Wert in diesem Bereich zu erhalten, wurden die Zellextrakte

zunächst 75x verdünnt. Anhand der Geschwindigkeit des Farbumschlages (farblos→gelb) konnte eine geeignete Verdünnung abgeschätzt werden. Erfolgte der Farbumschlag in weniger als 10 min, wurden die Zellextrakte 150x verdünnt.
Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde anhand folgender Formel berechnet:

1 *Unit* (β-Galaktosidase) = 380 x A_{420} / Zeit (min)

- A_{420}: Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm
- 380: Konstante, nach der 1 *Unit* äquivalent ist zu einem Umsatz von 1 nmol ONPG pro Minute bei 37°C
- 1 *Unit* β-Galaktosidase (z.B. aus E.coli): diejenige Enzymmenge, die 1 µmol ONPG pro Minute bei 37°C umsetzt

Die Normalisierung der Ergebnisse des Luciferase Assays erfolgte durch Division der im Assay gemessenen Lumineszenz durch die Aktivität (*Units*) der β-Galaktosidase.
Für jede Gruppe (Gruppe 1: pcDNA mit let-7c, Gruppe 2: pcDNA ohne let-7c) wurden jeweils 4 Proben untersucht und die Normalisierung separat durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte aus jeweils 4 Proben gebildet und anhand dessen der *Fold Change* berechnet, der eine Aussage über den Unterschied der Lumineszenzen zwischen beiden Gruppen zuließ. Die Signifikanztestung erfolgte anhand des ungepaarten t-Tests, wobei p-Werte ≤0,05 als signifikant angesehen wurden.

2.2.28 Statistik

Eines der Ziele der Arbeit war es, die differentielle Expression von miRNAs zu vier Zeitpunkten nach der Induktion von neuropathischen Schmerzen durch das *Chronic Constriction Injury* Modell bei der Ratte zu untersuchen. Von Interesse war in diesem Zusammenhang die relative Quantifizierung, die eine Aussage darüber zulässt, ob eine miRNA nach induzierter Neuropathie verstärkt oder vermindert exprimiert vorlag. Hierfür wurde eine Normalisierung der Expression des Zielgens durchgeführt, indem die Expression des Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Kontrollgens (*housekeeping gene*) bezogen wurde [116].

Die Normalisierung der miRNA-Expression erfolgte mit dem *Housekeeper* U6, bei der Untersuchung der NGF-mRNA-Expression mit GAPDH. Die Expressionsunterschiede zwischen CCI- und *Sham*-Tieren wurden zunächst mithilfe der Delta-Delta-CT Methode berechnet (Formel modif. nach Pfaffl 2004 [116]):

$\Delta CT = CT\ (let\text{-}7c/NGF) - CT\ (U6/GAPDH)$
$\Delta\Delta CT = \Delta CT\ (CCI) - \Delta CT\ (Sham)$
$Ratio = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Der CT-Wert (*cycle threshold*) ist die Anzahl an PCR- Zyklen, nach der die „Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt“ [115]. Er befindet sich am Anfang der exponentiellen Phase (zwischen Start- und Plateauphase) der PCR und wird für die Quantifizierung herangezogen [115]. Voraussetzung für die Korrektheit der Delta-Delta-CT Methode ist eine optimale PCR-Effizienz, d.h. es kommt in jedem PCR-Zyklus zu einer Verdopplung der DNA-Menge (PCR-Effizienz = 2) [116]. Diese entspricht in der Realität allerdings 1,7-1,9 [117]. Daher benötigt man für ein aussagekräftiges Ergebnis eine Effizienzkorrektur [115]. Diese wurde mit dem Programm REST 2009 (*relative expression software tool*, http://www.gene-quantification.de/rest.html) vorgenommen [116]. Durch das Programm erfolgt eine statistische Überprüfung der Ergebnisse mit Berechnung der relativen Expressionsunterschiede und des Signifikanzniveaus (p-Wert). Unterschiede beim Vergleich der Expressionen wurden bei einem p-Wert $\leq 0{,}05$ als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 miRNA Microarray

Die Analyse des miRNA Microarray ergab zu jedem der vier Untersuchungszeitpunkte (4 h, 1 d, 6 d und 12 d) differentiell exprimierte miRNAs im Spinalganglion der Ratte beim Vergleich der CCI-behandelten Gruppe mit der scheinbehandelten Gruppe (*Sham*).
Tabelle 16 zeigt die mit t-Test (*unpaired* t-Test, *unequal variance*, $p<0,05$) ermittelte Anzahl der signifikant differentiell exprimierten miRNAs zu den vorgegebenen Untersuchungszeitpunkten.

Untersuchungszeitpunkt	**Gesamtzahl differentiell exprimierter miRNAs**	**Anzahl verstärkt exprimierter miRNAs**	**Anzahl vermindert exprimierter miRNAs**
4 h	47	25	22
1 d	3	-	3
6 d	26	13	13
12 d	27	20	7

Tabelle 16: Anzahl differentiell exprimierter miRNAs zu den vier Untersuchungszeitpunkten 4 h, 1 d, 6 d, 12 d beim Vergleich der CCI-behandelten Gruppe mit *Sham*. Zusätzlich enthält die Tabelle die Anzahl der miRNAs, welche zu den vorgegebenen Untersuchungszeitpunkten nach CCI verstärkt bzw. vermindert exprimiert wurden

Hierbei war keine miRNA zu allen vier Untersuchungszeitpunkten in ihrer Expression verändert. Eine miRNA, die miRNA-34a, war zu den Untersuchungszeitpunkten 4 h, 6 d und 12 d signifikant differentiell exprimiert.
Abbildung 9 veranschaulicht die differentielle Expression der miRNAs zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten.

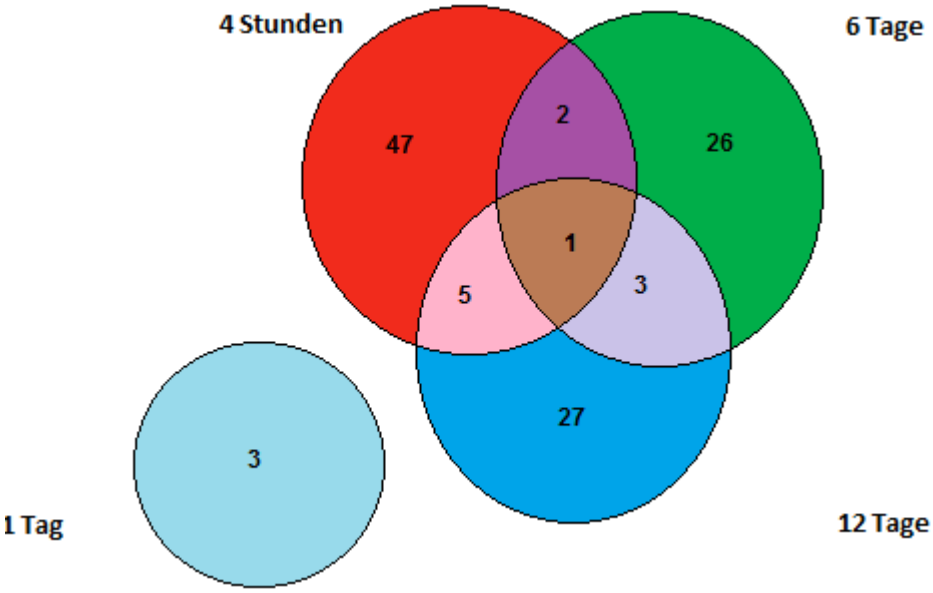


Abb. 9: Ergebnis des miRNA Microarrays. Dargestellt ist die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten miRNAs zu den Untersuchungszeitpunkten 4 h, 1 d, 6 d, 12 d beim Vergleich der CCI-behandelten Gruppe mit *Sham.* Die Zahlen innerhalb der überlappenden Bereiche stehen für miRNA-Entitäten, welche zu mehreren Zeitpunkten gleichzeitig differentiell exprimiert waren.

Aufgrund ihrer Detektion im Array sowie einer zuvor beschriebenen hohen Expression im Rückenmark derselben Tiere [107] wurde die Expression der miRNA-let-7c näher charakterisiert. Der Array ergab für diese miRNA eine signifikante differentielle Expression zum Untersuchungszeitpunkt 4 h mit einer Expressionsabnahme in der CCI-behandelten Gruppe im Vergleich zu *Sham* (*Fold Change*: - 1,25, p-Wert: 0,016, s. Tabelle 20 im Anhang).

3.2 Relative Expression der miRNA-let-7c

Die relative Expression der miRNA-let-7c in der Real-Time PCR ergab eine signifikante Abnahme der Expression zum Untersuchungszeitpunkt 4 h um den Faktor 0,69 beim Vergleich der CCI-behandelten Gruppe mit der scheinbehandelten Gruppe (p=0,004 vs. *Sham*). Zu den drei weiteren Untersuchungszeitpunkten (1 d, 4 d, 12 d) zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied nach CCI im Vergleich zu Sham. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 und Abbildung 10 dargestellt.

Untersuchungszeitpunkt	Faktor d. relativen Expressionsänderung (CCI verglichen mit *Sham*)	p-Wert
4 h	0,69	0,004
1 d	0,93	0,647
6 d	1,14	0,224
12 d	1,18	0,187

Tabelle 17: Relative Expression der miRNA-let-7c zu den vier Untersuchungszeitpunkten 4 h, 1 d, 6 d, 12 d im Spinalganglion der Ratte nach CCI in der qRT-PCR. Dargestellt sind die relativen Expressionsänderungen der miRNA-let-7c beim Vergleich CCI-Gruppe vs. *Sham* (je Zeitpunkt und Kondition 6 Versuchstiere) zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten und dem dazugehörigen p-Wert.

