

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Relative Expression der microRNA-9, -26b, -34a und -103 im
Spinalganglion der Ratte bei induziertem neuropathischen Schmerz
und Ermittlung einer möglichen Interaktion zwischen microRNA-34a
und der beta-2-Untereinheit eines spannungsgesteuerten
Natriumkanals (SCN2B)**

Dissertation

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

vorgelegt von
Laura Johannsen
2019

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: PD Dr. med. D. Kremer

Förderung

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

Meiner Familie

Zusammenfassung

Neuropathische Schmerzen führen zu einer gesteigerten Schmerzsensation, erhöhtem Schmerzempfinden und Schmerzpersistenz. Die Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen sind nicht vollends geklärt. Die Therapie ist aktuell lediglich symptomatisch orientiert und führt nur selten zu einem vollständigen Abklingen der Schmerzsymptomatik. Eine mögliche Schlüsselrolle in der Entstehung neuropathischer Schmerzen bilden microRNAs (miRs). MiRs sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die über die Regulation der Translation Einfluss auf physiologische und pathologische Prozesse nehmen. Ziel dieser Arbeit war es, eine differentielle Expression von miRs, deren Interaktion mit schmerzrelevanten *Targets* und die Proteinexpression der Ziel-mRNA nach Induktion neuropathischer Schmerzen zu untersuchen. Durch die Detektion möglicher Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen könnten potentielle Therapieansatzpunkte für weiterführende Studien ermittelt werden.

Zur Induktion neuropathischer Schmerzen wurde eine *Chronic Constriction Injury* (CCI) bei männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Nach Randomisierung in zwei Gruppen (n = 24 pro Gruppe) erfolgte eine Freilegung des *Nervus ischiadicus* (*N. ischiadicus*). In einer Gruppe wurde der Nerv ligiert, in der zweiten Gruppe (*Sham*-Gruppe) wurde der Nerv nur freigelegt ohne Bindung der Ligaturen. Zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage nach Induktion der CCI bzw. *Sham*-OP erfolgte die Entnahme der Spinalganglien (DRG) L4 - L6. Zur Untersuchung der Expression der miRs mittels *quantitativer Realtime-PCR* (qPCR) erfolgte eine Auswahl von vier miRs, die sich in einem in unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld durchgeführten *miRNA Microarray* differentiell exprimiert gezeigt hatten. In einer *in-silico* Analyse wurden mögliche schmerzrelevante Ziel-mRNAs ermittelt. Der Nachweis einer Interaktion einer miR mit der ausgewählten Ziel-mRNA erfolgte mittels Luziferase-Assay. Die relative Expression des Proteins der Ziel-mRNA im DRG wurde mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zum Zeitpunkt 12 Tage nach Induktion der CCI untersucht. Für die qPCR wurde die delta-delta-Ct Methode angewandt. Die statistische Überprüfung mit Berechnung der relativen Expressionsunterschiede und des Signifikanzniveaus erfolgte mit dem Programm REST (Version 2009). Die statistische Auswertung für den Luziferase-Assay und ELISA erfolgte mittels ungepaarten *student's t-test*. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

Die Untersuchungen der miR-34a ergaben eine signifikante Herunterregulation der miR-34a (*fold change*: 0,4, * $p = 0,001$) zwölf Tage nach Induktion der CCI. Die Auswertung der qPCR für miR-9, -26b und -103 ergaben keine signifikant veränderte Expression der jeweiligen miR. In der *in-silico* Analyse für miR-34a konnte die mRNA einer beta-2-Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals (SCN2B) ermittelt werden. Im Luziferase-Assay wurde eine Bindung der miR-34a an die mRNA von SCN2B bestätigt. Im ELISA ergab sich keine relevant erhöhte relative Expression des Proteins SCN2B (*vs Sham*). Zusammenfassend führt die Induktion einer CCI nach zwölf Tagen zu einer signifikant verminderten Expression der miR-34a im DRG von männlichen Wistar-Ratten. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Bindung der miR-34a an die mRNA von SCN2B *in-vitro* bestätigt werden. Ein Effekt auf Proteinebene im DRG *in-vivo* im ELISA blieb aus. Es sind weitere Studien notwendig um die funktionelle Rolle der miR-34a und weiterer miRs in der Ausbildung und Persistenz neuropathischer Schmerzen zu untersuchen.

Summary

Neuropathic pain is associated with increased nociception and persistence of symptoms. The underlying pathomechanisms are not completely understood. To date, therapy of neuropathic pain is oriented at symptom relief. A complete absence of pain is rarely achieved. The detection of the underlying pathomechanism would have a significant impact on the development of new therapeutic approaches. It has been previously suggested that microRNAs (miRs) play a key role in the pathogenesis of neuropathic pain. MiRs are small, non-coding RNA molecules that influence physiological and pathological processes through the regulation of translation. The aim of this study was to investigate the expression of miRs, their interaction with pain related targets in-vitro and to examine the protein expression of the target mRNA in-vivo after induction of neuropathic pain.

In order to induce neuropathic pain, chronic constriction injury (CCI) was induced in male Wistar rats. Subsequently, the sciatic nerve was exposed. The rats were randomized in two groups (n = 24 per group). The first group received ligation, whereas in the second group (*sham* group) no ligation was performed. The dorsal root ganglia (DRG) L4 - L6 were removed at four different time points (4 hours, 1 day, 6 days, 12 days, n = 6 per group). In a previously performed miRNA microarray a differential expression of several miRs was detected at the indicated time points after induction of CCI. Four differentially expressed miRs were selected and further investigated in quantitative real-time PCR (qPCR). In in-silico analysis possible pain related target mRNAs were determined. We utilized a luciferase assay to show an interaction between the miR and the selected target mRNA. The relative expression of the target mRNA protein was examined in the DRG by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) twelve days after induction of CCI. The delta-delta-Ct method was used for the qPCR. Statistical analysis was performed with the REST program (version 2009). Differences among groups for the luciferase assay and ELISA were evaluated with the two-tailed student's t-test. The significance level was set at $p < 0.05$.

The miR-34a analysis showed a significant down-regulation of miR-34a (fold change: 0.4, $*p < 0.001$) twelve days after induction of CCI compared to the control group. The qPCR for miR-9, -26b and -103 showed no significant change in the expression pattern. The in-silico analysis for miR-34a revealed the mRNA of a beta-2-subunit of a voltage-gated sodium channel (SCN2B). In the luciferase assay an interaction between miR-34a and the mRNA of SCN2B was confirmed. No significant expression of the protein SCN2B was demonstrated in the ELISA compared to the control group.

In summary, 12 days after induction of CCI the expression of miR-34a is significantly reduced in DRGs of male Wistar rats. For the first time, an interaction of miR-34a with a mRNA of SCN2B was documented. There was no effect on the protein level in the spinal ganglion in vivo. Further studies are needed to investigate the functional role of miR-34a and other miRs in the development and persistence of neuropathic pain.

Abkürzungsverzeichnis

AMPA-Rezeptor	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
BMFZ	Biologisch - Medizinisches - Forschungszentrum
CCI	<i>Chronic Constriction Injury</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
cRNA	komplementäre RNA
d	Tag
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Spinalganglion
ds-miR	Doppelstrang-microRNA
ds-RNA	Doppelstrang-RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessig
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
for	<i>forward</i>
g	G-Kraft
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
h	Stunde
HBSS	<i>Hepes Buffered Saline Solution</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney Cell</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KCC	Kalium/Chlorid-Transporter
KCNK4	<i>Potassium channel subfamily K member 4</i>
kDA	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
miR	<i>microRNA</i>
miR*	Gegenstrang der reifen microRNA
mRNA	<i>messengerRNA</i>

NGF	<i>nerve growth factor</i>
N. ischiadicus	<i>Nervus ischiadicus</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pitx3	<i>Pituitary homeobox 3</i>
PNL	<i>Partial Nerve Ligation</i>
pol II	RNA-Polymerase II
pol III	RNA-Polymerase III
pre-miR	<i>precursor-microRNA</i>
pri-miR	<i>primary-microRNA</i>
PSL	<i>partial sciatic ligation</i>
PWT	<i>Paw Withdrawal Threshold</i>
PWL	Paw Withdrawal Latency
qPCR	quantitative Real-Time-PCR
Ran-GTP	Ran-Guanosintriphosphat
rev	<i>reverse</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RIPA	<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SCI	<i>spinal cord injury</i>
SCN	Untereinheit spannungsgesteuerter Natriumkanal
sek	Sekunde
SNI	<i>spinal nerve injury</i>
SNL	<i>spinal nerve ligation</i>
TAE	<i>TRIS-Acetat-EDTA-Puffer</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TRPV1	<i>transient receptor potential cation channel</i>
3'-UTR	<i>3'-untranslated region</i>
WLAR	<i>Working Luciferase Assay Reagent</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition des neuropathischen Schmerzes	1
1.2	Symptome des Patienten mit neuropathischen Schmerzen	1
1.3	Mechanismen des neuropathischen Schmerzes	2
1.4	Periphere Nervenverletzung führt zu peripherer Sensibilisierung	2
1.5	Natriumkanäle spielen eine Rolle in der Ausbildung von Schmerzen	3
1.6	Zentrale Sensibilisierung bei neuropathischen Schmerzen	4
1.7	Therapie des neuropathischen Schmerzes	5
1.8	MicroRNAs regulieren die Genexpression	5
1.9	Die Biogenese der microRNA findet über einen enzymvermittelten intra- und extranukleären Reifungsprozess statt	6
1.10	MicroRNAs regulieren die Translation	7
1.11	MicroRNAs beeinflussen die Neurogenese	8
1.12	Differentielle Expression von microRNAs bei neurologischen Erkrankungen	9
1.13	MicroRNAs weisen ein verändertes Expressionsmuster bei Schmerzen auf	10
1.14	MicroRNAs weisen ein verändertes Expressionsmuster bei neuropathischen Schmerzen auf	10
2	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Chemikalien	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
3.1.3	Geräte	18
3.1.4	Kits	19

3.1.5	Primer konventionelle PCR	19
3.1.6	Plasmide.....	19
3.1.7	Nukleotide	20
3.1.8	Bakterien und Zellen.....	20
3.1.9	Programme zur Analyse und Datenbanken.....	20
3.2	Methoden	21
3.2.1	Tierexperimentelle Untersuchungen.....	21
3.2.2	RNA-Isolierung mit Trizol.....	22
3.2.3	RNA- Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie	23
3.2.4	miRNA Microarray	23
3.2.5	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion zur Untersuchung der microRNA Expression	23
3.2.6	Konventionelle PCR zur Amplifizierung der miR-34a Sequenz	26
3.2.7	PCR - Produktextraktion aus einem TAE - Agarosegel	29
3.2.8	Klonierung mit dem pGEM®-T Easy Vector	29
3.2.9	Transformation von Escherichia coli.....	31
3.2.10	Restriktionsverdau des pGEM T-Easy Vektors	31
3.2.11	Klonierung der DNA-Fragmente in den pcDNA™ 3.1 Vektor und das pMIR-REPORT™ System	32
3.2.12	Sequenzierung	33
3.2.13	Transfektion von Human Embryonic Kidney 293 Zellen mithilfe der Kalziumphosphatmethode	34
3.2.14	Luziferase-Assay.....	36
3.2.15	β-Galaktosidase Assay.....	37
3.2.16	Enzyme-linked Immunosorbent Assay für SCN2B	39
3.2.17	Statistik.....	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Relative Expression der miR-34a (qPCR)	42