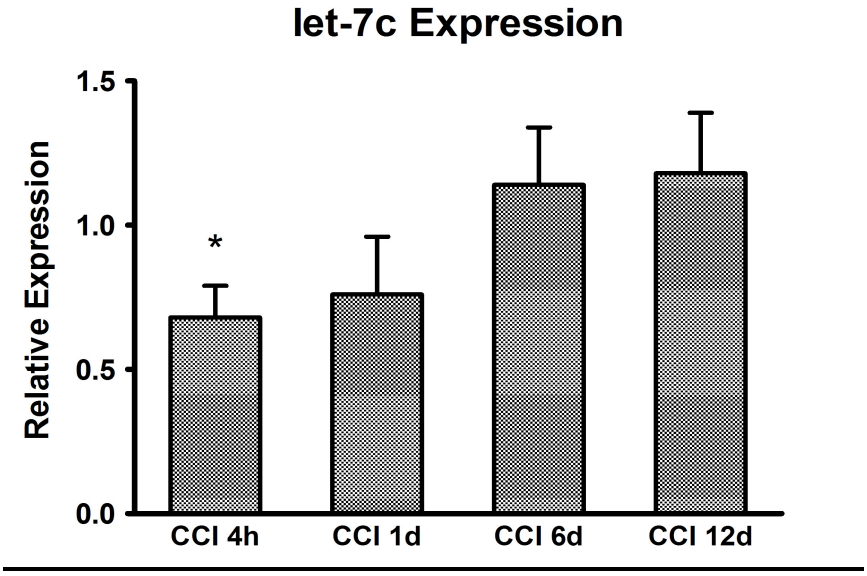


Abb. 10: Relative Expression der miRNA-let-7c beim Vergleich CCI-Gruppe vs. *Sham* zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten in der qRT-PCR. Je Gruppe (CCI vs. *Sham* und Untersuchungszeitpunkt) 6 Versuchstiere. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler, *p<0,05 vs. *Sham.*

3.3 TargetScan

Die bioinformatische Analyse mittels TargetScan ergab eine mögliche Interaktion der miRNA-let-7c mit der mRNA des Beta Polypeptids des NGF. Die über TargetScan ermittelte mögliche Bindungsstelle zwischen der miRNA-let-7c und der mRNA des NGF befindet sich in der 3´UTR der NGF mRNA an Basenposition 52-58 und zeigt folgende Basenabfolge:

NGF mRNA 3´UTR:	5´…CUACCUC…3´
Rno-let-7c:	3´…GAUGGAG…5´

3.4 Relative Expression des NGF

Die relative Expression der NGF mRNA zeigte eine signifikante Zunahme ($p<0,05$ vs. *Sham*) zu den Zeitpunkten 1 d (um den Faktor 1,63) und 12 d (um den Faktor 1,72) beim Vergleich der CCI behandelten Gruppe zur scheinbehandelten Gruppe (*Sham*). Nach 4 d war die relative Expression der NGF mRNA in der CCI-behandelten Gruppe tendenziell vermindert (Faktor 0,70, $p=0,101$ vs. *Sham*), nach 6 d zeigte sich kein Unterschied beim Vergleich der Expressionen beider Untersuchungsgruppen (Faktor 0,99, $p=0,888$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 und Abbildung 11 gezeigt.

Untersuchungszeitpunkt	**Faktor d. relativen Expressionsänderung (CCI verglichen mit *Sham*)**	**p-Wert**
4 h	0,70	0,101
1 d	1,63	0,027
6 d	0,99	0,888
12 d	1,72	0,011

Tabelle 18: Relative Expression der NGF- mRNA zu den vier Untersuchungszeitpunkten 4 h, 1 d, 6 d, 12 d im Spinalganglion der Ratte nach CCI in der qRT-PCR. Dargestellt sind die relativen Expressionsänderungen der mRNA des NGF beim Vergleich CCI-Gruppe vs. *Sham* (je Zeitpunkt und Kondition 6 Versuchstiere) zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten und dem dazugehörigen p-Wert.

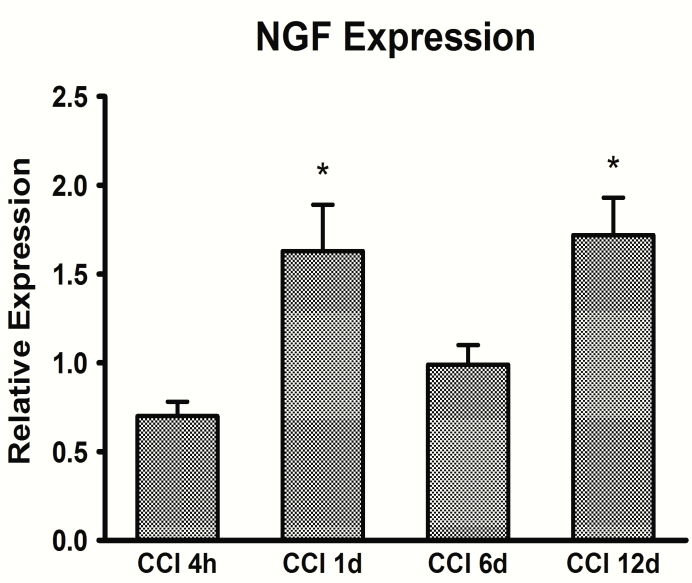


Abb. 11: Relative Expression der NGF mRNA beim Vergleich CCl-Gruppe vs. *Sham* zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten in der qRT-PCR. Je Gruppe (CCl vs. *Sham* und Untersuchungszeitpunkt) 6 Versuchstiere. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler, *p<0,05 vs. *Sham*.

3.5 Plasmidsequenzierungen

Die Sequenzierung des miRNA-let-7c enthaltenden pGEM®-T Easy Vektors zeigte folgendes Ergebnis (Abbildung 12):

```
VP1             NNNNNNNNNNGNGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGA 60
let7c           ------------------------------------------------------------

VP1             ATTCGATTAGTCGTAAGCTTGATGTGAGAAGAGGTTTCGTGTGACCTGTACTATAAACCC 120
let7c           --------------AAGCTTGATGTGAGAAGAGGTTTCGTGTGACCTGTACTATAAACCC  46
                              **********************************************

VP1             CCCAGGTCAGGGTAGTCCTGTAAGCTACAATTGAAGTCCATGTGTAAACTGCTAGAATAT 180
let7c           CCCAGGTTAGGGTAGTCCTGTAAGCTACAATTGAAGTCCATGTGTAAACTGCTAGAATAT 106
                ******* **********************************************

VP1             TCTATTTACAACCTTGCCAAGCCCTTAGGTGTTTGGCCGCCATATTTGGAGGAGCGGACT 240
let7c           TCTATTTACAACCTTGCCAAGCCCTTAGGTGTTTGGCCGCCATATTTGGAGGAGCGGACT 166
                ************************************************************

VP1             GAAGATATAATGAGTTTGAAGAAACACTGGAAGCTGTGTGCATCCGGGTTGAGGTAGTAG 300
let7c           GAAGATATAATGAGTTTGAAGAAACACTGGAAGCTGTGTGCATCCGGGTTGAGGTAGTAG 226
                ************************************************************

VP1             GTTGTATGGTTTAGAGTTACACCCTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGG 360
let7c           GTTGTATGGTTTAGAGTTACACCCTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGG 286
                ************************************************************

VP1             AGCACACTTGAGCCATCGAGGAATTCTTCATCTCTTTAATCTGACCAAGCCAACCTCTGT 420
let7c           AGCACACTTGAGCCATCGAGGAATTCTTCATCTCTTTAATCTGACCAAGCCAACCTCTGT 346
                ************************************************************

VP1             GCAAGAAAGTAATGTGTCATGAGTACGTGAGACCTTAATGCATTTACCTGATCATCCCAG 480
let7c           GCAAGAAAGTAATGTGTCATGAGTATGTGAGACCTTAATGCATTTACCTGATCATCCCAG 406
                ************************ ***********************************

VP1             ACCTGATTGTTGGGATTCTGCTTGTGGGATCCACGACTAATCACTAGTGAATTCGCGGCC 540
let7c           ACCTGATTGTTGGGATTCTGCTTGTGGGATCC---------------------------- 438
                ********************************
```

Abb. 12: Durch Sequenzierung ermittelte Basenabfolge des miRNA-let-7c enthaltenden pGEM®-T-Easy Vektors. VP1 bezeichnet den Abschnitt im pGEM®-T-Easy Vektor, der die Sequenz der miRNA-let-7c beinhaltet. Die * kennzeichnen übereinstimmende Basen zwischen der einzuklonierenden let-7c-Sequenz und der korrespondierenden Sequenz auf dem Vektor.

Die Sequenzierung des let-7c tragenden pcDNA^{TM}3.1(+) Vektors ergab folgende Basenabfolge (Abbildung 13):

```
VP5             AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGAT 409
let7c           ----------------------------------------------------AAGCTTGAT   9
VP4             AATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGAT 420
                                                                   *********

VP5             GTGAGAAGAGGTTTCGTGTGACCTGTACTATAAACCCCCCAGGTCAGGGTAGTCCTGTAA 469
let7c           GTGAGAAGAGGTTTCGTGTGACCTGTACTATAAACCCCCCAGGTTAGGGTAGTCCTGTAA  69
VP4             GTGAGAAGAGGTTTCGTGTGACCTGTACTATAAACCCCCCAGGTCAGGGTAGTCCTGTAA 480
                ********************************************* ***************

VP5             GCTACAATTGAAGTCCATGTGTAAACTGCTAGAATATTCTATTTACAACCTTGCCAAGCC 529
let7c           GCTACAATTGAAGTCCATGTGTAAACTGCTAGAATATTCTATTTACAACCTTGCCAAGCC 129
VP4             GCTACAATTGAAGTCCATGTGTAAACTGCTAGAATATTCTATTTACAACCTTGCCAAGCC 540
                ************************************************************

VP5             CTTAGGTGTTTGGCCGCCATATTTGGAGGAGCGGACTGAAGATATAATGAGTTTGAAGAA 589
let7c           CTTAGGTGTTTGGCCGCCATATTTGGAGGAGCGGACTGAAGATATAATGAGTTTGAAGAA 189
VP4             CTTAGGTGTTTGGCCGCCATATTTGGAGGAGCGGACTGAAGATATAATGAGTTTGAAGAA 600
                ************************************************************

VP5             ACACTGGAAGCTGTGTGCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTAGAGTTACACC 649
let7c           ACACTGGAAGCTGTGTGCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTAGAGTTACACC 249
VP4             ACACTGGAAGCTGTGTGCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTAGAGTTACACC 660
                ************************************************************

VP5             CTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGCACACTTGAGCCATCGAGGAA 709
let7c           CTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGCACACTTGAGCCATCGAGGAA 309
VP4             CTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGCACACTTGAGCCATCGAGGAA 720
                ************************************************************

VP5             TTCTTCATCTCTTTAATCTGACCAAGCCAACCTCTGTGCAAGAAAGTAATGTGTCATGAG 769
let7c           TTCTTCATCTCTTTAATCTGACCAAGCCAACCTCTGTGCAAGAAAGTAATGTGTCATGAG 369
VP4             TTCTTCATCTCTTTAATCTGACCAAGCCAACCTCTGTGCAAGAAAGTAATGTGTCATGAG 780
                ************************************************************

VP5             TACGTGAGACCTTAATGCATTTACCTGATCATCCCAGACCTGATTGTTGGGATTCTGCTT 829
let7c           TATGTGAGACCTTAATGCATTTACCTGATCATCCCAGACCTGATTGTTGGGATTCTGCTT 429
VP4             TACGTGAGACCTTAATGCATTTACCTGATCATCCCAGACCTGATTGTTGGGATTCTGCTT 840
                ** ************************************************************

VP5             GTGGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGC 889
let7c           GTGGGATCC---------------------------------------------------- 438
VP4             GTGGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGC 900
                *********
```

Abb.13: Durch Sequenzierung ermittelte Basenabfolge des miRNA-let-7c enthaltenden pcDNA 3.1 Vektors (Invitrogen). VP4 und VP5 bezeichnen die Abschnitte in zwei parallel synthetisierten pcDNA 3.1 Vektoren (Invitrogen), die die Sequenz der let-7c beinhalten. Die * kennzeichnen übereinstimmende Basen zwischen der einzuklonierenden let-7c-Sequenz und der korrespondierenden Sequenz auf dem Vektor.

Die Sequenz des NGF wurde ohne Zwischenschritt direkt in den pMIR-Report Vektor von Applied Biosystems kloniert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 14 gezeigt.

```
VP7         AGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTCCCA 720
NGF         ----------------------------------------------------CTAGTCCCA 9
VP6         AGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGCTCGAGTGATGAAAGCTGCGCACTAGTCCCA 710
                                                                *********

VP7         CCTGCCCCCTCCACACTCTCCTGGGCCCCTCCCTACCTCAGCCTGTAAATTATTTTAAAT 780
NGF         CCTGCCCCCTCCACACTCTCCTGGGCCCCTCCCTACCTCAGCCTGTAAATTATTTTAAAT 69
VP6         CCTGCCCCCTCCACACTCTCCTGGGCCCCTCCCTACCTCAGCCTGTAAATTATTTTAAAT 770
            ************************************************************

VP7         TATAAGGACTGCATGATAATTTATCGAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGAT 840
NGF         TATAAGGACTGCATGATAATTTATCGA------------------------------- 96
VP6         TATAAGGACTGCATGATAATTTATCGAAGCTTAATAAAGGATCTTTTATTTTCATTGGAT 830
            ***************************
```

Abb.14: Durch Sequenzierung ermittelte Basenabfolge des NGF-enthaltenden pMIR-Report Vektors (Applied Biosystems). VP6 und VP7 bezeichnen die Abschnitte in zwei parallel synthetisierten pMIR-Report Vektoren (Applied Biosystems), die die Sequenz der mRNA des NGF-Beta Polypeptids beinhalten. Die * kennzeichnen übereinstimmende Basen zwischen der einzuklonierenden NGF-Sequenz und der korrespondierenden Sequenz auf dem Vektor.

3.6 Luciferase Assay

Im Luciferase Assay zeigte sich kein Unterschied der relativen Luciferase-Aktivitäten beim Vergleich der Gruppe, die den let-7c tragenden Vektor enthielt, mit der Kontrollgruppe, welche Vektoren ohne let-7c-Sequenz enthielt (*Fold Change* 0,95, p>0,05). Abbildung 15 zeigt das Ergebnis.

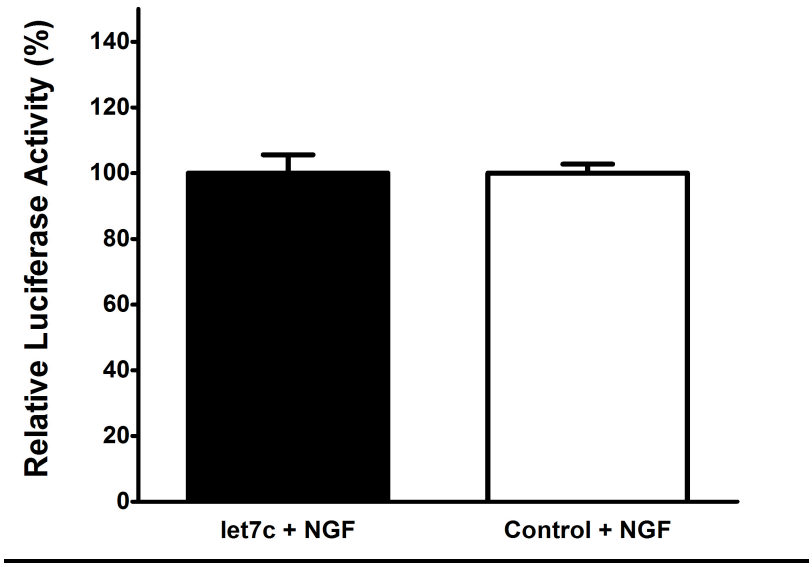


Abb. 15: MiRNA let-7c zeigt im Luciferase Assay keinen inhibierenden Effekt auf die mRNA des NGF. Dargestellt sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Untersuchungsgruppe (durch die Aktivität der β-Galaktosidase normalisierte Luciferaseaktivität), die den let-7c tragenden Vektor enthielt (schwarze Säule) im Vergleich zur Kontrollgruppe, die einen Vektor ohne let-7c-Sequenz beinhaltete (weiße Säule). Beide Gruppen enthielten einen Vektor, der mit der Sequenz der NGF-mRNA ausgestattet war. (Je Gruppe n=4, dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung, p>0,05 vs. Kontrollgruppe).

4 Diskussion

Neuropathische Schmerzen stellen weiterhin eine der am schwierigsten zu behandelnden Erkrankungen dar [112].

Die Untersuchung weiterer molekularer Mechanismen, die die Entstehung neuropathischer Schmerzen bedingen, könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte beitragen [112, 118]. MiRNAs als Regulatoren der Genexpression könnten Angriffspunkte für innovative Behandlungsformen bei der Therapie neuropathischer Schmerzen darstellen.

In dieser Studie erfolgte die Untersuchung der differentiellen miRNA-Expression im Spinalganglion der Ratte 4 h, 1 d, 6 d und 12 d nach Induktion neuropathischer Schmerzen mittels CCI sowie in den entsprechenden scheinoperierten Kotrollen. Weiterhin wurde eine mögliche Interaktion der zum Zeitpunkt 4 h differentiell exprimierten miRNA-let-7c mit dem potentiellen *Target* NGF untersucht. Sowohl experimentelle als auch klinische Studien haben gezeigt, dass der NGF bei der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Schmerzsyndrome (auch neuropathischer Schmerzen) eine wichtige Rolle spielt [63-66, 119].

Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit sind, dass an allen vier Untersuchungszeitpunkten (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) nach Induktion einer CCI im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollen eine differentielle Expression von miRNAs im Spinalganglion der Ratte zu beobachten ist. Dabei zeigt die miRNA-let-7c eine signifikant verminderte Expression zum Untersuchungszeitpunkt 4 h. Eine bioinformatische Analyse ergab, dass die mRNA des NGF ein potentielles *Target* der let-7c darstellt. Darüber hinaus kommt es durch CCI zu einer signifikanten Induktion der Expression des NGF zu den Zeitpunkten 1 d und 12 d. Eine direkte Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und der mRNA des NGF konnte im Luciferase Assay nach Transfektion entsprechender Plasmide in HEK 293 Zellen nicht gezeigt werden.

4.1 Methodik

In dieser Studie wurde mit CCI eine Neuropathie bei der Ratte hervorgerufen. Mit diesem Modell wird eine unilaterale, periphere Mononeuropathie erzeugt [113]. Es handelt sich bei CCI um ein häufig genutztes und auch seit vielen Jahren in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Modell zur Induktion neuropathischer Schmerzen bei der Ratte [45, 107, 114, 120-123].
CCI ruft bei den Versuchstieren Reaktionen hervor, die den Symptomen einer Kausalgie und des komplexen regionalen Schmerzsyndroms bei humanen Patienten sehr ähnlich sind [113]. Die Anwendung dieses Modells stellt daher einen gewissen Bezug zum Menschen her, sodass Ergebnisse aus Studien mit CCI genutzt werden könnten, um Therapiestrategien zur Behandlung neuropathischer Schmerzen zu entwickeln.

Symptome, die die Entwicklung einer Neuropathie bei den Versuchstieren anzeigen (wie z.B. Hyperalgesie und Allodynie), entwickeln sich in dem hier verwendeten experimentellen Modell innerhalb etwa einer Woche nach CCI-OP, mit einer maximalen Ausprägung der Symptomatik innerhalb der zweiten Woche [107, 120-122, 124]. Ein Anhalten des schmerzspezifischen Verhaltens wurde bis zu sieben Wochen nach OP beobachtet [113, 125]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in der vorliegenden Studie die Untersuchungszeitpunkte 4 h, 1 d, 6 d und 12 d gewählt. Diese Untersuchungszeitpunkte beinhalten Zeiträume, in denen sich die Neuropathie entwickelt und das Maximum der symptomatischen Ausprägung erreicht wird. Der Fokus der Studie liegt mit den hier gewählten Untersuchungszeitpunkten auf den relativen Expressionsveränderungen von miRNAs, die bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen eine Rolle spielen. Eine Untersuchung von Zeitpunkten zwischen der zweiten und siebten Woche, also nach Durchlaufen des symptomatischen Maximums bis zum Abklingen der Symptomatik, könnte eine differenziertere Erfassung von miRNAs erbringen, die an der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen beteiligt sind.

Die Auswahl der Spinalganglien als Untersuchungsgewebe erfolgte, da molekulare Veränderungen in dieser anatomischen Struktur laut aktuellem Kenntnisstand maßgeblich bei der Entstehung und Aufrechterhaltung

neuropathischer Schmerzen beteiligt sind [96, 126-128]. Ferner liegen bereits mehrere Studien vor, in denen Spinalganglien nach der Induktion neuropathischer Schmerzen untersucht wurden [111, 120, 122, 129-133]. Es ist denkbar, dass die Aufklärung weiterer bei neuropathischen Schmerzen ablaufenden Veränderungen der Gen- und Proteinexpression in diesem Teil des Nervensystems zu neuen therapeutischen Strategien führen könnte [134].

Die Bestimmung der relativen Expression von miRNAs erfolgte in dieser Studie mit einer Microarray-Analyse sowie der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR). Beide Verfahren stellen neben dem *Next-Generation-Sequencing (NGS)* die für die Messung von miRNA-Expressionen aktuell verfügbaren Methoden dar [135]. Der Einsatz der qRT-PCR zur Validierung von Ergebnissen einer Microarray-Untersuchung stellt ein etabliertes Verfahren dar [135]. Mehrere Studien zur Analyse von miRNAs im Rahmen chronischer Schmerzen nutzten zuvor die von uns angewandten Methoden der Microarray-Analyse und/oder der qRT-PCR [107, 112, 129-132, 136-140], sodass hier von einer bewährten und etablierten Vorgehensweise gesprochen werden kann.

Die Durchführung von Transfektionsversuchen an HEK 293 Zellen stellt ein etabliertes und in verschiedenen Studien angewandtes Modell dar [129, 136, 138]. Da die Untersuchung im Modellsystem der HEK 293 Zellen keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und dem NGF gezeigt hat, sollten in weiterführenden Studien Transfektionen in primär *neuronalen* Zellen stattfinden, da der neuropathische Schmerz eine Erkrankung des Nervensystems darstellt. Denkbar wäre der Einsatz von in Zellkultur gebrachten embryonalen Spinalganglienzellen der Ratte, wie in der Studie von Chen et al durchgeführt [67]. Des Weiteren kommt es bekanntermaßen in Spinalganglien zu verschiedenen molekularen Veränderungen bei der Entwicklung neuropathischer Schmerzen (s.o.) [96], sodass der Einsatz von DRG-Neuronen den *in vivo* Verhältnissen näher kommen würde, als der Einsatz nicht neuronaler Zellen.