4.2	Relative Expression der miR-9, -26b und -103 (qPCR).....	43
4.3	<i>In-silico</i> Analyse mittels Targetscan	45
4.4	Plasmidsequenzierung der miR-34a und der SCN2B-mRNA.....	46
4.5	Luziferase Assay	48
4.6	ELISA des Proteins SCN2B nach Induktion einer CCI	49
5	Diskussion	50
5.1	Diskussion der Methodik	51
5.2	Diskussion der Ergebnisse	56
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	63
	Abbildungsverzeichnis	64
	Tabellenverzeichnis	65
	Literaturverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 Definition des neuropathischen Schmerzes

Gemäß den Kriterien der *International Association of Pain* wird der neuropathische Schmerz als ein chronischer Schmerz bezeichnet, der „als direkte Konsequenz aus einer primären Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Systems“ entstanden ist [1]. Der akute Schmerz signalisiert in der Regel eine Verletzung des Körpers. Diese Form der Schmerzausprägung ist als Schutzfunktion des Körpers zu verstehen, um eine weitere oder gravierendere Verletzung zu vermeiden [2]. Bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen geht diese Warnfunktion verloren. Sie leiden unter chronischen Schmerzen, die nicht auf einen akuten Reiz zurückzuführen sind [3]. Die Prävalenz neuropathischer Schmerzen in der allgemeinen Bevölkerung beträgt 6,9 – 10 % [4]. Ziel dieser Studie war es, Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen auf molekularer Ebene zu untersuchen, um Hinweise auf mögliche neue Therapieansätze für die Behandlung von Patienten mit neuropathischen Schmerzen zu detektieren.

1.2 Symptome des Patienten mit neuropathischen Schmerzen

Die klinischen Symptome neuropathischer Schmerzen sind vielfältig. Seitens der Patienten werden Negativ- (verminderte Reizwahrnehmung) und Positivsymptome (vermehrte Reizwahrnehmung) berichtet [3]. Baron et al. beschreiben Positivsymptome als spontane, anhaltende Schmerzen ohne vorausgegangenen Stimulus. Zudem können sich Positivsymptome als Hypersensitivität mechanischer oder auch thermaler Stimuli äußern [5, 6]. Hierunter fallen die *Hyperalgesie*, unter der man ein gesteigertes Empfinden eines Schmerzreizes versteht oder auch die *Allodynie*, ein Begriff, der Schmerzen zusammenfasst, welche schon durch geringfügige, physiologische Reize entstehen [7, 8]. Die Pathomechanismen, die zu einer Ausbildung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen führen, sind nur teilweise geklärt.

1.3 Mechanismen des neuropathischen Schmerzes

Im Rahmen der Entwicklung neuropathischer Schmerzen kommt es zu einer Sensibilisierung des nozizeptiven Nervensystems sowohl im verletzten Gewebe (periphere Sensibilisierung – siehe auch Kapitel 1.4) als auch im Rückenmark und Gehirn (zentrale Sensibilisierung – siehe auch Kapitel 1.6). Im menschlichen Körper fungieren freie Nervenendigungen als Nozizeptoren. Das afferente System wird von dünn myelinisierten A δ - und unmyelinisierten C-Fasern gebildet, deren Zellkörper sich im Spinalganglion (DRG) befinden [9, 10]. Die Fasern sind für die Transduktion vermeintlich noxischer Reize verantwortlich und führen bei ausreichender Stimulation zu einer Schmerzempfindung [3, 9]. Eine veränderte Schmerztransduktion kann durch eine vermehrte Expression von Ionenkanälen im Rahmen der peripheren Sensibilisierung begünstigt werden.

1.4 Periphere Nervenverletzung führt zu peripherer Sensibilisierung

Infolge einer peripheren Nervenverletzung entwickelt sich (durch Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene) eine pathologische Spontanaktivität. Dies führt im Verlauf zu einer pathologischen Schmerzempfindung mit erhöhter Schmerzempfindung ohne vorausgegangenen adäquaten Stimulus [3]. Im Vordergrund steht eine ektope, spontane Aktivität, die durch eine vermehrte Expression von Ionenkanälen an verletzten und in der Umgebung befindlichem unverletzten Nervengewebe entsteht [11]. Im Rahmen der peripheren Sensibilisierung kommt es beispielsweise in umliegenden, unverletzten C - und A - Fasern zu einer veränderten Expression von Capsaicin - gesteuerten Hitzerezeptoren [12-14]. Auch in den ipsilateral zur Läsion gelegenen DRGs sind diese Hitzerezeptoren bei neuropathischem Schmerz vermehrt exprimiert [13]. Dies führt zu dem Symptom der Hitzehyperalgesie [15]. Eine erhöhte Expression von Ionenkanälen kann durch Senkung des Schwellenpotenzials auch zu einer erhöhten elektrischen Erregbarkeit führen [16, 17]. Eine vermehrte Expression von Natriumkanälen nach einer peripheren Nervenverletzung ist bereits beschrieben [18] (siehe auch Kapitel 1.5).

Eine Nervenverletzung geht zudem mit einer Entzündungsreaktion und Wallerschen Degeneration einher. Es folgt die Infiltration durch Makrophagen

und inflammatorischer Zellen wie neutrophilen Granulozyten und T-Zellen [19, 20]. Deren Ausschüttung von Zytokinen wie *nerve growth factor* (NGF) und dem inflammatorisch wirkenden Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) führen zu einer weiteren Schädigung von verletzten und unverletzten Nervenfasern. Es kommt zu einer Expression weiterer Ionenkanäle und Adrenorezeptoren, die eine pathologische Schmerzantwort dieser Nerven zur Folge hat [11, 21-24].

1.5 Natriumkanäle spielen eine Rolle in der Ausbildung von Schmerzen

Natriumkanäle finden sich ubiquitär und sind unter anderem für die Regeneration von Aktionspotenzialen oder für die Weiterleitung von Signalen (wie Schmerzsignalen) verantwortlich [25]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression bestimmter spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Nav) eine Rolle in der Schmerzwahrnehmung spielt. Beispielsweise wird der embryonische Kanal Nav 1.3 bei einer peripheren Nervenläsion zunehmend an peripheren Nerven re-exprimiert [26]. Die Induktion einer *Spinal Cord Injury* (SCI) führt über einen selektiven *Knockdown* des Natriumkanals Nav 1.3 zu einem reduzierten Schmerzverhalten bei Tieren [26]. Bei einer *Gain-of-function* Mutation (Verstärkung der Genaktivität) des Natriumkanals Nav 1.7 wurde eine schmerzhafte Neuropathie ausgelöst [27, 28]. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind Transmembranproteine, die aus einer porenbildenden 260 kDa α - Untereinheit und einer 30 bis 40 kDa β -Untereinheit bestehen (Übersicht in [29]). Die β -Untereinheit bindet nichtkovalent (SCN1B und SCN3B) oder kovalent (SCN2B und SCN4B) an die α -Untereinheit [30-33]. Die α -Untereinheit ermöglicht die Ionenpermeation, die β -Untereinheiten modifizieren das Kanalschaltverhalten [34, 35]. Die Gene SCN1A – SCN11A kodieren für die α -Untereinheiten der Kanäle Nav 1.1 - 1.9. Nav 1.1, 1.2, 1.3 sowie Nav 1.6. und finden sich vorwiegend im zentralen Nervensystem, Nav 1.4 in der Skelettmuskulatur, Nav 1.5 im Herzen und Nav 1.7, 1.8 und 1.9 vorwiegend im peripheren Nervensystem [25]. Die α -Untereinheiten bestehen aus vier zusammengelagerten homologen Domänen (I-IV), die aus jeweils sechs α -helikalen Transmembrandomänen bestehen [36]. Die fünf β -Untereinheiten (β 1, β 1B, β 2, β 3, β 4) werden von den Genen SCN1B – SCN4B kodiert. Den

β -Untereinheiten ist kein spezifisches Gewebe zuzuordnen. Sie werden unter anderem im Nervengewebe exprimiert [37].

Die Untereinheiten bestehen aus einer extrazellulär gelegenen N-terminalen Region, die eine Immunglobulin-Domäne enthält. Alle Untereinheiten, bis auf β 1B, sind Transmembranproteine mit einer α -helikalen transmembranösen Domäne sowie einer kurzen intrazellulären Domäne [37].

Bei SCN2B-Null Mäusen findet sich nach Induktion neuropathischer Schmerzen eine abgeschwächte Entwicklung einer mechanischen *Allodynie* im Vergleich zu Wildtypmäusen [38, 39]. Nach Induktion neuropathischer Schmerzen mittels *Spinal Nerve Ligation* (SNL) bzw. *Spared Nerve Injury* (SNI) konnte ein Anstieg der SCN2B-Proteinkonzentration in unverletzten und verletzten Nervenfasern von Mäusen gemessen werden [39]. Pertin et al. wiesen mittels Immunhistochemie und Western Blot ein erhöhtes Proteinlevel von β 2-Untereinheiten in DRGs sieben Tage nach Durchführung einer SNI nach [39]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass SCN2B auf molekularer Ebene eine relevante Rolle in der Entwicklung neuropathischer Schmerzen spielen könnte. Neben der peripheren Sensibilisierung mit vermehrter Expression von Natriumkanälen wird die Ausbildung neuropathischer Schmerzen durch eine zentrale Sensibilisierung begünstigt.

1.6 Zentrale Sensibilisierung bei neuropathischen Schmerzen

Das zentrale Nervensystem (Thalamus, kortikale Bereiche und Dorsalhorn des Rückenmarks) unterliegt im Prozess des neuropathischen Schmerzes ebenfalls molekularer und struktureller Veränderungen [8]. Die zentrale Sensibilisierung folgt einem Zusammenspiel aus synaptischer Plastizität, Aktivierung von Gliazellen, verminderten Signalschwellen sowie einer verminderten endogenen Modulation [19, 40]. Im Hinterhorn des Rückenmarks werden homo- von heterosynaptischen Mechanismen der Sensibilisierung unterschieden [41, 42]. Bei der homosynaptischen Sensibilisierung führt der stete Eingang von niederfrequenten Schmerzimpulsen über pathologisch sensibilisierte C-Fasern zu einer Summierung der aufeinanderfolgenden Reize und letztendlich zu einer Verstärkung der Reizantwort („*wind-up*“ Phänomen) [8, 41, 43]. Bei der heterosynaptischen Sensibilisierung finden auch nicht-nozizeptive A β -Fasern

Anschluss an das nozizeptive System, sodass auch beispielsweise Berührungen der Haut zu Schmerzempfindungen führen [44-46]. Beide Phänomene (homo- und heterosynaptische Mechanismen) lassen sich durch eine erhöhte Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat [47] und einer gesteigerten synaptischen Effizienz erklären [8]. Die Herunterregulation präsynaptischer μ -Rezeptoren, die die Freisetzung von Glutamat hemmen, resultiert in einer vermehrten Glutamatausschüttung [47]. Postsynaptisch kommt es durch die Öffnung von *N-Methyl-D-Aspartat* (NMDA) Kanälen zu einem erhöhten Kalzium-Einstrom [48, 49]. Eine vermehrte Expression von Kalziumkanälen im Rückenmark führt ebenfalls zu einer erhöhten Ausschüttung von Glutamat [50]. Kommt es nun zu einer Änderung der inhibitorischen Kontrolle innerhalb des Rückenmarks kann dies zu einer Verstärkung der Schmerzempfindung führen. Eine kausale Therapie neuropathischer Schmerzen ist bislang nur eingeschränkt möglich.