Mit Luciferase Assay wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der differentiell exprimierten miRNA-let-7c und ihres bioinformatisch ermittelten *Targets* NGF untersucht. In mehreren Studien zum neuropathischen Schmerz wurde diese Form der Interaktionsmessung zwischen einer miRNA und ihrer Ziel-

mRNA erfolgreich angewandt [129, 130, 140]. Favereaux et al führten in ihrer Studie einen Luciferase Assay zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen der miRNA-103 und verschiedenen Untereinheiten des Cav 1.2 L-Typ Calciumkanals durch [140]. Hierbei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Luciferaseinhibition: beim Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen des miRNA-enthaltenden Plasmids bei der Transfektion zeigte sich nur bei der höchsten Konzentration eine Inhibition der Luciferaseaktivität. Um eine mögliche Interaktion der let-7c mit der mRNA des NGF weiter zu untersuchen, sollte die Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen des let-7c Plasmids durchgeführt werden. Des Weiteren stehen noch andere Möglichkeiten der Interaktionsmessung zur Verfügung: Chen et al wiesen einen inhibierenden Effekt der miRNA-96 auf die Expression des Natriumkanals Nav1.3 in Spinalganglien von CCI-behandelten Ratten nach, indem die miRNA ab Tag 10 nach CCI an drei aufeinanderfolgenden Tagen *intrathekal* verabreicht wurde [67]. Nach der Intervention wurde bei den Versuchstieren eine Abschwächung der neuropathischen Symptome beobachtet. Die Expression der mRNA des Natriumkanals wurde in den Spinalganglien mit der Real-Time PCR ermittelt, die Proteinexpression mit Western Blot. Zusätzlich wurde in dieser Studie die miRNA-96 bei in Zellkultur gebrachten embryonalen Spinalganglienzellen von Ratten mittels Vektor überexprimiert und der Effekt auf die Expression der mRNA des Nav1.3 Kanals mittels Real-Time PCR gemessen. Diese Methoden (*intrathekale* Applikation mit Messung des Effekts auf die Ausprägung neuropathischer Symptome sowie die Expression der *Target* mRNA und des Proteins im Zielgewebe, Überexpression der miRNA in Zellkultur mit Expressionsmessung der *Target* mRNA) sollten in weiteren Studien zur hinreichenden Untersuchung der Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und dem NGF durchgeführt werden.

Je nach Fragestellung einer Studie bieten sich noch weitere methodische Vorgehensweisen an, um Interaktionen zwischen miRNAs und mRNAs zu untersuchen. Tsuda et al stellten anhand der 3´UTR-Region des Transkriptionsfaktors *Glioma-associated antigen-1* (Gli-1) synthetische miRNAs her, die in Guanin- und Uracilreichen Regionen der 3´UTR binden und konnten so die Proliferation von pankreatischen und ovariellen Tumorzellen signifikant vermindern [141]. Diese Herangehensweise an die Nutzung der natürlichen Funktion von miRNAs bzw. an die Darstellung von Zusammenhängen zwischen miRNAs und ihren *Target*-mRNAs rollt das Feld von einer anderen Seite her auf.

In unserer Studie wurde zunächst eine im Rahmen neuropathischer Schmerzen differentiell exprimierte miRNA ermittelt. In der bioinformatischen Analyse wurde nach *Targets* dieser miRNA gesucht, die als relevant bei neuropathischen Schmerzen einzustufen sind. Mittels Luciferase Assay wurde eine mögliche Interaktion zwischen der miRNA (let-7c) und der mRNA (des Beta-Polypeptids des NGF) untersucht. Tsuda et al hingegen leiteten von ihrer Ziel-mRNA eine synthetische miRNA ab, die in weiteren Untersuchungen die Funktion des Transkriptionsfaktors Gli-1 außer Kraft gesetzt hat (mit entsprechenden weiterführenden Effekten). Die gleiche Vorgehensweise wäre mit der hier untersuchten NGF-mRNA möglich und sollte in zukünftigen Untersuchungen aufgrund des Zusammenhangs zwischen NGF und der Entstehung neuropathischer Schmerzen ([61],[63], [64], [65]) durchgeführt werden. Daraus wäre eine Entwicklung von „Anti-NGF“ Therapeutika denkbar, welche ihre Wirksamkeit durch die Imitation der biologischen Funktion von miRNAs entfalten könnten. Nachteil einer solchen Untersuchung wäre jedoch, dass keine physiologischen Prozesse, die die Entstehung neuropathischer Schmerzen verursachen, mit ihr aufgeklärt werden können, was ein wesentliches Ziel unserer Studie war. Es ist vielmehr ein theoretisches Konstrukt, welches die Funktionsweise von miRNAs nachahmt.
Für die Entwicklung völlig neuer Therapiekonzepte werden womöglich beide Herangehensweisen von Nöten sein.

4.2 Ergebnisse

Es existiert eine Reihe von Studien, die sich mit der Expression von miRNAs nach Induktion neuropathischer Schmerzen und anderer Schmerzentitäten beim Nager befassen [96, 107]. Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass miRNAs als Folge der Schmerzinduktion in ihrem Expressionsmuster verändert werden, diese Veränderungen jedoch vom Induktionsmechanismus und der jeweiligen Schmerzentität abhängen [96].
Das Ergebnis des Microarray unserer Studie zeigt, dass es durch CCI im Spinalganglion der Ratte zur differentiellen Expression von miRNAs zu allen vier Untersuchungszeitpunkten (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) kommt. Die in diesem Rahmen näher untersuchte miRNA-let-7c zeigt eine signifikant verminderte Expression zum

Zeitpunkt 4 h nach CCI im Vergleich mit den entsprechenden scheinoperierten Tieren.

Aldrich et al untersuchten mittels *Spinal Nerve Ligation* (SNL) am Spinalnerven L5 die Expression der miRNA-Familie-183 (bestehend aus den miRNAs -96, -182, -183) und wiesen zwei Wochen nach SNL- Behandlung in den dazugehörigen Spinalganglien eine verminderte Expression dieser miRNAs nach [131]. Hieraus wurde geschlossen, dass diese miRNAs aufgrund des Nervenschadens ihr Expressionsmuster verändern und über ihren Einfluss auf die Genexpression bei der Entstehung chronischer Schmerzen mitwirken [131]. Diese Annahme entspricht der Hypothese unserer Studie, dass miRNAs bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt sind. Zu Beginn lag der Fokus unserer Studie im Unterschied zu Aldrich et al nicht auf bestimmten miRNAs, sondern es wurden über einen Microarray verschiedene miRNAs erfasst, um eine umfassende Übersicht über die Auswirkung neuropathischer Schmerzen bei der Ratte auf die Expression von miRNAs zu erhalten. Konträrerweise zeigte sich im Ergebnis des Microarrays keine miRNA des miRNA-183-Clusters, obwohl ein hohes Vorkommen dieser Gruppe in Spinalganglien embryonaler Mäuse und anderen sensorischen Organen beschrieben wurde [142-144]. Darüber hinaus lässt die Studie von Aldrich et al auf eine Relevanz dieser miRNAs bei neuropathischen Schmerzen schließen. Dieser Unterschied könnte durch die verschiedenen Untersuchungstechniken beider Studien bedingt sein [135]. Aldrich et al untersuchten die Expression der miRNA-183-Familie mittels quantitativer Real-Time PCR, wohingegen in dieser Studie zunächst ein Microarray durchgeführt wurde. Zusätzlich unterschieden sich sowohl das angewandte Schmerzmodell als auch die Zeitpunkte der Untersuchungen, was ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen beitragen könnte.

Eine Studie von von Schack et al untersuchte die differentielle Expression von miRNAs mittels *TaqMan low density array* nach Induktion neuropathischer Schmerzen bei der Ratte durch SNL am Spinalnerven L5 [112]. Die Bestimmung der miRNA-Expression erfolgte vier Wochen nach Induktion der neuropathischen Schmerzen und verglich diese in den gleichseitigen Spinalganglien L4 und L5. Insgesamt zeigten 63 miRNAs eine veränderte Expression nach SNL-Behandlung der Tiere, davon 59 eine verminderte Expression [105]. Interessanterweise fanden sich die meisten signifikanten Ergebnisse nicht im betroffenen Spinalganglion L5, sondern im nicht direkt betroffenen, *ipsilateralen* Ganglion L4. Hieraus schlossen

von Schack et al, dass v.a. die Veränderungen der miRNA-Expression in den nicht direkt verletzten Afferenzen für die Entwicklung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen verantwortlich seien. Im Unterschied hierzu wurden in unserer Studie die zum *N. ischiadicus* zugehörigen Spinalganglien untersucht, d.h. direkt von der Intervention betroffene Ganglien. Hier konnte gezeigt werden, dass es zu jedem der vier Untersuchungszeitpunkte (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) zu Veränderungen in der Expression von miRNAs gekommen ist. Dieses Ergebnis muss nicht als Widerspruch zu dem von von Schack et al gesehen werden, da auch hier unterschiedliche Schmerzmodelle (CCI vs. SNL) und Untersuchungszeitpunkte verwendet wurden. Demzufolge könnte man aus beiden Studien ableiten, dass sowohl Veränderungen in direkt betroffenen Spinalganglien als auch Veränderungen anatomisch nicht direkt betroffener Bereiche bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen eine Rolle spielen. Möglicherweise kommunizieren die verschiedenen Strukturen auch miteinander (z.B. über Zytokine und/oder Neurotrophine (wie den NGF) oder andere Botenstoffe) und bedingen dadurch Veränderungen, die zu der Entwicklung von Schmerzen führen. Vergleicht man die Resultate einzelner miRNAs der Microarray-Untersuchung von von Schack et al und unserer, so zeigen sich Übereinstimmungen und Unterschiede. So ist die in unserer Studie näher untersuchte miRNA-let-7c sowohl in von Schacks et al Untersuchung als auch in unserer (hier zum Zeitpunkt 4 h) nach Behandlung der Versuchstiere (CCI bzw. SNL) vermindert exprimiert. Hieraus könnte geschlossen werden, dass es sich bei der miRNA-let-7c um eine im Rahmen von neuropathischen Schmerzen relevante miRNA handelt, da zwei verschiedene Modelle zur Induktion neuropathischer Schmerzen sowie unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte (4 h vs. 4 Wochen) zu einer gleichsinnigen Veränderung der relativen Expression geführt haben. Weitere Gemeinsamkeiten ergaben sich für die miRNA-34a, weitere Mitglieder der let-7 Familie (let-7b, e und a) und der miR-21. Unterschiede ergaben sich bei der miRNA-221 und miRNA-100, die beide in unserer Untersuchung nach 12d erhöht exprimiert waren, wohingegen von Schack et al nach vier Wochen reduzierte Expressionslevel nachgewiesen haben. Diese Unterschiede könnten sich ebenfalls aus den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ableiten. So wurden in unserer Studie zu vier relativ frühen Zeitpunkten (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) nach Induktion neuropathischer Schmerzen die miRNA-Expressionen untersucht, verglichen mit vier Wochen bei von Schack et al. Dies könnte ein Hinweis darauf

sein, dass eine miRNA verschiedene Funktionen in der frühen Phase der Entstehung neuropathischer Schmerzen wahrnimmt, verglichen mit ihrer Rolle in der späten Phase der Entstehung oder Aufrechterhaltung.

Weitere Studien haben ein hohes Vorkommen von miRNAs der let-7 Familie im Nervengewebe von Maus und Ratte gezeigt.

So untersuchten Hohjoh und Fukushima die Expression von miRNAs in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems der Maus (u.a. Rückenmark, Medulla oblongata, Pons) und konnten zeigen, dass die let-7 Familie zu den am stärksten exprimierten miRNAs gehörten [145]. Hua et al führten eine Studie zur Identifizierung von miRNAs durch, die spezifisch in neuralen Geweben der Ratte exprimiert werden [146]. Hier wurden im Spinalganglion als neurales Gewebe acht miRNAs mit hohen Expressionsgraden gefunden. Die in unserer Microarray Untersuchung registrierte sowie von uns näher untersuchte miRNA-let-7c gehörte zu diesen miRNAs mit einem hohen Expressionslevel im Spinalganglion der Ratte. Diese Ergebnisse könnten für eine wichtige Rolle der let-7- Familie bei regulativen Prozessen der Genexpression im Nervensystem sprechen, sodass eine Einflussnahme der let-7c bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen denkbar wäre.

Genda et al untersuchten mittels *Taq Man low density Array* im Hinterhorn des Rückenmarks von CCI-behandelten Ratten zu den Zeitpunkten sieben und 14 Tagen nach CCI-Intervention die miRNA-Expression [106]. Insgesamt zeigten in dieser Studie 111 miRNAs eine signifikante Regulation als Antwort auf die CCI-Behandlung [105]. Zu diesen gehörten u.a. die miRNA-let-7d und let-7i. Die let-7d zeigte in der CCI-Gruppe am Tag 14 im Vergleich zu *Sham* eine höhere Expression, wohingegen bei der let-7i zum gleichen Zeitpunkt eine verminderte Expression nachgewiesen wurde [106]. Ähnlich der Untersuchung von Genda et al wurde in unserer Arbeitsgruppe von Brandenburger et al mittels Microarray (Exiqon) die Expression von miRNAs im Rückenmark der Ratte nach CCI-Behandlung der Tiere untersucht [107]. Insgesamt zeigten sich in der Microarray Untersuchung nur moderate Veränderungen der miRNA-Expressionen infolge der CCI-Behandlung, welche sich in der im Anschluss durchgeführten quantitativen Real-Time PCR nicht als signifikant bestätigt haben (genauer untersucht wurden in der quantitativen Real-Time PCR die miRNAs -30b, -100, -10a, -99a und miRNA-720). Hier unterscheiden sich die Ergebnisse in zwei verschiedenen Geweben derselben Tiere: Unsere Untersuchung der Spinalganglien ergab in der

quantitativen Real-Time PCR eine signifikant verminderte Expression der miRNA-let-7c zum Zeitpunkt 4 h nach CCI-Behandlung. Darüber hinaus ergab die Microarray Untersuchung stärkere Veränderungen der miRNA-Expressionen infolge CCI verglichen mit den Ergebnissen im Rückenmark derselben Tiere. Dies spricht dafür, dass die Regulationsmechanismen in verschiedenen Bereichen des Nervensystems (Rückenmark vs. Spinalganglion) unterschiedlich sind. Eine getrennte Analyse der einzelnen Stationen des Nervensystems auch bei gleichem Schmerzmodell sowie denselben Individuen scheint also essentiell zu sein, um die Pathophysiologie der Entstehung und Aufrechterhaltung des neuropathischen Schmerzes umfassend zu verstehen. Bei der Interpretation der Ergebnisse der beiden Studien ist zu beachten, dass die Microarray-Analysen über zwei verschiedene Systeme erfolgten (Exiqon bei der Studie zum Rückenmark vs. Agilent in dieser Studie). Git et al zeigten, dass unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung von miRNA-Expressionen in Abhängigkeit von der jeweiligen Technik möglich sind [135]. Die unterschiedlichen methodischen Ansätze sollten daher beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien berücksichtigt werden, ebenso wie mögliche Unterschiede hinsichtlich verschiedener Untersuchungszeitpunkte sowie des jeweils angewandten Schmerzmodells und der Spezies. Alle Aspekte für sich genommen könnten Ursachen gegensinniger Resultate sein.

Trotz dieser Unterschiede gab es eine Gemeinsamkeit hinsichtlich des Vorkommens von miRNAs der let-7 Familie bei der Untersuchung der Spinalganglien und des Rückenmarks. In der Studie von Brandenburger et al zeigten zwei Mitglieder der let-7-Familie (miRNA- let-7e und let-7c) ein hohes Vorkommen [107]. Auch in unserer Microarray-Analyse (Agilent) der Spinalganglien derselben Tiere wurden diese miRNAs detektiert. Zusätzlich ergab eine Studie zur Entstehung der Opioidtoleranz, dass die miRNAs der let-7 Familie integraler Bestandteil bei der Entwicklung dieses Phänomens ist [147]. Hier wurde eine let-7 Bindungsstelle in der 3´UTR der μ-Opioidrezeptor (MOR1)-mRNA identifiziert. Die Ergebnisse dieser Studien könnten zusammengenommen auf eine wichtige Rolle der let-7-Familie bei der Regulation von Prozessen im Nervensystem und der Entstehung von chronischen Schmerzen hinweisen. Eine Involvierung dieser miRNAs bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen ist daher auch denkbar.

In einer weiteren Studie zum Thema miRNAs im Kontext von Schmerzentstehung wurden die Expressionen der miRNAs-1, -16 und -206 bei verschiedenen Schmerzentitäten untersucht [132]. Diese miRNAs zeigten eine differentielle Regulation im Spinalganglion der Maus nach Induktion von akutem, inflammatorischem und neuropathischem Schmerz, „wohingegen im Hinterhorn des Rückenmarks die gleichen miRNAs lediglich beim inflammatorischen, nicht jedoch bei neuropathischem oder akutem Schmerz eine differentielle Expression zeigten“ [105]. Hierin lässt sich eine gewisse Stimulusspezifität der miRNA-Expressionen erkennen, da sich die Ergebnisse des inflammatorischen Schmerzes vom akuten und neuropathischen Schmerz im Rückenmark der Maus unterschieden. Zudem gleichen diese Ergebnisse in ihrer Diskrepanz bezüglich der unterschiedlichen Ergebnisse im Spinalganglion und Rückenmark den Resultaten in unserer Arbeitsgruppe. Brandenburger et al konnten keine differentielle Expression von miRNAs im Rückenmark der Ratte nach CCI-Behandlung nachweisen [107]. Dagegen zeigt die in unserer Studie durchgeführte Untersuchung der Spinalganglien derselben Tiere eine signifikante Expressionsveränderung von miRNAs nach Induktion eines Zustands der Neuropathie. Dies spricht abermals dafür, dass sich die Regulationsmechanismen in den verschiedenen Stationen des nozizeptiven Systems unterscheiden und selektiv überprüft werden müssen, um die Pathophysiologie des neuropathischen Schmerzes in seiner Gänze zu verstehen. Tabelle 19 zeigt eine Auswahl von miRNAs, die ein verändertes Expressionsmuster in verschiedenen Geweben und Schmerzmodellen gezeigt haben.

Schmerzentität	Gewebe	miRNA	Quelle
Inflammatorischer Schmerz	Rückenmark	miRNA -1,-16,-206,-124a	[132, 148]
Inflammatorischer Schmerz	Spinalganglion	miRNA-10a,-29a,-98,-99a,-124a,-134,-183, Dicer-Deletion, -1, -16, -206, -143	[139, 149, 150]
Inflammatorischer Schmerz	Gehirn	miRNA -155,-223	[151]
Neuropathischer Schmerz	Rückenmark	miRNA -500,-221,-21,-103	[106, 132, 140]
Neuropathischer Schmerz	Spinalganglion	miRNA -96,-182,-183,-1,-16,-206,-21	[111, 131-133, 152]

Tabelle 19: Differentiell exprimierte miRNAs im Rahmen verschiedener Schmerzentitäten in unterschiedlichen Geweben. Tabelle modifiziert übernommen nach Tan et al. [105]

Die vorliegende Studie ist über die reine Untersuchung von miRNA-Expressionen hinausgegangen. Mittels bioinformatischer Analyse wurden schmerzrelevante Zielgene der miRNA-let-7c identifiziert. Die Analyse ergab die 3´UTR der mRNA des NGF als mögliche Zielstruktur der let-7c. Die Transfektion von HEK 293 Zellen mit entsprechenden Plasmiden und ein Luciferase Assay sollten die bioinformatisch vorhergesagte Interaktion näher untersuchen.

Verglichen mit der Anzahl an Studien, die sich auf die allgemeine Expressionsbestimmung von miRNAs im Rahmen verschiedener Schmerzmodelle beschränken, gibt es bisher noch wenige Studien, die wie unsere einen Zusammenhang zwischen miRNA und ihrem schmerzrelevanten Zielgen untersuchen [96].

Favereaux et al zeigten mit der miRNA-103 einen solchen Zusammenhang im Rahmen neuropathischer Schmerzen [140]. Die Expression dieser miRNA war bei neuropathischen Schmerzen in Zellen des Hinterhorns des Rückenmarks vermindert. Sie reguliert die Expression der drei Untereinheiten des Cav 1.2 L-Typ Calciumkanals [140]. Dieser Kanal zeigt Veränderungen innerhalb der Langzeit-Plastizität neuropathischer Schmerzen [153]. Eine *intrathekale* Gabe der miRNA-103 führte über die Regulation dieses Calciumkanals zu einer Abnahme neuropathischer Schmerzen. Damit wurde ein direkter Zusammenhang zwischen einer miRNA und ihrem *Target in vivo* nachgewiesen.

In einem Modell zur Auslösung eines inflammatorischen Schmerzes analysierten Kynast et al die Regulation und Funktion der miRNA-124a im Rückenmark der Maus [105, 148]. Die miRNA-124a zeigte hier eine verminderte Expression nach Induktion inflammatorischen Schmerzes durch Formalin. Nach *intravenöser* Applikation eines spezifischen miRNA-124a Antagonisten wurde eine Induktion des *Target Gens* MeCP2 (Methyl CpG Bnding Protein 2) bzw. des Proteins verzeichnet, was mit einem gesteigerten Schmerzverhalten der Mäuse vergesellschaftet war [105]. Die Gabe eines miRNA-124a *mimics* führte dagegen zu einem verminderten Schmerzverhalten, sodass in dieser Studie ebenfalls ein direkter Zusammenhang zwischen einer miRNA und ihrem *Target* dargestellt wurde. MiRNAs scheinen daher bei verschiedenen Schmerzentitäten (nicht nur bei neuropathischen Schmerzen, sondern auch bei inflammatorischen Schmerzen) regulative Funktionen wahrzunehmen.

Eine Studie von Sakai und Suzuki konzentrierte sich auf die Rolle der miRNA-21 im Rahmen neuropathischer Schmerzen [111]. Zunächst wurde die Expression

der miRNA-21 im Spinalganglion L5 untersucht, nachdem mittels SNL des linken L5 Spinalnerven ein Zustand der Neuropathie hervorgerufen wurde. Es kam hier zu einer Expressionssteigerung dieser miRNA, welche bereits in zuvor durchgeführten Studien zu peripheren Nervenläsionen gezeigt werden konnte [133, 152]. Die Microarray-Untersuchung unserer Studie ergab ebenfalls einen Anstieg des Expressionslevels der miRNA-21 12 Tage nach Induktion der CCI um den Faktor 1,6 (und eine Erniedrigung zum Zeitpunkt 4 h um den Faktor 1,4), was -im Einklang mit der Studie von Sakai und Suzuki- auf eine kausale Rolle dieser miRNA in der späten Phase der Entwicklung neuropathischer Schmerzen hindeutet. Im Anschluss wurde in dieser Studie die *intrathekale* Applikation eines miRNA-21 Inhibitors durchgeführt, was zu einer Reduktion der mechanischen Allodynie sowie thermalen Hyperalgesie führte. Die miRNA-21 könnte daher einen wichtigen Angriffspunkt bei der Therapie neuropathischer Schmerzen darstellen [111].