1.7 Therapie des neuropathischen Schmerzes

Unter Hinweis auf die aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie zur Behandlung neuropathischer Schmerzen wird deutlich, dass derzeit keine adäquate Therapie zur Behandlung neuropathischer Schmerzen zur Verfügung steht. Dies wird erkennbar, wenn man die Definition einer effektiven Schmerzreduktion genauer betrachtet. Eine Schmerzreduktion um 30 – 50 % gilt als effektiv. Weitere Ziele beinhalten eine Teilhabe am aktiven Leben durch Verbesserung der Lebensqualität, Erhaltung der sozialen Aktivität, des sozialen Beziehungsgefüges oder der Arbeitsfähigkeit. Tatsächlich wird eine völlige Schmerzfreiheit nur selten erreicht [51]. Ein Pathomechanismen-orientierter medikamentengesteuerter Eingriff könnte zu einer adäquaten Schmerzlinderung bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen führen. Einen neuen Ansatzpunkt in der Therapie neuropathischer Schmerzen könnten microRNAs (miR) darstellen.

1.8 MicroRNAs regulieren die Genexpression

Im Rahmen individueller Anpassungsvorgänge von Zellen haben sich verschiedene Regulationsmechanismen entwickelt. Ein Regulationsmechanismus besteht in einer veränderten Expression von miRs. MiRs sind

kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, welche die Genexpression auf Ebene der Translation durch Interaktion mit der Ziel-messengerRNA (mRNA) modulieren [52]. MiRs wurden erstmals 1993 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben [53]. Sie finden sich in Tieren, Pflanzen und Menschen und werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert [54]. MiRs bestehen aus 21 bis 23 Nukleotiden und binden an die *3'-Untranslated Region* (3'-UTR) von mRNAs. Eine partielle Komplementarität der miR an die 3'-UTR einer mRNA führt zu einer Hemmung der Translation, während eine annähernd exakte Basenpaar-Übereinstimmung einen Abbau der gebundenen mRNA zur Folge hat [55, 56]. Eine Interaktion einer einzelnen miR ist mit der 3'-UTR verschiedener mRNAs möglich [57]. Die Biogenese der miR verläuft zu Beginn innerhalb und später außerhalb des Zellkerns.

1.9 Die Biogenese der microRNA findet über einen enzymvermittelten intra- und extranukleären Reifungsprozess statt

Die Gene der miR werden durch die RNA-Polymerase II (pol II) oder RNA-Polymerase III (pol III) transkribiert [58, 59]. Es entstehen *primary-microRNAs* (pri-miR) unterschiedlicher Länge mit einer oder mehreren Haarnadelschleifen [60, 61]. Im weiteren Verlauf der Biogenese werden diese Schleifen der pri-miR durch einen Komplex, bestehend aus RNase III (Drosha) sowie dem Coenzym *DiGeorge syndrome critical region gene 8*, einem Protein mit zwei doppelsträngigen RNA (dsRNA) Bindestellen, erkannt und gespalten [62-66]. Es entstehen *precursor-microRNAs* (pre-miR) mit einem 5' Phosphat und einem 3' Überhang von zwei bis vier Nucleotiden [67]. Über *Exportin-5* und Kofaktor *Ran-Guanosintriphosphat* (Ran-GTP) gelangt die pre-miR aktiv ins Zytoplasma [68-70]. Im Zytoplasma wird die pre-miR durch den Komplex *Dicer*, der neben einer dsRNA bindenden Domäne mehrere Domänen enthält, zu einer doppelstrang-microRNA (ds-miR) gespalten. Es wird ein reifer (miR) von einem Gegenstrang (miR*) unterschieden, deren Basen teilweise gepaart sind [71, 72]. Die miR* ist bis zu 100fach weniger im Organismus nachzuweisen als der reife miR-Strang [73]. Die Stabilität des 5' Ende der miR und miR* beeinflussen den Einbau in den *RNA induced silencing complex* (RISC). Da eine Bindung an eine 3'-UTR der Ziel-mRNA nur mit einem Einzelstrang möglich ist, werden die Stränge

durch Argonautproteine getrennt und nur der Führungsstrang verbleibt im Komplex – es bildet sich der RISC [74, 75]. Dabei bildet der Strang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität (miR) mit weiteren Proteinen den RISC [74, 75]. Der Gegenstrang miR* wird abgebaut [71, 72]. In Abbildung 1 ist die Biogenese der miR dargestellt.

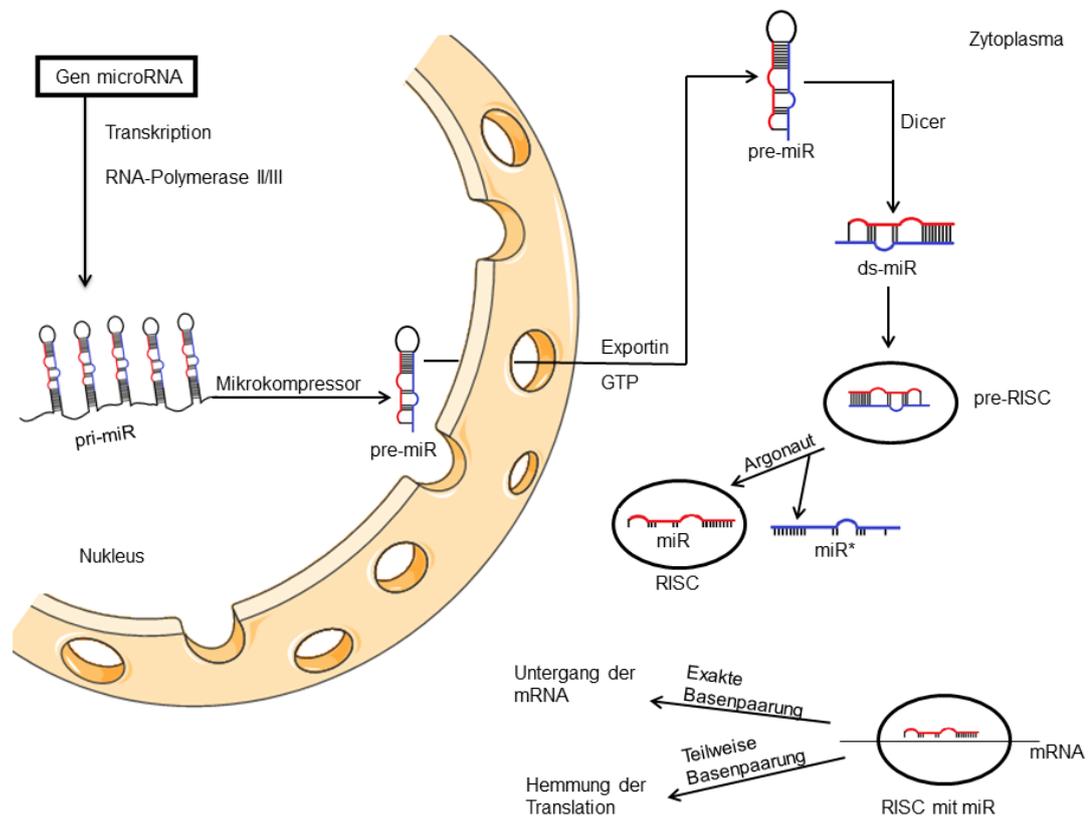


Abb. 1 - Biogenese der microRNA

In der Abbildung ist die Biogenese der microRNA (miR) dargestellt. Die RNA-Polymerase II/III transkribieren im Nukleolus die Gene der miR. Die so entstandene *primary-microRNA* (pri-miR) wird durch den Mikrokompressor erkannt und gespalten. Die *precursor-microRNAs* (pre-miR) werden über *Exportin-5* und den Kofaktor *Ran-Guanosintriphosphat* (GTP) aktiv ins Zytoplasma befördert. Mittels *Dicer* werden diese zu einer Doppelstrang-microRNA (ds-miR) gespalten. Die ds-miR bildet mit dem Komplex RISC den pre-RISC. Nach Argonaut-vermittelter Spaltung der ds-miR in einen reifen Strang (miR) und einen Gegenstrang (miR*) bildet sich mit Bindung des reifen Strangs der RISC. Der RISC mit der miR bindet an eine 3'-UTR einer mRNA. Bei exakter Basenpaarung kommt es zu einem Argonauten-vermittelten Untergang der Ziel-mRNA, bei teilweiser Paarung zur Hemmung der Translation.

1.10 MicroRNAs regulieren die Translation

Über eine Bindung einer miR an die 3'-UTR einer mRNA kommt es bei annähernd exakter Basenpaarung zu einem Untergang der Ziel-mRNA,

bei nur teilweiser Paarung zur Hemmung der Translation [55, 56]. Eine veränderte Expression von miRs in Zusammenhang mit der Neurogenese und neurologischen Erkrankungen wurde bereits beschrieben.

1.11 MicroRNAs beeinflussen die Neurogenese

Die Neurogenese beinhaltet die Entwicklung von Nervenzellen aus Stamm- oder Vorläuferzellen und deren weitere Differenzierung. An die embryonale Neurogenese schließt sich die adulte Neurogenese an, die vor allem in der subventrikulären Zone der lateralen Ventrikel sowie in der subgranulären Zone des Hippocampus stattfindet [76-79]. Eine Vielzahl der miRs haben eine Funktion im Rahmen der Neurogenese [80]. MiRs finden sich in Neuronen häufig in der Nähe von Polyribosomen, dem Ort an dem die Translation der mRNA stattfindet [81]. Das Enzym *Dicer* vermittelt in der Biogenese der miR die Spaltung der pri-miR zur ds-miR und ist somit für die Entwicklung der miRs unabdinglich [56]. In konditionellen Knock-out Studien mit Deletion des Enzyms *Dicer* in neuronalen Vorläuferzellen im zerebralen Kortex von Mäusen konnte eine verminderte Ausbildung des Kortex, eine erhöhte Apoptoserate, die Ausbildung schmaler Ventrikel sowie eine Fehlorganisation der Schichtung des Kortex beobachtet werden [82, 83]. Eine Deletion des Proteins *Dicer* im zentralen Nervensystem von Mäusen hatte eine embryonale Letalität zur Folge [83].

Es findet sich eine Spezifität für verschiedene miRs sowohl für bestimmte Zeitpunkte in der Neurogenese als auch für zelluläre Expressionsmuster [84]. Es konnte eine vermehrte Expression einiger miRs, wie der miR-124, in postmitotischen Neuronen in der Kultur von humanen pluripotenten Stammzellen belegt werden [84, 85]. Für weitere miRs, wie Mitglieder der miR-200 Familie, wurde eine Assoziation in der Entwicklung des olfaktorischen Systems beobachtet [86]. Die in den Dendriten lokalisierte miR-134 führte über die Hemmung der Translation der LIM-Kinase I zu einem verminderten Wachstum von Dornfortsätzen in Dendriten [87]. Neben der Interaktion von miRs in der Neurogenese, konnte eine Interaktion von miRs bei neurologischen Erkrankungen beobachtet werden.

1.12 Differentielle Expression von microRNAs bei neurologischen Erkrankungen

Eine differentielle Expression von miRs bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer ist bekannt. Bei Morbus Alzheimer, einer Erkrankung, die mit einer kognitiven Dysfunktion und Verhaltensveränderungen einhergeht, konnte eine differentielle Expression von miRs sowie ein Einfluss von miRs auf die Regulation krankheitsassoziiierter Gene belegt werden [88, 89]. So zeigte sich im Hippocampus von Alzheimerpatienten beispielsweise eine vermehrte Expression der miR-9. Eine weitere Charakterisierung möglicher relevanter *Targets* war nicht erfolgt [90]. Die mRNA des Komplementfaktors H, ein Regulator der inflammatorischen Antwort im Gehirn, ist ein *Target* der miR-146a. Eine Zunahme der Expression der miR-146a im Hippocampus bei Alzheimerpatienten wurde bereits belegt [91]. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass die Hemmung der mRNA des Komplementfaktors H durch eine vermehrte Expression von miR-146a zu einer inflammatorischen Neurodegeneration bei Patienten mit Alzheimer führt [91].

Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der es über einen Verlust von dopaminergen Neuronen unter anderem zu einer Abnahme der motorischen Fähigkeiten der Patienten kommt. MiR-133b, welche vorwiegend im Mesenzephalon zu finden war, beeinflusst einen Transkriptionsfaktor (*Pituitary homeobox 3* - Pitx3) dopaminergischer Neuronen [92]. Kim et al. zeigten, dass Pitx3 die Transkription von miR-133b steigerte und Pitx3 posttranskriptional durch miR-133b herunterreguliert war. Bei Parkinsonpatienten konnte eine verminderte Expression der miR-133b belegt werden [92]. Eine funktionelle Bedeutung der miR-133b konnte bisher nicht abschließend geklärt werden.

Eine selektive Deletion von *Dicer* im Kleinhirn von Mäusen ging mit einem Purkinjezelluntergang und der Ausbildung des Krankheitsbildes der Ataxie einher [93]. Auch in dopaminergen Neuronen des Mesenzephalon sowie in Neuronen des Rückenmarks konnte bei einer Deletion von *Dicer* eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden [92, 94]. In der Ausbildung von Schmerzen wurde ebenfalls eine differentielle Expression von miRs detektiert.

1.13 MicroRNAs weisen ein verändertes Expressionsmuster bei Schmerzen auf

In einer der ersten Studien zu inflammatorischem Schmerz in Verbindung mit miRs wurde bei einem *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)-induzierten inflammatorischen Schmerz eine differentielle Repression spezifischer neuronaler miRs in ipsilateralen trigeminalen Ganglien beobachtet [95]. In einer weiteren Studie war die Expression der miR-155 und miR-233 im präfrontalen Kortex von Mäusen nach Induktion inflammatorischer Schmerzen signifikant erhöht [96]. Die miR-124 war neben weiteren miRs nach einer peripheren Nervenverletzung im DRG vermindert exprimiert. Eine intrathekale Injektion von miR-124 hatte bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen einen anti-nozizeptiven Effekt zur Folge [97, 98].

1.14 MicroRNAs weisen ein verändertes Expressionsmuster bei neuropathischen Schmerzen auf

Die Induktion neuropathischer Schmerzen durch *Chronic Constriction Injury* (CCI) führt zu einer signifikant erhöhten Expression der miR-341 im DRG sowie zu einer signifikanten Abnahme der Expression von miR-181a -3p, -203 und -541-3p im Dorsalhorn des Rückenmarks [99]. Auch im Hippocampus hatte die Induktion neuropathischer Schmerzen eine Herunterregulation von miRs zur Folge [100, 101]. Ein verändertes Expressionsmuster von miRs im ipsilateralen DRG nach Induktion neuropathischer Schmerzen wurde bereits bestätigt [102]. Im Vorfeld der vorliegenden Studie wurde in unserer Arbeitsgruppe ein *miRNA Microarray* zur Detektion differentiell exprimierter miRNAs im DRG der Ratte nach Induktion der CCI im Vergleich zu einer scheinbehandelten Gruppe durchgeführt [103]. Hier konnte zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage nach Induktion der CCI eine differentielle Expression von miRNAs beobachtet werden. Die nachfolgende Tabelle 1 stellt die Anzahl der zu den Zeitpunkten differentiell exprimierten miRs dar.

Unter- suchungs- zeitpunkt	Gesamtzahl differenziell exprimierter miRs	Anzahl vermindert exprimierter miRs	Anzahl vermehrt exprimierter miRs
4 Stunden	47	22	25
1 Tag	3	3	-
6 Tage	26	13	13
12 Tage	27	7	20

Tabelle 1 – Anzahl differenziell exprimierter miRs im *miRNA Microarray*

In der Tabelle wird die Anzahl der im *miRNA Microarray* [103] differenziell exprimierten miRs im Spinalganglion der Ratte zu den Untersuchungszeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage nach Induktion einer CCI dargestellt.

Es erfolgte die Auswahl der miR-9, -26b, -34a und -103. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse des *miRNA Microarray* [103] der vier gewählten miRs zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten dargestellt.

Untersuchungs- zeitpunkt	miR	<i>fold change</i>	p-Wert
4 Stunden	miR-9	1,36	0,02
	miR-34a	0,79	0,017
	miR-26b	1,43	0,012
1 Tag			
6 Tage	miR-34a	0,89	0,032
12 Tage	miR-103	0,93	0,047
	miR-34a	0,79	0,015

Tabelle 2 - Ergebnis der Analyse des *miRNA Microarrays*

Dargestellt sind die im *miRNA Microarray* [103] signifikant ($p < 0,05$ vs. *Sham*) differenziell exprimierten miRs zu den Untersuchungszeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage mit dem jeweiligen *fold change* und p - Wert, n = 4.

Die Auswahl der miR-9 erfolgte aufgrund der vermehrten Expression in neurogenen Bereichen zum Zeitpunkt der Entwicklung des Nervensystems. Auch im adulten Nervensystem von Wirbeltieren fand sich die miR-9 vermehrt exprimiert [104]. MiR-9 beeinflusst die Promotion der Neurogenese, Proliferation, Differenzierung und Migration von neuronalen Stammzellen [84,

104, 105]. Eine relevante Beeinflussung der Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen durch die miR-9 ist bisher nicht bekannt. In der *in-silico* Analyse für miR-9 konnte ein Kaliumkanal KCNK4 (*Potassium channel subfamily K member 4*) ermittelt werden. Bei neuropathischen Schmerzen fand sich KCNK 4 vermindert exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe [106]. Der *miRNA Microarray* ergab für miR-9 eine signifikant erhöhte Expression vier Stunden nach Induktion der CCI.

Die miR-26b war in einem Alzheimer-Mausversuch vermehrt exprimiert und beeinflusst die Promotion der Expression von Amyloid-beta [107]. MiR-26 beeinflusst somit neurologische Prozesse. Eine Interaktion der miR-26b in neurogenen Bereichen wie der DRGs bei der Ausbildung neuropathischer Schmerzen ist denkbar. Im *miRNA Microarray* war die Expression der miR-26b zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Induktion der CCI signifikant erhöht. Favereaux et al. zeigten, dass ein Knock-down der miR-103 in einem neuropathischen Tierversuch zu einem erhöhten Schmerzempfinden führt [108]. Die miR-103 reguliert drei Untereinheiten eines Kalziumkanals (Ca(v)1.2) im Hinterhorn des Rückenmarks. Eine intrathekale Injektion von miR-103 führte über die Interaktion der miR-103 mit drei Untereinheiten des Kalziumkanals zu einer Schmerzreduktion [108]. Auch Enes et al. ermittelten, dass ein Knock-down des Ca(v)1.2-Kanals im Nervensystem sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* das axonale Wachstum begünstigte. Zudem zeigte die Studie, dass bei axonalen Läsionen nach Induktion einer PNL eine relevante Herunterregulation des Ca(v)1.2-Kanals auf Proteinebene im DRG zur Folge hat [109]. Eine differentielle Expression der miRNA-103 im DRG der Ratte und die potentielle Beeinflussung neuropathischer Schmerzen sollte weitergehend untersucht werden. Im *miRNA Microarray* zeigte sich die miR-103 12 Tage nach Induktion der CCI signifikant vermindert exprimiert.

Für die miR-34a ergab sich zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 6 Tage und 12 Tage nach Induktion der CCI im *miRNA Microarray* eine signifikante Herunterregulation der Expression. Eine Inhibition der miR-34a führte zu einem verminderten dendritischen Wachstum von kortikalen Neuronen in Mäusen, während eine erhöhte Expression der miR eine Verkürzung der Länge und Verästelung der Dendriten zur Folge hat [110]. Des Weiteren wurde ein erhöhtes Expressionsmuster der miR-34a im Hippocampus von

Ratten nach Status epilepticus erfasst [111-113]. Der Nachweis der miR-34a in neuronalem Gewebe und der Einfluss auf kortikale Neurone legt einen möglichen neuromodulatorischen Effekt auch im Rahmen neuropathischer Schmerzen nahe. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht werden.

2 Fragestellung

MiRs regulieren die Proteinexpression und nehmen Einfluss auf unterschiedlichste pathologische und physiologische Prozesse des Körpers. In welchem Umfang miRs einen Einfluss auf pathophysiologische Prozesse in der Ausbildung und Persistenz neuropathischer Schmerzen haben, ist derzeit nicht vollends geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, die differentielle Expression ausgewählter miRs nach Induktion neuropathischer Schmerzen und deren Interaktion mit möglichen schmerzrelevanten mRNAs zu untersuchen. Des Weiteren sollte ein möglicher Effekt auf Proteinebene näher betrachtet werden.

Im Einzelnen werden in dieser Arbeit folgenden Fragen beantwortet:

1. Führt die Induktion einer CCI zu verschiedenen Zeitpunkten in der Ausbildung neuropathischer Schmerzen zu signifikant veränderten Expressionsmustern der miR-9, -26b, -34a und -103 im Spinalganglion der Ratte im Vergleich zu *Sham*?
2. Findet sich mittels *in-silico* Analyse eine potentielle Ziel-mRNA der signifikant veränderten miR-34a, die eine Rolle in der Ausbildung von neuropathischen Schmerzen spielen könnte?
3. Kann mittels Luziferase-Assay eine Interaktion der miR-34a mit der mRNA von SCN2B nachgewiesen werden?
4. Hat die veränderte Expression der miR-34a 12 Tage nach Induktion einer CCI einen Effekt auf das Proteinlevel von SCN2B im Spinalganglion der Ratte?

Zur Beantwortung der genannten Fragen wurde folgender methodischer Ansatz gewählt.

Zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage nach Induktion einer CCI erfolgte die Entnahme der Spinalganglien L4 - L6. Mittels *quantitativer Real-Time PCR* (qPCR) erfolgte eine Untersuchung der

differentiellen Expression der gewählten miRs, der miR-9, -26b, -34a und -103. Mögliche schmerzrelevante *Targets* der differentiell exprimierten miRs wurden durch eine *in-silico* Analyse (*Target Scan*) ermittelt. Die Ermittlung einer Interaktion der miR-34a mit der mRNA von SCN2B wurde mittels Luziferase-Assay durchgeführt. Für den Luziferase-Assay wurden Plasmide, die die Sequenz der miR und der mRNA kodieren, synthetisiert und eine Transfektion mit *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293 Zellen durchgeführt. Die relative Veränderung der Proteinkonzentration von SCN2B im Spinalganglion wurde mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agar-Agar, bakteriologisch	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Agarose(-Neeo-Ultra-Qualität)	Carl Roth, Karlsruhe
ATP, Na-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt
Coenzym A, Na-salt	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM Medium	Pan, Aidenbach
DNA-Leiter, 100 bp, äquimolar	Carl Roth, Karlsruhe
dNTPs (10 mM)	Promega, Madison, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol (unvergällt)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Fluka, Steinheim
IPTG (126 mM)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ligase reaction buffer (5x)	Invitrogen, Darmstadt
Luziferin	Acros Organics, Belgien
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (25 mM)	Axon, Kaiserslautern
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
MicroRNA Assay miR-34a	Applied Biosystems, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U)	Promega, Madison, USA
M-MLV 5x Puffer	Promega, Madison, USA
Na-Acetat (30 mM) (BioXtra, ≥ 99,0 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na-EDTA (12 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka, Steinheim

Orange G	Chroma/Waldeck GmbH & Co KG, Münster
Random Primer	Promega, Madison, USA
RNAse Inhibitor (25 U)	Promega, Madison, USA
Sigma 7-9 (für TAE-Stocklösung)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Stickstoff	Linde AG, Düsseldorf
Succrose	Carl Roth, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	Axon, Kaiserslautern
TaqMan MicroRNA Assay U6	Applied Biosystems, Darmstadt
Tricine, pH 7,8	Carl Roth, Karlsruhe
Tris Hydrochloride (Tris-HCL) (60 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIzol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PanChemie, Kerpen
Trypan-blue	Fluka, Steinheim
Trypton	Fluka, Steinheim
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal (49 mM)	Carl Roth, Karlsruhe
10x Buffer B (Mg ²⁺ free)	Axon, Kaiserslautern

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Glaspipette	Brandt, Wertheim
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nürnberg
Micro Tube 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Petrischale 60 mm / 100 mm	Sarstedt, Nürnberg
Pipetten Eppendorf <i>Research</i> ®	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen <i>TipOne</i> , mit/ohne Filter (10, 200, 1000 µl)	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Safe-lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Tube (13 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg

Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
96-Well Base	Applied Biosystems, Darmstadt
96 WellMultiply® PCR-Plate	Sarstedt, Nürnberg

3.1.3 Geräte

Abzug	Vinitrex, Coswig
Autoklav	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Feinwaage LA 230 S	Sartorius, Göttingen
Heizblock	neoLab, Heidelberg
Lichtmikroskop AE 30	Motic, Wetzlar
Magnetrührer	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikrobiologische HERA safe	Sicherheits-Werkbank Kendro, Langenselbold
Mikrowelle	Panasonic, Wiesbaden
Nanodrop	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Schweiz
7300 RealTimePCR Cyclor	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Schweiz
Plattformschüttler Unimax 1010 mit Heizmodul 1000	IKA, Staufen
Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000)	Thermo Scientific, MA, USA
Thermocycler (C1000™ Thermal Cycler)	Bio-Rad, München

Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Transferkammer	Bio-Rad, München
UV-Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge 5810 R / 5417 R	Eppendorf, Hamburg

3.1.4 Kits

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Universal PCR MasterMix, No AmpErase®UNG	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcriptions Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Rat sodium channel subunit beta-2 (SCN2B) ELISA Kit	Cusabio, Houston, USA
TOPO®TA Cloning®Kit	Thermo Scientific, MA, USA

3.1.5 Primer konventionelle PCR

miR34a_for	5'-AGTCGTAAGCTTCTACACGTCTTTCTCCCACA GC-3'
miR34a_rev	5'- GTCGTGAATTCTTACCCCTACATGCAAAC TTT TCT-3'

3.1.6 Plasmide

pc-DNA™3 (+/)	Invitrogen, Darmstadt
pMIR-REPORT™ System	Applied Biosystems, Darmstadt
pGEM-T Easy Vektor	Promega, Madison, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Genehmigung des Landesamtes für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 8.87-51.04.20.09.343) von den Tiermedizinerinnen Dr. med. vet. Franziska Barthel und Andrea Urban durchgeführt. Für das Projekt wurden 48 männliche Wistar-Ratten mit einem Initialgewicht von 290 - 310 Gramm aus der hauseigenen Zucht der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf in zwei Gruppen (n = 24 pro Gruppe) randomisiert. Alle Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital anästhesiert. In beiden Gruppen wurde der *N. ischiadicus* freigelegt. In einer Gruppe erfolgte die Induktion einer *Chronic Constriction Injury* (CCI) nach Bennett und Xie [114] in der zweiten Gruppe wurde der Nerv freigelegt, die Bindung des Nervens aber nicht durchgeführt (*Sham*). Zur Prüfung des neuropathischen Schmerzes testeten die Tiermediziner die Tiere vor der OP und vor Gewebeentnahme auf mechanische *Allodynie* und *Hyperalgesie*. Die Testung der *Allodynie* wurde mittels von Frey-Filamenten durchgeführt, bei der ein Pfotenrückzugs-Schwellenwert (*Paw Withdrawal Threshold* (PWT)) in Gramm ermittelt wurde. Hierbei wird das von Frey-Filament gegen die plantare Hinterpfote gedrückt. Die Auslösung eines mechanischen Reizes führt zu einem Zurückziehen der Pfote durch das Tier. Ein verkürzter PWT spricht für eine verstärkte Schmerzantwort (pronozizeptiv), während ein verlängerter PWT auf eine verminderte Schmerzantwort (antinozizeptiv) hinweist. Ein signifikant verkürzter PWT im Vergleich zur Kontrollgruppe wird als Hinweis auf eine bestehende Neuropathie gewertet. Die Messung der *Hyperalgesie* erfolgte mittels Plantar Test 7370 (Ugo Basile, Comerio; Italien) durch die Erfassung einer Pfotenrückzugslatenz (*Paw Withdrawal Latency* (PWL)). Durch Erzeugung eines Hitzestrahls von 50 Watt gegen die plantare Hinterpfote, der durch Anheben der Pfote durch das Tier beendet werden kann, wird die PWL in Sekunden gemessen. Ähnlich wie bei der PWT entspricht eine verkürzte PWL einer verstärkten Schmerzantwort (pronozizeptiv).

Die Probenentnahme der Spinalganglien (DRG) L4 - L6 erfolgte nach Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital (120 mg/kg KG). Es wurden insgesamt 48 Tiere in die Untersuchung eingeschlossen. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden jeweils 6 Tiere auf die einzelnen Gruppen (CCI: n = 6 und *Sham*: n = 6) aufgeteilt. Die Entnahme der Spinalganglien erfolgte zu folgenden Zeitpunkten nach Induktion der CCI und *Sham*-OP:

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

Die Spinalganglien wurden in flüssigen Stickstoff überführt und bei – 80 °C gelagert.

3.2.2 RNA-Isolierung mit Trizol

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Single-Step-Methode [115]. Es wurde das Trizol® Reagent nach den Angaben des Herstellers Invitrogen angewendet. Die Gewebeprouen (n = 6 pro Gruppe) wurden in flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Eine Homogenisierung der DRGs erfolgte in 1 ml Trizol. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur und Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform wurden die Proben für 15 sek handgeschüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde entfernt und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Nach Hinzufügen von 0,5 ml Isopropylalkohol und vortexen des Gemisches wurde die Reaktion erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurde in einer anschließenden Waschphase mit 1 ml Ethanol (100 %) erneut gevortext und 5 min bei 7.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde erneut wiederholt. Das entstandene Pellet wurde im Abzug bei Raumtemperatur für bis zu 15 min getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde das Pellet mit 95 °C heißem, RNase-freiem, Wasser resuspendiert. Die Bestimmung des RNA-Gehalts sowie der Reinheit erfolgte spektralphotometrisch. Die RNA wurde bei – 80 °C gelagert.

3.2.3 RNA- Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Die Ermittlung des RNA-Gehalts sowie deren Reinheit erfolgte mittels NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometers im Biologisch - Medizinischen - Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Die Messung des RNA-Konzentrationsgehalts erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm Wellenlänge mit jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe. Eine Aussage über eine mögliche Proteinkontamination lässt sich durch das Verhältnis der gemessenen Absorption bei 260 nm und bei 280 nm treffen. Eine reine RNA sollte einen Quotienten von 1,8 - 2,0 aufweisen.

3.2.4 miRNA Microarray

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe ein *miRNA Microarray* (Hersteller Agilent) durchgeführt [103].

Der Array wurde im BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Karl Köhrer durchgeführt und statistisch ausgewertet. Eine Qualitätskontrolle der Proben erfolgte mit dem RNA 6000 Nano Chip. Auf Basis der Ergebnisse aus dem *miRNA Microarray* erfolgte die Auswahl von differentiell exprimierten miRNAs. In Kapitel 1.14. sind die differentiell exprimierten miRs und die Auswahlkriterien der miRs für die vorliegende Arbeit dargestellt.

3.2.5 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion zur Untersuchung der microRNA Expression

Bei der *quantitativen Real-Time-PCR* (qPCR) handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die eine Quantifizierung gewonnener DNA ermöglicht. Bei dem gewählten TaqMan®-Prinzip wird eine Sonde, die an einem Ende mit einem *Quencher*, am anderen Ende mit einem *Reporter*-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, verwendet. *Quencher* und *Reporter* werden bei der Synthese voneinander getrennt. Die durch die Trennung entstehende Konzentration des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs wird am Ende der Elongation nach jedem Zyklus gemessen. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde eine Kontrolle mit einem nicht

regulierten, konstant exprimierten Referenzgen (*housekeeping gene*), in der vorliegenden Arbeit das Referenzgen U6, für alle Proben aus den einzelnen Untersuchungszeitpunkten durchgeführt.

Reverse Transkription der RNA zur cDNA-Synthese (qPCR)

Für die reverse Transkription der RNA zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) wurde das TaqMan® Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) verwendet und nach Herstelleranweisung gearbeitet. Auf Eis wurde ein Reverse Transkription Master Mix (Tabelle 3) hergestellt.

7 µl des Master Mix wurden mit 5 µl RNA (2 ng/ µl = 10 ng/ Reaktion) der jeweiligen Probe und 3 µl der entsprechenden RT Primer (5x) gevortext und kurz zentrifugiert.

Komponente	Volumen
dNTPmix (100 mM total)	0,15 µl
Multiscribe™ RT enzyme (50 U/µl)	1,0 µl
10X RT Buffer	1,5 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
Nuclease free Water	4,16 µl
RNA (2ng/ µl)	5 µl
RT Primer (5x)	3 µl

Tabelle 3 - Reverser Transkriptions-Master-Mix (qPCR)

Dargestellt sind die Komponenten und das jeweilige Volumen für einen Reaktionsansatz für die quantitative *Real-Time-PCR*. Zur Herstellung der komplementären DNA wurde das TaqMan® Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte unter den in Tabelle 4 aufgelisteten Bedingungen im Thermocycler.