Im et al zeigten bei Mäusen, bei denen ein Zustand der Neuropathie durch *Spinal cord injury* (SCI) induziert wurde, dass die *intrathekale* Applikation der im Rahmen neuropathischer Schmerzen vermindert exprimierten miRNA-23b die Schmerzsymptomatik abmilderte (gemessen u.a. an der verlängerten Latenz der Pfotenrückzugsgeschwindigkeit) [154]. Dieser Effekt wurde durch die Interaktion zwischen der miRNA-23b und ihrem *Target* NADPH-Oxidase 4 vermittelt [154]. Die Autoren gehen daher davon aus, dass diese miRNA neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten bei der Therapie neuropathischer Schmerzen bietet. In unserer Microarray-Untersuchung wurde die miRNA-23b nicht detektiert. Gründe hierfür könnten zum einen wiederum der Unterschied hinsichtlich der angewendeten experimentellen Modelle (CCI vs. SCI) sein, aber auch die Untersuchung verschiedener Spezies (Maus vs. Ratte) könnte diese Divergenz erklären. Das regulatorische System der miRNAs scheint also eine Speziesspezifität zu zeigen. Somit ist auch eine vorbehaltslose Übertragung der bisher erzielten tierexperimentellen Ergebnisse auf den Menschen nicht ohne weiteres möglich und bedarf daher weiterer Untersuchungen, ob die bei verschiedenen Tierspezies beobachteten Zusammenhänge/Mechanismen beim Menschen in gleicher Weise ablaufen.

In unserer Studie zeigte sowohl das Ergebnis des Microarray als auch die quantitativen Real-Time PCR eine signifikante Verminderung der miRNA-let-7c zum Untersuchungszeitpunkt 4 h. Diese frühe, signifikante Veränderung der

relativen Expression könnte für eine regulative Funktion dieser miRNA in der frühen Entstehungsphase neuropathischer Schmerzen sprechen. Die Expression der NGF-mRNA ergab in der quantitativen Real-Time PCR einen gesteigerten Grad zum Untersuchungszeitpunkt 1 d und 12 d. Das von uns ermittelte Expressionsmuster des NGF nach Intervention mit der CCI-Methode ähnelt den Ergebnissen einer Untersuchung von Shen et al: hier wurde nach Ligation der Spinalnerven L4-L6 *(Spinal Nerve Injury-Modell)* eine bis zu 3 Wochen anhaltende Zunahme der NGF-mRNA in Spinalganglien, mit einem Maximum am Tag 1 nach Intervention, gezeigt [155]. Auch eine Studie von Herzberg et al kam zu dem Ergebnis, dass eine CCI-Behandlung von Ratten zu einem Anstieg des NGF (mit dem größten Ausmaß auf der Seite der Läsion) in den zum *N. ischiadicus* gehörigen Spinalganglien führt [57]. Geht man davon aus, dass die miRNA-let-7c durch ihre verminderte Expression zum Zeitpunkt 4 h einen geringeren inhibierenden Einfluss auf die NGF-mRNA nimmt, so wird unter Umständen- mit entsprechender Zeitverzögerung von 20 Stunden, in der der hemmende Einfluss wegfällt- das gesteigerte Vorhandensein der NGF-mRNA am Tag eins nach Intervention erklärbar. Aufgrund des hieraus abzuleitenden Zusammenhangs beider Moleküle, sollten trotz des Negativergebnisses des Luciferase Assays weitere Studien zur Klärung einer möglichen Interaktion zwischen der miRNA-let-7c und dem NGF durchgeführt werden.

4.3 Schlussfolgerungen

Das Ergebnis des Microarray weist darauf hin, dass zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten nach Induktion neuropathischer Schmerzen mit CCI eine differentielle Expression verschiedener miRNAs im Spinalganglion der Ratte zu beobachten ist. MiRNAs könnten daher eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen haben. Das mit Microarray erzielte Ergebnis zur Expression der miRNA-let-7c konnte in der quantitativen Real-Time PCR bestätigt werden. Es zeigte sich eine signifikante Herabregulation dieser miRNA zum Untersuchungszeitpunkt 4 h nach CCI. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die miRNA-let-7c in der frühen Entstehungsphase neuropathischer Schmerzen bei der Ratte Einfluss nimmt. Der signifikante Anstieg des NGF zu den Zeitpunkten Tag 1 und 12 unterstützt Hinweise auf eine Beteiligung dieses Neurotrophins bei der Entstehung

neuropathischer Symptome. Dies wurde bereits in mehreren Studien gezeigt [57-60].

Die bioinformatische Analyse der Ziel-mRNAs der miRNA-let-7c wies auf eine mögliche Interaktion dieser miRNA mit der mRNA des Beta Polypeptids des NGF hin. Diese Interaktion konnte mit Luciferase Assay nicht bestätigt werden. Aufgrund des in verschiedenen Studien gezeigten Zusammenhangs zwischen NGF und neuropathischen Schmerzen, der bioinformatisch vorhergesagten Interaktion zwischen der let-7c und NGF sowie der in der Real-Time PCR gezeigten relativen Expressionen, die einen Zusammenhang beider Moleküle nahelegen, sollten sich weitere Studien anschließen, die die Interaktion der miRNA-let-7c mit dem NGF näher charakterisieren. Ferner sollten weitere miRNAs, die eine differentielle Expression in unserer Microarray-Untersuchung gezeigt haben, genauer untersucht werden. Hieraus könnten sich neue Angriffspunkte bei der Therapie neuropathischer Schmerzen ergeben. Einer Erkrankung, die wegen ihrer unzureichenden Behandelbarkeit mit den bisher verfügbaren Medikamenten und dem hohen Leidensdruck der Patienten dringend neuer therapeutischer Möglichkeiten bedarf.

5 Literaturverzeichnis

1. Merskey, H. and N. Bogduk, *Classification of Chronic Pain. Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms.* 2nd ed., IASP Press, Seattle, 1994: p. 210.
2. Marchand, F., M. Perretti, and S.B. McMahon, *Role of the immune system in chronic pain.* Nat Rev Neurosci, 2005. 6(7): p. 521-32.
3. Nickel, F.T., et al., *Mechanisms of neuropathic pain.* Eur Neuropsychopharmacol, 2012. 22(2): p. 81-91.
4. Woolf, C.J. and Q. Ma, *Nociceptors--noxious stimulus detectors.* Neuron, 2007. 55(3): p. 353-64.
5. Costigan, M., J. Scholz, and C.J. Woolf, *Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage.* Annu Rev Neurosci, 2009. 32: p. 1-32.
6. Campbell, J.N. and R.A. Meyer, *Mechanisms of neuropathic pain.* Neuron, 2006. 52(1): p. 77-92.
7. Stengel, Maag, and Baron, *Krankheitsmechanismen neuropathischer Schmerzen: ein Ausblick.* Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie. Zeitschrift für Erkrankungen des Nervensystems. Krause&Pachernegg GmbH. Verlag für Medizin und Wirtschaft. A-3003 Gablitz, 2006. 7(2): p. 9-15.
8. Baron, R., A. Binder, and G. Wasner, *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.* Lancet Neurol, 2010. 9(8): p. 807-19.
9. Baron, R., *Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective.* Nat Clin Pract Neurol, 2006. 2(2): p. 95-106.
10. Dworkin, R.H., et al., *Healthcare costs of acute and chronic pain associated with a diagnosis of herpes zoster.* J Am Geriatr Soc, 2007. 55(8): p. 1168-75.
11. Berger, A., E.M. Dukes, and G. Oster, *Clinical characteristics and economic costs of patients with painful neuropathic disorders.* J Pain, 2004. 5(3): p. 143-9.
12. O'Connor, A.B., *Neuropathic pain: quality-of-life impact, costs and cost effectiveness of therapy.* Pharmacoeconomics, 2009. 27(2): p. 95-112.
13. Torrance, N., et al., *The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey.* J Pain, 2006. 7(4): p. 281-9.
14. Dworkin, R.H., et al., *Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations.* Pain, 2007. 132(3): p. 237-51.
15. Rowbotham, M.C. and K.L. Petersen, *Zoster-associated pain and neural dysfunction.* Pain, 2001. 93(1): p. 1-5.
16. Amir, R., J.D. Kocsis, and M. Devor, *Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons.* J Neurosci, 2005. 25(10): p. 2576-85.
17. Wu, G., et al., *Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents.* J Neurosci, 2002. 22(17): p. 7746-53.
18. Lai, J., J.C. Hunter, and F. Porreca, *The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain.* Curr Opin Neurobiol, 2003. 13(3): p. 291-7.

19. Black, J.A., et al., *Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas.* Ann Neurol, 2008. 64(6): p. 644-53.
20. Siqueira, S.R., et al., *Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia.* Neuroscience, 2009. 164(2): p. 573-7.
21. Ma, W., et al., *Medium and large injured dorsal root ganglion cells increase TRPV-1, accompanied by increased alpha2C-adrenoceptor co-expression and functional inhibition by clonidine.* Pain, 2005. 113(3): p. 386-94.
22. Baron, R., *Capsaicin and nociception: from basic mechanisms to novel drugs.* Lancet, 2000. 356(9232): p. 785-7.
23. Sato, J. and E.R. Perl, *Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury.* Science, 1991. 251(5001): p. 1608-10.
24. Sommer, C., *Painful neuropathies.* Curr Opin Neurol, 2003. 16(5): p. 623-8.
25. Binshtok, A.M., et al., *Nociceptors are interleukin-1beta sensors.* J Neurosci, 2008. 28(52): p. 14062-73.
26. Wu, G., et al., *Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers.* J Neurosci, 2001. 21(8): p. RC140.
27. Hudson, L.J., et al., *VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury.* Eur J Neurosci, 2001. 13(11): p. 2105-14.
28. Sommer, C. and M. Kress, *Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia.* Neurosci Lett, 2004. 361(1-3): p. 184-7.
29. Mika, J., *Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness.* Pharmacol Rep, 2008. 60(3): p. 297-307.
30. Scholz, J. and C.J. Woolf, *The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia.* Nat Neurosci, 2007. 10(11): p. 1361-8.
31. Haanpaa, M.L., et al., *Assessment of neuropathic pain in primary care.* Am J Med, 2009. 122(10 Suppl): p. S13-21.
32. Luo, Z.D., et al., *Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats.* J Neurosci, 2001. 21(6): p. 1868-75.
33. Ultenius, C., et al., *Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat.* Neurosci Lett, 2006. 399(1-2): p. 85-90.
34. Hains, B.C., et al., *Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury.* J Neurosci, 2004. 24(20): p. 4832-9.
35. Khan, G.M., S.R. Chen, and H.L. Pan, *Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats.* Neuroscience, 2002. 114(2): p. 291-9.
36. Witting, N., et al., *A PET activation study of brush-evoked allodynia in patients with nerve injury pain.* Pain, 2006. 120(1-2): p. 145-54.
37. Moore, K.A., et al., *Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord.* J Neurosci, 2002. 22(15): p. 6724-31.
38. Scholz, J., et al., *Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury.* J Neurosci, 2005. 25(32): p. 7317-23.

39. Vanegas, H. and H.G. Schaible, *Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?* Brain Res Brain Res Rev, 2004. 46(3): p. 295-309.
40. Rahman, W., R. D'Mello, and A.H. Dickenson, *Peripheral nerve injury-induced changes in spinal alpha(2)-adrenoceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses.* J Pain, 2008. 9(4): p. 350-9.
41. Bee, L.A. and A.H. Dickenson, *Descending facilitation from the brainstem determines behavioural and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin.* Pain, 2008. 140(1): p. 209-23.
42. Vera-Portocarrero, L.P., et al., *Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization.* Neuroscience, 2006. 140(4): p. 1311-20.
43. Matsuzawa-Yanagida, K., et al., *Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites.* Neuropsychopharmacology, 2008. 33(8): p. 1952-65.
44. Woolf, C.J. and R.J. Mannion, *Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.* Lancet, 1999. 353(9168): p. 1959-64.
45. Jaggi, A.S., V. Jain, and N. Singh, *Animal models of neuropathic pain.* Fundam Clin Pharmacol, 2011. 25(1): p. 1-28.
46. Baron, R., *Pharmakologisch nicht interventionelle Therapie chronisch neuropathischer Schmerzen.* Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie) AWMF-Registernummer 030/114, 2012.
47. Dworkin, R.H., et al., *Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update.* Mayo Clin Proc, 2010. 85(3 Suppl): p. S3-14.
48. Cohen, S., R. Levi-Montalcini, and V. Hamburger, *A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1954. 40(10): p. 1014-8.
49. Cohen, S. and R. Levi-Montalcini, *A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1956. 42(9): p. 571-4.
50. Pezet, S. and S.B. McMahon, *Neurotrophins: mediators and modulators of pain.* Annu Rev Neurosci, 2006. 29: p. 507-38.
51. Khan, N. and M.T. Smith, *Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology.* Molecules, 2015. 20(6): p. 10657-88.
52. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: mediators of neurotrophin action.* Curr Opin Neurobiol, 2001. 11(3): p. 272-80.
53. Diamond, J., M. Holmes, and M. Coughlin, *Endogenous NGF and nerve impulses regulate the collateral sprouting of sensory axons in the skin of the adult rat.* J Neurosci, 1992. 12(4): p. 1454-66.
54. Angeletti, P.U., R. Levi-Montalcini, and P. Calissano, *The nerve growth factor (NGF): chemical properties and metabolic effects.* Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1968. 31: p. 51-75.
55. Davies, A.M., *Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development.* EMBO J, 2003. 22(11): p. 2537-45.
56. Patel, T.D., et al., *Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo.* Neuron, 2000. 25(2): p. 345-57.
57. Herzberg, U., et al., *NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve.* Neuroreport, 1997. 8(7): p. 1613-8.

58. Lewin, G.R., A.M. Ritter, and L.M. Mendell, *Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat.* J Neurosci, 1993. 13(5): p. 2136-48.
59. Dyck, P.J., et al., *Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans.* Neurology, 1997. 48(2): p. 501-5.
60. Mills, C.D., et al., *Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats.* Eur J Pain, 2013. 17(4): p. 469-79.
61. Ju, H., et al., *The potential role of nerve growth factor in cryoneurolysis-induced neuropathic pain in rats.* Cryobiology, 2012. 65(2): p. 132-8.
62. Hoffman, E.M., et al., *Potential mechanisms for hypoalgesia induced by anti-nerve growth factor immunoglobulin are identified using autoimmune nerve growth factor deprivation.* Neuroscience, 2011. 193: p. 452-65.
63. Eibl, J.K., B.C. Strasser, and G.M. Ross, *Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor.* Neurochem Int, 2012. 61(8): p. 1266-75.
64. Hefti, F.F., et al., *Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF.* Trends Pharmacol Sci, 2006. 27(2): p. 85-91.
65. Watson, J.J., S.J. Allen, and D. Dawbarn, *Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential?* BioDrugs, 2008. 22(6): p. 349-59.
66. Bannwarth, B. and M. Kostine, *Targeting nerve growth factor (NGF) for pain management: what does the future hold for NGF antagonists?* Drugs, 2014. 74(6): p. 619-26.
67. Chen, H.P., et al., *Intrathecal miR-96 inhibits Nav1.3 expression and alleviates neuropathic pain in rat following chronic construction injury.* Neurochem Res, 2014. 39(1): p. 76-83.
68. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. 116(2): p. 281-97.
69. Ambros, V., *MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing.* Cell, 2003. 113(6): p. 673-6.
70. Lai, E.C., *microRNAs: runts of the genome assert themselves.* Curr Biol, 2003. 13(23): p. R925-36.
71. Kim, V.N. and J.W. Nam, *Genomics of microRNA.* Trends Genet, 2006. 22(3): p. 165-73.
72. Lim, L.P., et al., *The microRNAs of Caenorhabditis elegans.* Genes Dev, 2003. 17(8): p. 991-1008.
73. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.* Embo J, 2004. 23(20): p. 4051-60.
74. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.* RNA, 2004. 10(12): p. 1957-66.
75. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.* Nature, 2003. 425(6956): p. 415-9.
76. Basyuk, E., et al., *Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products.* Nucleic Acids Res, 2003. 31(22): p. 6593-7.
77. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors.* Science, 2004. 303(5654): p. 95-8.
78. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.* Genes Dev, 2003. 17(24): p. 3011-6.

79. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.* Science, 2001. 293(5531): p. 834-8.
80. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing.* Cell, 2001. 106(1): p. 23-34.
81. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.* Nat Rev Genet, 2004. 5(7): p. 522-31.
82. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.* Cell, 2003. 115(2): p. 199-208.
83. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias.* Cell, 2003. 115(2): p. 209-16.
84. Kosik, K.S., *The neuronal microRNA system.* Nat Rev Neurosci, 2006. 7(12): p. 911-20.
85. Niederberger, E., et al., *MicroRNAs as new players in the pain game.* Pain, 2011. 152(7): p. 1455-8.
86. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation.* Genome Biol, 2004. 5(3): p. R13.
87. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.* Science, 2002. 297(5589): p. 2056-60.
88. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells.* RNA, 2003. 9(1): p. 112-23.
89. Doench, J.G., C.P. Petersen, and P.A. Sharp, *siRNAs can function as miRNAs.* Genes Dev, 2003. 17(4): p. 438-42.
90. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* Cell, 1993. 75(5): p. 843-54.
91. Wightman, B., et al., *Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during Caenorhabditis elegans development.* Genes Dev, 1991. 5(10): p. 1813-24.
92. Krek, A., et al., *Combinatorial microRNA target predictions.* Nat Genet, 2005. 37(5): p. 495-500.
93. Hu, G., et al., *Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated neuronal dysfunction.* Cell Death Dis, 2012. 3: p. e381.
94. Morel, L., et al., *Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1.* J Biol Chem, 2013. 288(10): p. 7105-16.
95. Xin, H., et al., *Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth.* Stem Cells, 2012. 30(7): p. 1556-64.
96. Sakai, A. and H. Suzuki, *Emerging roles of microRNAs in chronic pain.* Neurochem Int, 2014. 77C: p. 58-67.
97. Park, C.K., et al., *Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1.* Neuron, 2014. 82(1): p. 47-54.
98. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.* Cell, 2005. 120(1): p. 15-20.

99. Xie, X., et al., *Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals.* Nature, 2005. 434(7031): p. 338-45.
100. Sayed, D. and M. Abdellatif, *MicroRNAs in development and disease.* Physiol Rev, 2011. 91(3): p. 827-87.
101. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs.* Nature, 2004. 431(7006): p. 350-5.
102. Stemkowski, P.L. and P.A. Smith, *Sensory neurons, ion channels, inflammation and the onset of neuropathic pain.* Can J Neurol Sci, 2012. 39(4): p. 416-35.
103. Kuner, R., *Central mechanisms of pathological pain.* Nat Med, 2010. 16(11): p. 1258-66.
104. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain.* Cell, 2009. 139(2): p. 267-84.
105. Tan, P.H., et al., *MicroRNA-based therapy in pain medicine: Current progress and future prospects.* Acta Anaesthesiol Taiwan, 2013. 51(4): p. 171-6.
106. Genda, Y., et al., *microRNA changes in the dorsal horn of the spinal cord of rats with chronic constriction injury: A TaqMan(R) Low Density Array study.* Int J Mol Med, 2013. 31(1): p. 129-37.
107. Brandenburger, T., et al., *Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain.* Neurosci Lett, 2012. 506(2): p. 281-6.
108. Hori, Y., et al., *Differential expression of rat hippocampal microRNAs in two rat models of chronic pain.* Int J Mol Med, 2013. 32(6): p. 1287-92.
109. Nakanishi, K., et al., *Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice.* Spinal Cord, 2010. 48(3): p. 192-6.
110. Strickland, E.R., et al., *MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair.* Neuroscience, 2011. 186: p. 146-60.
111. Sakai, A. and H. Suzuki, *Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats.* Biochem Biophys Res Commun, 2013. 435(2): p. 176-81.
112. von Schack, D., et al., *Dynamic changes in the microRNA expression profile reveal multiple regulatory mechanisms in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain.* PLoS One, 2011. 6(3): p. e17670.
113. Bennett, G.J. and Y.K. Xie, *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.* Pain, 1988. 33(1): p. 87-107.
114. Hermanns, H., et al., *Differential effects of spinally applied glycine transporter inhibitors on nociception in a rat model of neuropathic pain.* Neurosci Lett, 2008. 445(3): p. 214-9.
115. Holzapfel, W., *Methoden und Anwendungsgebiete: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).* Biol. unserer Zeit, 2007: p. 120-126.
116. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.* BIOspektrum, Sonderausgabe PCR, 10, 2004: p. 92-95.
117. Rutledge, R.G. and C. Cote, *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves.* Nucleic Acids Res, 2003. 31(16): p. e93.
118. Erson, A.E. and E.M. Petty, *MicroRNAs in development and disease.* Clin Genet, 2008. 74(4): p. 296-306.
119. Seidel, M.F., et al., *Nerve growth factor in rheumatic diseases.* Semin Arthritis Rheum, 2010. 40(2): p. 109-26.