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

Tabelle 4 - Thermocycler Reaktionsprotokoll für die reverse Transkription

Dargestellt sind die Temperaturen und die jeweilige Dauer des einzelnen Zyklus zur Durchführung der reversen Transkription im Thermocycler im Rahmen der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die qPCR ist Tabelle 5 zu entnehmen.

19 µl des Master Mix der qPCR wurden sowohl für den *housekeeper* U6 als auch für die jeweilig zu untersuchende miR hergestellt. Der Master Mix wurde mit jeder Probe jeweils im Doppelansatz in eine 96 Well Platte pipettiert. 1 µl der zu untersuchenden cDNA wurde in jedes Well überführt.

Komponente	Volumen
TaqMan MicroRNA Assay 20x	1 µl
TaqMan 2x Universal PCR MasterMix, No AmpErperase UNG	10 µl
Nukleasefreies Wasser	8 µl
cDNA	1 µl

Tabelle 5 - Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes (qPCR)

Dargestellt sind die Komponenten und das jeweilige Volumen für die Herstellung eines Reaktionsansatzes für die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bei 4 °C zentrifugiert. Die Durchführung der qPCR erfolgte im 7300 RealTimePCR Cycler. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Probe für die zu untersuchende miR und dem *housekeeper* U6 ohne Zusatz von cDNA.

3.2.6 Konventionelle PCR zur Amplifizierung der miR-34a Sequenz

Um eine ausreichende Menge an miR-34a Sequenzen zur Klonierung zu erlangen erfolgte eine Amplifizierung der gewünschten Sequenz mittels konventioneller PCR aus einer der Proben der untersuchten Spinalganglien.

Reverse Transkription der RNA zur cDNA-Synthese (konventionelle PCR)

Zur Herstellung von cDNA wurden 2 µg der zu untersuchenden RNA-Probe mit 1 µl Random Primer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 70 °C im Thermocycler wurden die Proben auf Eis inkubiert. Nach Herstellung eines Reaktionsansatzes wurde dieser zu jeder Probe hinzugefügt und im Thermocycler erneut für 60 min bei 37 °C erhitzt. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 6 zu entnehmen.

Komponente	Volumen/Menge
M-MLV 5xPuffer	5 µl
RNase Inhibitor (25 U)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	1,25 µl
M-MLV-Reverse Transkriptase	1 µl
Random Primer	1 µl
RNA	2 µg

Tabelle 6 - Reaktionsansatz zur Herstellung von komplementärer DNA

Dargestellt sind die Komponenten und das jeweilige Volumen und Menge zur Herstellung der komplementären DNA für die konventionelle PCR.

Amplifizierung der miR-34a (konventionelle PCR)

1 µl der komplementären DNA wurde mit den Komponenten aus Tabelle 8 versetzt. Nach Hinzufügen der entsprechenden *forward* (for) und *reverse* (rev) *Primer* (Tabelle 7) mit je 0,5 µl wurde der Reaktionsansatz mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt.

Primer	Sequenz
miR34a_for	5'-AGTCGTAAGCTTCTACACGTCTTTCTCC CACAGC-3'
miR34a_rev	5'-AGTCGTGAATTCTTACCCCTACATGCAA ACTTTTCT-3'

Tabelle 7 - Primer der miR-34a (konventionelle PCR)

In der Tabelle sind die Sequenzen der *forward* (for) und *reverse* (rev) Primer zur Amplifizierung der miR-34a-Sequenz dargestellt.

Komponente	Volumen
10 x Puffer B	2,5 µl
dNTP	1 µl
TaqPolymerase	0,25 µl
MgCl ₂	2 µl
cDNA	1 µl
miR34a_for Primer	0,5 µl
miR34a_rev Primer	0,5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 8 - Reaktionsansatz zur Amplifizierung der miR-34a

Dargestellt sind die Komponenten und das jeweilige Volumen für die Herstellung eines Reaktionsansatzes für die konventionelle PCR zur Amplifizierung der miR-34a im Rahmen der konventionellen PCR.

Die Durchführung der PCR erfolgte unter aufgelisteten Bedingungen im Thermocycler (Tabelle 9).

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	40 sek
Annealing	60 °C	50 sek
Elongation	72 °C	40 sek
Finale Elongation	72 °C	10 min

Tabelle 9 - Thermocycler-Protokoll (konventionelle PCR)

Dargestellt sind die Reaktionsschritte und -bedingungen der konventionelle PCR im Thermocycler zu Amplifizierung der miR-34a Sequenz.

Gel-Elektrophorese (konventionelle PCR)

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 2 %-igen Agarosegelen. Hierzu wurde 1 x *TRIS-Acetat-EDTA-Puffer* (TAE-Puffer) in 1000 ml MilliQ-Wasser hergestellt (Tabelle 10).

Komponente	Konzentration
Sigma 7-9	40 mM
EDTA Na-Salz	1 mM
Eisessig	20 mM

Tabelle 10 - Komponenten zur Herstellung von 1 x TAE-Puffer

Dargestellt sind die Komponenten und jeweiligen Konzentrationen zur Herstellung eines 1 x TAE-Puffer in MilliQ-Wasser.

Zur Herstellung des 2 %-igen-Agarose-Gels wurden die Komponenten aus Tabelle 11 in 75 ml 1x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle bis zur Erzeugung einer klaren, homogenen Flüssigkeit aufgeköcht.

Komponente	Volumen/Menge
Agarose-Neeo-Ultra-Qualität	1,5 g
Ethidiumbromid	2 µl
1x TAE-Puffer	75 ml

Tabelle 11 - Zusammensetzung eines 2 %-igen Agarose-Gels

In der Tabelle sind die Komponenten und jeweiligen Volumen/Mengen zur Herstellung eines 2 %-igen Agarose-Gels für die konventionelle PCR dargestellt.

Die Gele wurden in horizontale Elektrophoresekammern gegossen. Ein Kamm zur Bildung der Probenkammern wurde nach Erstarren des Gels entfernt. Die Kammern wurden jeweils mit 1x TAE-Puffer bis zur vollständigen Bedeckung des Gels aufgefüllt und die zu untersuchenden Proben mit Orange G-Ladepuffer (Tabelle 12) versetzt und in die Probenkammern überführt. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen PCR-Produkte vom negativen zum positiven Pol. Dabei trennen sich die Produkte ihrer Größe nach auf.

Komponente	Volumen/Menge
Tris HCl	0,946 g
Na-Acetat	0,246 g
Na-EDTA	0,499 g
Glycerol	60 %
Orange G	0,12 %

Tabelle 12 - Zusammensetzung der Orange G-Lösung

Dargestellt sind die Komponenten und jeweiligen Konzentrationen- und Mengenangabe zur Herstellung von 100 ml Orange G-Ladepuffer in 100 ml nukleasefreiem Wasser.

3.2.7 PCR - Produktextraktion aus einem TAE - Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraktions Kits. Es wurde nach Herstelleranweisung gearbeitet. Das Prinzip der DNA Extraktion aus dem Agarosegel besteht darin, dass die Agarose des Gels aufgelöst wird und es in der Gegenwart von hohem Salzgehalt zur selektiven, quantitativen Absorption der Nukleinsäuren in QIAEX II silica-gel Partikel kommt. Die PCR-Produkte wurden daraufhin mit Hilfe einer Lösung mit niedrigen Konzentrationen an Salz herausgelöst. Mittels des Nanodrop 1000 Systems wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

3.2.8 Klonierung mit dem pGEM®-T Easy Vector

Zur Durchführung der Klonierung wurde mit dem pGEM®-T Easy Vektor System gearbeitet. Die linearen Vektoren haben einzelne 3'-Thymidin Überhänge, die einen erneuten Ringschluss des Vektors verhindern. So kann durch den Überhang eine erhöhte Effizienz der Klonierung gewährleistet werden, da dieser als Anknüpfungspunkt für PCR-Produkte mit einem 3'-Desoxyadenosin Überhang dient. In dieser Arbeit wurden *Taq-Polymerasen* verwendet, die solch einen Überhang amplifizieren. Es wurden die Komponenten aus Tabelle 13 verwendet.

Komponente	Standard- reaktion	Positiv- kontrolle	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 (8 ng)	-	2 µl	-
T4 DNA Ligase (3 U)	1 µl	1 µl	1 µl
Nukleasefreies Wasser	Ad 10 µl	Ad 10 µl	Ad 10 µl

Tabelle 13 - Klonierung eines PCR-Produktes in den pGEM-T-Easy Vektor

*Die Menge des einzusetzenden PCR-Produkts ergab sich wie folgt:
 $((\text{Menge des Vektors (in ng)} \times \text{Größe des Inserts (in kb)}) \div (\text{Größe des Vektors (in kb)}) \times (\text{geeignetem molaren Verhältnis zwischen Insert und Vektor (in dieser Studie 3:1)}) = \text{Menge des Insert (in ng)}$. Es wurde ein Verhältnis von 3:1 von Insert und Vektor gewählt um die Wahrscheinlichkeit eines Einschusses eines Inserts in einen Vektor zu erhöhen.

3.2.9 Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden *Escherichia coli* (E. coli) Bakterien des TOPO®TA Cloning®Kits (One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli) verwendet. Das Vorgehen kann aus dem dazugehörigen Handbuch „TOPO®TA Cloning®Kit - Five - minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products“ entnommen werden.

300 ml LB-Medium wurden mit 4,5 g Agar-Agar gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht bis das Pulver vollständig gelöst war. Nach Abkühlen des Gemisches wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugefügt und im nächsten Schritt je 30 ml auf zehn 100 mm-Petrischalen gegeben. Nach Aushärtung des Gels wurden jeweils 40 µl IPTG (126 mM; 30 mg/ml IPTG in 100 % Ethanol) und 40 µl X-Gal (49 mM; 20 mg/ml in Diethylformamid) auf den Platten ausgestrichen. Der pGEM-T Easy Vektor enthält in dem Bereich, in den das Insert kloniert werden soll, ein lac Z-Gen. Das lac Z-Gen kodiert ein Enzym, das über eine enzymatische Reaktion zu einer Blaufärbung der Kolonien führt. Durch Unterbrechung des lac Z-Gens durch das klonierte Insert findet keine enzymatische Reaktion statt und die Kolonien verfärben sich nicht. Nach Durchführung des TOPO®TA Cloning®Kits wurden jeweils 30 µl und 70 µl Bakterien auf vorgewärmte Platten (37 °C) ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurden fünf weiße Kulturen in 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm über Nacht geschüttelt. Die Präparation der Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Herstelleranweisung. Die Bestimmung der DNA erfolgte mittels Nanodrop 1000 Systems.

3.2.10 Restriktionsverdau des pGEM T-Easy Vektors

Für die Transfektion wurden die Vektoren pMIR-REPORT™ System und pcDNA™ 3.1 (+) verwendet. Zur Überführung der Sequenz der miR-34a aus dem pGEM T-Easy Vektor in den pcDNA™ 3.1 (+) Vektor wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den Restriktionsenzymen Hind III und Eco RI. Für die miR-34a und den Vektor

pcDNA™ 3.1 (+/-) ergaben sich ebenfalls die Restriktionsenzyme Hind III und Eco RI. Durch den Restriktionsverdau des Vektors und des Inserts mit denselben Enzymen entstehen „sticky ends“, die die Ligation im darauffolgenden Schritt erleichtern. Welche Enzyme für den Restriktionsverdau genutzt werden, wird von der Multiple cloning site (MCS) der Vektoren abhängig gemacht, die verschiedene Erkennungssequenzen für die jeweiligen Enzyme enthalten. Für den Restriktionsverdau wurden 3 µl der DNA mit 0,5 µl des jeweiligen Enzyms (10 U/µl) sowie 3 µl des entsprechenden Puffers (10 x) gemischt und der Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 30 µl gebracht. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und auf ein 1 % Agarosegel (120 ml TAE, 1,5 g Agarose) aufgetragen. Die Inserts wurden wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben extrahiert.

3.2.11 Klonierung der DNA-Fragmente in den pcDNA™ 3.1 Vektor und das pMIR-REPORT™ System

Für die Transfektion wurde für die miR-34a der pcDNA™ 3.1 (+/-) Vektor (Invitrogen, Abbildung 2) und für die SCN2B-Sequenz das pMIR-REPORT™ System (Applied Biosystems) verwendet. Das pMIR-REPORT™ System enthält einen *Firefly-Luciferase-Reporter-Vector* und ein *β-Gal-Reporter-Kontroll-Plasmid* (Abbildung 3). Mit dem System kann eine quantitative Messung einer Interaktion einer miRNA mit einer möglichen *Targetsequenz* durchgeführt werden. Die zu untersuchende *Targetsequenz* von SCN2B kann in die *Multiple Cloning Site* (MCS) kloniert werden. Das *β-Gal-Reporter-Kontroll-Plasmid* dient der Normierung der Ergebnisse. Der Vektor des pMIR-REPORT™ Systems wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen wie das Insert geschnitten. Dieser Schritt ist Kapitel 3.2.10 zu entnehmen. Für das pMIR-REPORT™ System und die Sequenz der 3'-UTR der *Target-mRNA* SCN2B wurden die Restriktionsenzyme Spe I und Hind III verwendet. Die Ligation erfolgte mit einer T4 DNA Ligase von Invitrogen (0,1 U). Es wurde ein Verhältnis von 3:1 von Insert und Vektor gewählt, um die Wahrscheinlichkeit eines Einschusses eines Inserts in einen Vektor zu erhöhen. Der Ligationsansatz umfasste 30 fmol Vektor, 90 fmol Insert, 4 µl T4 DNA Ligase (0,1 U) aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 20 µl. Bei Raumtemperatur wurde das Gemisch inkubiert und die Ligase mit 1 µl 0,5 M EDTA inaktiviert.

Daraufhin erfolgte die Transformation von *E. coli* mittels Topo TA Cloningkit TOP 10F'. Dieser Schritt wurde wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben durchgeführt.

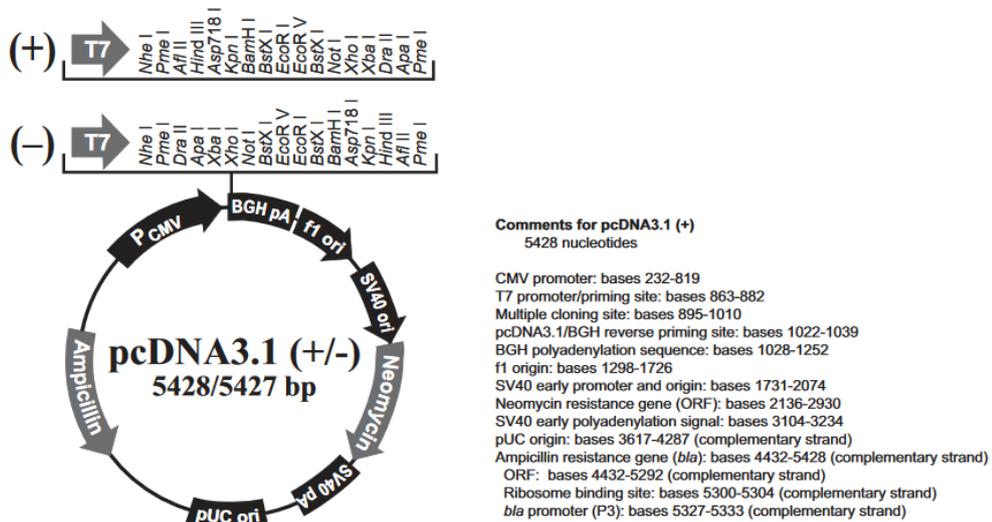


Abb. 2 - Abbildung des pcDNA™ 3.1(+/-)(Invitrogen)-Vektors
Catalog nos. V790-20 and V795-20 Version K 10 November 2010, 28-0104

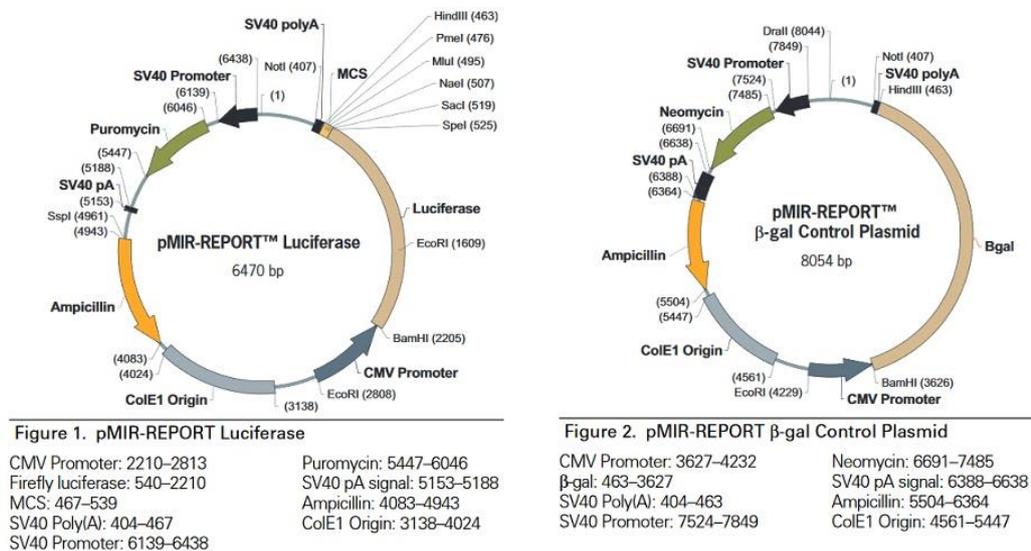


Abb. 3 - Abbildung des pMIR-REPORT™ Systems
MIR-REPORT™ System: miRNA Expression Reporter Vector Manual 5795M Revision D
Revision Date: October 24, 2008

3.2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

(Genomics & Transcriptomics Laboratory (GTL; Leiter: Prof. K. Köhrer)). 500-600 ng der zu sequenzierenden DNA wurden in einer Konzentration von 100-250 ng/µl verwendet. Mittels der Programme *Chromas* und *Clustal W2 – Multiple Alignment* wurden die Sequenzen ausgewertet. Über eine Sequenzierung kann die Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnitts aufgedeckt werden. Die Sequenzierung dient der Kontrolle, ob das Insert, das in die Vektoren eingebaut wurde, der gewünschten Nukleotidabfolge der zu untersuchenden Sequenz entspricht.

3.2.13 Transfektion von Human Embryonic Kidney 293 Zellen mithilfe der Kalziumphosphatmethode

Für die Transfektion wurden *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293 Zellen verwendet und wie folgt gearbeitet:

Zum Splitten der Zellen wurde vorhandenes DMEM Medium (Pan™ Biotech GmbH) mittels Glaspipette und Pumpe entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen und mit 37 °C warmer 2 ml (75 cm² Flasche) oder 3 ml (175 cm² Flasche) Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch leichtes Beklopfen der Flaschenseitenwand wurden die Zellen gelöst, 8 ml (75 cm² Flasche) oder 10 ml (175 cm² Flasche) DMEM Medium hinzugefügt und die Zellen resuspendiert. 1-2 ml des Mediums wurden in der Flasche belassen und auf 15 ml (75 cm² Flasche) oder 25 ml (175 cm² Flasche) mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden in einem Inkubator mit 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

Aussäen von HEK 293 Zellen

24 Stunden vor Durchführung der Transfektion wurden die Zellen auf 60 mm Petrischalen ausgesät. Für das Aussäen wurde das Medium aus der Zellkulturflasche mittels Glaspipette entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Jeweils 2 ml (75 cm² Flasche) oder 3 ml (175 cm² Flasche) 37 °C warmes Trypsin-EDTA wurden hinzugefügt und die Flaschen bei 37 °C für wenige Minuten inkubiert. Nach Lösen der Zellen durch leichtes Beklopfen der Flaschenseitenwand wurden 13 ml (75 cm² Flasche) oder 17 ml (175 cm² Flasche) frisches Medium zu den Zellen hinzugefügt und

resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden entnommen und mit 20 µl Trypan Blue zur Zellzahlbestimmung versetzt. Pro 60 mm Petrischale wurden 1 Millionen Zellen auf 4 ml DMEM Medium ausgesät. Die Zellen wurden erneut in einem Inkubator mit 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

Durchführung der Transfektion

Zwei Stunden vor Durchführung der Transfektion wurde das Medium der 60 mm Petrischalen gewechselt und pro Platte 3,5 ml des Mediums hinzugefügt.

Zur Herstellung von 10 x *Hepes Buffered Saline Solution* (HBSS) Lösung für die Transfektion wurden die folgenden Komponenten (Tabelle 14) in MQ-Wasser gelöst.

Komponente	Konzentration
NaCl	1,38 M
KCl	50 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	7,5 mM
Glucose	55,55 mM
HEPES	210 mM

Tabelle 14 - Zusammensetzung einer 10 x HBSS Lösung (Transfektion)

Dargestellt sind die Komponenten und die jeweiligen Konzentrationen zur Herstellung einer 10 x *Hepes Buffered Saline Solution* in MQ-Wasser.

Zur Herstellung von 2 x HBSS wurden 5 ml 10 x HBSS mit 15 ml MQ Wasser verdünnt (pH-Wert: 7,08 ± 0,05) und auf ein Volumen von 25 ml mit MQ Wasser aufgefüllt und steril filtriert. Für den Vorgang der Transfektion wurden 1100 µl 2 x HBSS in ein Reaktionsgefäß überführt. In ein weiteres Reaktionsgefäß wurde die DNA mit MQ Wasser auf ein Volumen von 990 µl aufgefüllt und mit 110 µl 2.5 M Kalziumchlorid vorsichtig vermischt.