120. Schlosser, L., et al., *Glycine transporter GlyT1, but not GlyT2, is expressed in rat dorsal root ganglion--Possible implications for neuropathic pain.* Neurosci Lett, 2015. 600: p. 213-9.
121. Barthel, F., et al., *Long-term application of glycine transporter inhibitors acts antineuropathic and modulates spinal N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR-1 expression in rats.* Anesthesiology, 2014. 121(1): p. 160-9.
122. Neumann, E., et al., *Expression changes of microRNA-1 and its targets Connexin 43 and brain-derived neurotrophic factor in the peripheral nervous system of chronic neuropathic rats.* Mol Pain, 2015. 11: p. 39.
123. Tan, Y., et al., *Suppression of microRNA-155 attenuates neuropathic pain by regulating SOCS1 signalling pathway.* Neurochem Res, 2015. 40(3): p. 550-60.
124. De Vry, J., et al., *Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain.* Eur J Pharmacol, 2004. 491(2-3): p. 137-48.
125. Dowdall, T., I. Robinson, and T.F. Meert, *Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury.* Pharmacol Biochem Behav, 2005. 80(1): p. 93-108.
126. Devor, M., *Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain.* J Pain, 2006. 7(1 Suppl 1): p. S3-S12.
127. Zhou, X.F., et al., *Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats.* Eur J Neurosci, 2000. 12(1): p. 100-5.
128. Sakurai, E., et al., *Upregulation of casein kinase 1epsilon in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain.* Mol Pain, 2009. 5: p. 74.
129. Manners, M.T., et al., *MicroRNAs downregulated in neuropathic pain regulate MeCP2 and BDNF related to pain sensitivity.* FEBS Open Bio, 2015. 5: p. 733-40.
130. Zhang, J., H. Zhang, and T. Zi, *Overexpression of microRNA-141 relieves chronic constriction injury-induced neuropathic pain via targeting high-mobility group box 1.* Int J Mol Med, 2015.
131. Aldrich, B.T., et al., *Changes in expression of sensory organ-specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation.* Neuroscience, 2009. 164(2): p. 711-23.
132. Kusuda, R., et al., *Differential expression of microRNAs in mouse pain models.* Mol Pain, 2011. 7: p. 17.
133. Strickland, I.T., et al., *Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons.* PLoS One, 2011. 6(8): p. e23423.
134. Sapunar, D., et al., *Dorsal root ganglion - a potential new therapeutic target for neuropathic pain.* J Pain Res, 2012. 5: p. 31-8.
135. Git, A., et al., *Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression.* RNA, 2010. 16(5): p. 991-1006.
136. Zhang, H.Y., et al., *MicroRNAs 144, 145, and 214 are down-regulated in primary neurons responding to sciatic nerve transection.* Brain Res, 2011. 1383: p. 62-70.
137. Shi, G., et al., *Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury.* Glia, 2013. 61(4): p. 504-12.
138. Sakai, A., et al., *miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability.* Brain, 2013. 136(Pt 9): p. 2738-50.

139. Bai, G., et al., *Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain.* Mol Pain, 2007. 3: p. 15.
140. Favereaux, A., et al., *Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain.* EMBO J, 2011. 30(18): p. 3830-41.
141. Tsuda, N., et al., *Synthetic microRNA targeting glioma-associated antigen-1 protein.* Methods Mol Biol, 2009. 487: p. 435-49.
142. Wienholds, E., et al., *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development.* Science, 2005. 309(5732): p. 310-1.
143. Xu, S., et al., *MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster.* J Biol Chem, 2007. 282(34): p. 25053-66.
144. Weston, M.D., et al., *MicroRNA gene expression in the mouse inner ear.* Brain Res, 2006. 1111(1): p. 95-104.
145. Hohjoh, H. and T. Fukushima, *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.* Gene, 2007. 391(1-2): p. 39-44.
146. Hua, Y.J., et al., *Identification and target prediction of miRNAs specifically expressed in rat neural tissue.* BMC Genomics, 2009. 10: p. 214.
147. He, Y., et al., *Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid receptor.* J Neurosci, 2010. 30(30): p. 10251-8.
148. Kynast, K.L., et al., *Modulation of central nervous system-specific microRNA-124a alters the inflammatory response in the formalin test in mice.* Pain, 2013. 154(3): p. 368-76.
149. Zhao, J., et al., *Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and pain thresholds.* J Neurosci, 2010. 30(32): p. 10860-71.
150. Tam Tam, S., et al., *MicroRNA-143 expression in dorsal root ganglion neurons.* Cell Tissue Res, 2011. 346(2): p. 163-73.
151. Poh, K.W., J.F. Yeo, and W.Y. Ong, *MicroRNA changes in the mouse prefrontal cortex after inflammatory pain.* Eur J Pain, 2011. 15(8): p. 801 e1-12.
152. Wu, D., et al., *MicroRNA machinery responds to peripheral nerve lesion in an injury-regulated pattern.* Neuroscience, 2011. 190: p. 386-97.
153. Fossat, P., et al., *Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain.* J Neurosci, 2010. 30(3): p. 1073-85.
154. Im, Y.B., et al., *miR23b ameliorates neuropathic pain in spinal cord by silencing NADPH oxidase 4.* Antioxid Redox Signal, 2012. 16(10): p. 1046-60.
155. Shen, H., J.M. Chung, and K. Chung, *Expression of neurotrophin mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve injury.* Brain Res Mol Brain Res, 1999. 64(2): p. 186-92.

6 Anhang

6.1 Ergebnis des miRNA Microarrays

Zeitpunkt	miRNA	p-Wert	Fold Change
4 h	let-7b	0,036	-1,3
	let-7c	0,016	-1,253
	let-7e	0,015	-1,221
	miR-106b	0,038	-1,168
	miR-140	0,005	-1,222
	miR-150*	0,016	-1,167
	miR-20a	0,011	-1,105
	miR-21	0,013	-1,444
	miR-210	0,001	-1,408
	miR-29c*	0,014	-1,159
	miR-30a*	0,019	-1,222
	miR-342-3	0,036	-1,257
	miR-34a	0,017	-1,274
	miR-383	0,013	-1,634
	miR-410	0,029	-1,232
	miR-433*	0,036	-1,365
	miR-497	0,002	-1,306
	miR-503	0,009	-1,733
	miR-542-5	0,019	-1,426
	miR-872	0,009	-1,292
	miR-873	0,022	-10,047
	miR-878	0,021	-1,089
	miR-100	0,044	1,220
	miR-126	0,009	1,205
	miR-126*	0,010	1,973
	miR-129-1	0,022	1,288
	miR-140*	0,040	1,218
	miR-145	0,016	2,018
	miR-22*	6,57E-05	1,635
	miR-24-2*	0,040	1,413
	miR-26b	0,012	1,432
	miR-30b-5	0,031	1,320
	miR-337	0,020	1,301
	miR-337*	0,020	1,508
	miR-365	3,70E-04	1,856

	miR-374	0,033	2,915
	miR-376b-3p	0,006	1,289
	miR-376b-5p	0,005	1,435
	miR-381	0,004	1,271
	miR-382	0,017	1,175
	miR-450a	0,036	1,439
	miR-493*	1,27E-05	59,874
	miR-494	0,025	1,787
	miR-496	0,007	1,904
	miR-499	0,040	1,567
	miR-7a	0,006	1,387
	miR-9	0,023	1,355
1 d	Let-7a	0,027	-1,066
	miR-148b-3p	0,033	-1,086
	miR-328a	0,033	-1,256
6 d	Let-7a-1*	0,045	-1,509
	miR-181d	0,045	-1,156
	miR-196b	0,039	-1,087
	miR-30a	0,028	-1,197
	miR-30c	0,037	-1,156
	miR-339-3p	0,047	-2,899
	miR-34a	0,032	-1,227
	miR-350	0,010	-1,779
	miR-3573-3p	0,008	-2,384
	miR-455*	0,026	-1,269
	miR-505	0,041	1,757
	miR-551b	0,031	-1,381
	miR-664	0,004	-1,216
	miR-126	0,010	1,190
	miR-132	0,019	2,102
	miR-154*	0,008	1,504
	miR-16	0,027	1,152
	miR-18a	0,006	18,496
	miR-19b	0,040	1,186
	miR-341	0,003	1,104
	miR-376c	0,032	1,532
	miR-380*	0,050	1,239
	miR-434	0,014	1,141
	miR-511*	0,037	1,663
	miR-582	0,002	1,441
	miR-872	0,024	1,167
12 d	miR-362	0,031	-3,926

	miR-122	0,032	-2,098
	miR-34a*	0,018	-1,538
	miR-3593-3p	0,045	-1,287
	miR-34a	0,015	-1,259
	miR-133a	0,044	-1,214
	miR-103	0,047	-1,084
	miR-100	0,029	1,094
	miR-652	0,007	1,121
	miR-487b	0,040	1,151
	miR-323	0,018	1,167
	miR-380*	0,002	1,170
	miR-299	0,016	1,192
	miR-223	0,027	1,225
	miR-433*	0,014	1,234
	miR-337	0,033	1,240
	miR-221	0,036	1,244
	miR-125b*	0,047	1,244
	miR-667	0,041	1,254
	miR-202*	0,020	1,257
	miR-433	0,018	1,258
	miR-758	0,029	1,273
	miR-337	0,007	1,309
	miR-154*	0,012	1,324
	miR-582	0,005	1,476
	miR-21	0,045	1,568
	miR-380	0,001	3,427

Tabelle 20: Ergebnis der T-Test Analyse des miRNA Microarrays. Gezeigt sind die signifikant ($p<0,05$) differentiell exprimierten miRNAs zu den vier verschiedenen Untersuchungszeitpunkten 4 h, 1 d, 6 d, 12 d mit dem dazugehörigen *Fold Change* und p-Wert.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer, Herrn PD Dr. med. Timo Brandenburger und PD Dr. med. Henning Hermanns für die Überlassung des interessanten Themas, die praktische Unterstützung und kompetente Betreuung meiner Dissertation.

Herzlichsten Dank an Hilbert Grievink, PhD, von dem ich viele experimentelle Techniken erlernen durfte und der mir bei Fragen im Labor jederzeit freundlich, kompetent und v.a. geduldig zur Seite stand.

Ein großer Dank an Claudia Dohle und Yvonne Grüber, die mir bei methodischen Fragen, der Beschaffung von Materialien u.v.m. jederzeit geholfen haben. Ohne Sie wäre ich aufgeschmissen gewesen.

Vielen Dank auch an meine Vorgängerin Dr. med. Maike Brendel, die mich in den ersten Wochen eingearbeitet und in die „Laborwelt“ eingeführt hat.

Ebenfalls ein großer Dank an das BMFZ Düsseldorf und Dr. Sebastian Wohlfromm, die den Microarray für uns durchgeführt haben.

Zudem möchte ich den tiermedizinischen Doktoranden und Ärzten-insb. Fr. Dr. med. vet. Franziska Barthel- für die Durchführung der CCI-Operationen an den Versuchstieren danken.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Dr. Marc Grunwald bedanken. Während unserer gemeinsamen Schreib- und Arbeitstage am Wochenende habe ich einen großen Teil dieser Arbeit verfasst.

Am Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt mir mit Eurem stets offenen Ohr, Eurer emotionalen und auch finanziellen Unterstützung dieses Studium und die Promotion ermöglicht. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. DANKE!

8 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

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

02.03.2017, Victoria Valeria Prassek