Pro Vektor wurden folgende Mengen verwendet:

1 µg pMIR REPORT Luziferase Vektor + Zielsequenz SCN2B

1 µg pMIR-REPORT β-Galaktosidase Vektor

4 µg pcDNA 3.1 + miR-34a

4 µg pcDNA 3.1 ohne miR-34a

Unter ständiger Luftzufuhr in Form von Blasenbildung mit Hilfe von Pasteurpipetten wurde die DNA-Lösung in die HBSS-Lösung pipettiert. In 60 mm Petrischalen wurde 500 µl der DNA-HBSS Lösung überführt und anschließend über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach 12 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Ernten der Zellen

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 2 ml kalten PBS gewaschen. Ein weiterer Milliliter PBS wurde hinzugefügt und die Zellen mit einem Schaber geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das entstandene Zellpellet wurde in 50 µl 1 x *Reporter Lysis Buffer* gelöst und gevortext. Nach 5 min Inkubationszeit auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 12.000 g über 15 min. Der entstandene Überstand wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und bei – 80 °C gelagert.

3.2.14 Luziferase-Assay

Nach Überführen der *Targetsequenz* in die MCS des pMIR REPORT™ Expressionsvektors erfolgte eine quantitative Evaluation der miR-34a Funktion. Der pMIR REPORT Vektor enthält ein Luziferase Reporter Gen welches durch den CMV Promoter kontrolliert wird. Durch die Klonierung der 3'-UTR der Ziel-mRNA von miR-34a in diese Region unterliegt der Reporter der Kontrolle der miR. Durch Bindung der miR-34a an die klonierte Sequenz der 3'-UTR wird die Translation gehemmt. Die fehlende Translation des Luziferase Reporter Gens hat eine verminderte Aktivität der Luziferase im Vergleich zur Kontrolle (Probe ohne miR-Sequenz) zur Folge.

Für die Durchführung des Luziferase-Assays wurden jeweils 5 µl Zellextrakt in eine weiße 96 Well Platte pipettiert. Es wurden jeweils 100 µl *Working Luziferase Assay Reagent (WLAR)* sowie 5 µl *Reporter Lysis Buffer* hinzugefügt und für den Leerwert 10 µl *Reporter Lysis Buffer* und 100 µl WLAR verwendet. Die Messung erfolgte mittels Luminometer. Die Herstellung der WLAR-Lösung ist der Tabelle 15 zu entnehmen.

Komponente	Konzentration
Tricine, pH-Wert 8	20 mM
(MgCO ₃)4Mg(OH) ₂ 5H ₂ O	1,07 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,67 mM
EDTA, Na-Salt	0,10 mM
Coenzym A, Na-Salz	270 µM
ATP, Na - Salz	530 µM
DTT	33 mM
Luciferin-Lösung (Acros)	47,7 mM

Tabelle 15 - Zusammensetzung des *Working Luciferase Assay Reagents*
Dargestellt sind die Komponenten und dazugehörigen Konzentrationen zur Herstellung eines *Working Luciferase Assay Reagent*

3.2.15 β -Galaktosidase Assay

Zur Normalisierung der Ergebnisse des Luciferase-Assays wurde der β -Galaktosidase Assay (Tabelle 16) durchgeführt um Abweichungen der Überlebensfähigkeiten der Zellen und Effizienz der Transfektion auszugleichen. Der Reaktionsansatz wurde jeweils in einer 96 Well Platte pipettiert und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Als Leerwert wurde 1x Reporter Lysis Buffer verwendet.

Es erfolgte eine colorimetrische Messung bei einer Wellenlänge von 420 nm. Bei der Messung der optischen Dichte wurden Werten zwischen 0,2 und 0,8 erzielt. Zur Erreichung eines Wertes in diesem Bereich wurden die Zellextrakte 75 x verdünnt. Anhand der Geschwindigkeit des Farbumschlags wurde eine geeignete Verdünnung abgeschätzt. Bei einem Farbumschlag in weniger als 10 min erfolgte eine erneute 150-fache Verdünnung der Zellextrakte.

Komponente	Volumen
100x Mg Lösung (0,1 M MgCl ₂ + 4,5 M β-Mercaptoethanol)	3 µl
1 x O-Nitrophenyl-β- Galactopyranosid (4 mg/ml)	66 µl
0,1 M Natriumphosphat (pH-Wert: 7,5)	201 µl
Verdünnter Zellextrakt (1:75) bzw. Reporter Lysis Buffer (Blank)	30 µl

Tabelle 16 - Reaktionsansatz zur Messung der β-Galaktosidase Aktivität

Dargestellt sind die Komponenten und jeweiligen Volumenangaben zur Herstellung eines Reaktionsansatzes zur Messung der β Galaktosidase Aktivität.

Die Berechnung der Aktivität der β-Galaktosidase erfolgte anhand der nachfolgend dargestellten Formel:

$$1 \text{ Unit } (\beta\text{-Galaktosidase}) = 380 \times A_{420} / \text{Zeit (min)}$$

- 1 Unit β-Galaktosidase: Enzymmenge, die 1 µmol ONPG pro Minute bei 37 °C umsetzt
- 380: Konstante, nach der 1 Unit äquivalent zu einem Umsatz von 1 nmol ONPG pro Minute bei 37 °C ist
- A₄₂₀: Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm

Die Normalisierung der Ergebnisse des Luziferase Assays erfolgte durch Division der im Assay gemessenen Luminiszenz durch die Aktivität (Units) der β-Galaktosidase.

Die Berechnung des *fold change* erfolgte aus dem Mittelwert von jeweils vier Proben. Die Signifikanztestung erfolgte mittels ungepaarten Student's t-Test, *p < 0,05.

3.2.16 Enzyme-linked Immunosorbent Assay für SCN2B

Mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) können Proteine in einer Probe über ein antikörperbasiertes Verfahren nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die *quantitative sandwich enzyme immunoassay* Technik verwendet.

Vorbereitung der DRGs für die Verwendung eines SCN2B Elisa

Für die Aufarbeitung der DRGs für die Verwendung eines ELISAs wurden drei DRGs aus flüssigem Stickstoff entnommen und mit 60 – 80 ml *Radio Immuno Precipitation* (RIPA) Puffer in einem Reaktionsgefäß mit einem Homogenisierstab (IKA) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 5 min in ein Ultraschallbad gegeben. Nach 10-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurde das Homogenat für zehn weitere Minuten bei 4 °C bei 8.000 g zentrifugiert und der Überstand entnommen. Die anschließende Proteinmessung nach Pierce erfolgte zur Ermittlung des Proteingehalts zur Durchführung des ELISA.

Pro ELISA-Well wurden 200 µg Protein pipettiert, welche zuvor mit RIPA Puffer auf 100 µl aufgefüllt wurden.

Die Zusammensetzung des RIPA Puffer ist der nachfolgenden Tabelle 17 zu entnehmen:

Komponente	Konzentration
Tris (Sigma 7-9 MG: 121,14)	50 mM
NaCl	150 mM
NP 40	1 %
Na-Deoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %

Tabelle 17 - Zusammensetzung des RIPA Puffer

Dargestellt sind die Komponenten und jeweiligen Konzentrationsangaben zur Herstellung eines *Radio Immuno Precipitation* (RIPA) Puffers.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 40 µl Complete (Firma Roche) pro Milliliter hinzugesetzt.

Durchführung des ELISA-Kit SCN2B

Zur Durchführung des ELISA wurde das ELISA-Kit SCN2B der Firma Cusabio verwendet und nach Herstelleranweisung gearbeitet. 100 µl der Standardlösung und 100 µl der zuvor aufgearbeiteten DRG-Proben wurden jeweils in ein Well überführt. Diese wurden mittels Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Aspiration der Flüssigkeit aus jedem Well wurden 100 µl Biotin-antibody (1x) hinzugefügt. Die Platte wurde mittels neuer Klebefolie abgedeckt und erneut für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Aspiration der Flüssigkeit aus dem jeweiligen Well erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit jeweils 200 µl Wash Buffer. Nach jeweils zwei Minuten nach Hinzufügen des Wash Buffers wurde die verbliebene Flüssigkeit komplett verworfen. Im weiteren Schritt wurden 100 µl der horseradish peroxidase (HRP)-avidin (1x) Lösung in jedes Well pipettiert, erneut mit Klebefolie verschlossen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschvorgang mit jeweils 200 µl Wash Buffer wurden 90 µl Tetramethylbenzidin in jedes Well pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation von 15-30 min bei 37 °C erfolgte das Hinzufügen von 50 µl Stopplösung in die jeweiligen Reaktionsansätze. Innerhalb von 5 min nach Zugabe der Stopplösung wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.2.17 Statistik

Die Untersuchung der differentiellen Expression der miRs in den Spinalganglien nach Induktion der CCI zu den untersuchten Zeitpunkten erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR. Eine relative Quantifizierung wird durch eine proportionale Zunahme der PCR-Produkte zur gemessenen Fluoreszenz ermöglicht. Diese verdoppelt sich in der exponentiellen Phase der qPCR bei Verdopplung der Zielsequenz. Zur Berechnung der relativen Quantifizierung wird der Anfang der exponentiellen Phase verwendet. Der Ct-Wert beschreibt die Anzahl an PCR-Zyklen nach denen die Fluoreszenz der Zielsequenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt [116]. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde eine Kontrolle mit einem nicht regulierten, konstant exprimierten Kontrollgen U6 gemessen. So konnten Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten Proben ausgeglichen

werden. Für die Berechnung wurde in jedem PCR-Zyklus einer Verdopplung der DNA-Menge vorausgesetzt (Effizienz = 2) [116]. Diese Effizienz liegt in der Realität allerdings bei etwa 1,7 – 1,9 [117]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die delta-delta-Ct Methode angewandt, die eine Effizienzkorrektur enthält. Die Korrektur der Effizienz und anschließend statistische Überprüfung mit Berechnung der relativen Expressionsunterschiede und des Signifikanzniveaus (p-Wert) erfolgte mit dem Programm REST 2009 (<http://www.gene-quantification.de/rest.html>). Dargestellt wurden jeweils die Mittelwerte der miR-34a - Expression \pm Standardabweichung. Der Mittelwert für die scheinoperierte Gruppe wurde zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten als 1 gesetzt (n = 6). Statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$.

Darstellung der delta-delta Ct-Methode [116]:

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Behandlung}) - \Delta Ct (\text{Kontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die statistische Auswertung der Ergebnisse des Luziferase-Assays und des ELISAs erfolgte mittels ungepaarten Student's t-Test. Die Berechnung und Erstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad version 6. Dargestellt wurde der jeweilige Mittelwert mit der jeweiligen Standardabweichung. Der Mittelwert der *Sham*-Gruppe wurde jeweils als 1 bzw. 100 % gesetzt. Statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$.

Die Berechnung des *fold change* der Ergebnisse im Luziferase-Assays erfolgte aus dem Mittelwert von jeweils vier Proben. Im ELISA erfolgte die Berechnung aus jeweils acht Proben.

4 Ergebnisse

4.1 Relative Expression der miR-34a (qPCR)

12 Tage nach Induktion der CCI war die miR-34a im Vergleich zu *Sham* um den Faktor 0,4 signifikant herunterreguliert (* $p = 0,001$ vs *Sham*).

Zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag und 6 Tage nach Induktion von CCI wurde kein relevanter Expressionsunterschied der miR-34a im Vergleich zu *Sham* beobachtet (4 h: 0,8 *fold change*; 1 d: 1,2 *fold change*; 6 d: 0,7 *fold change*; jeweils $p > 0,05$). Das Ergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt.

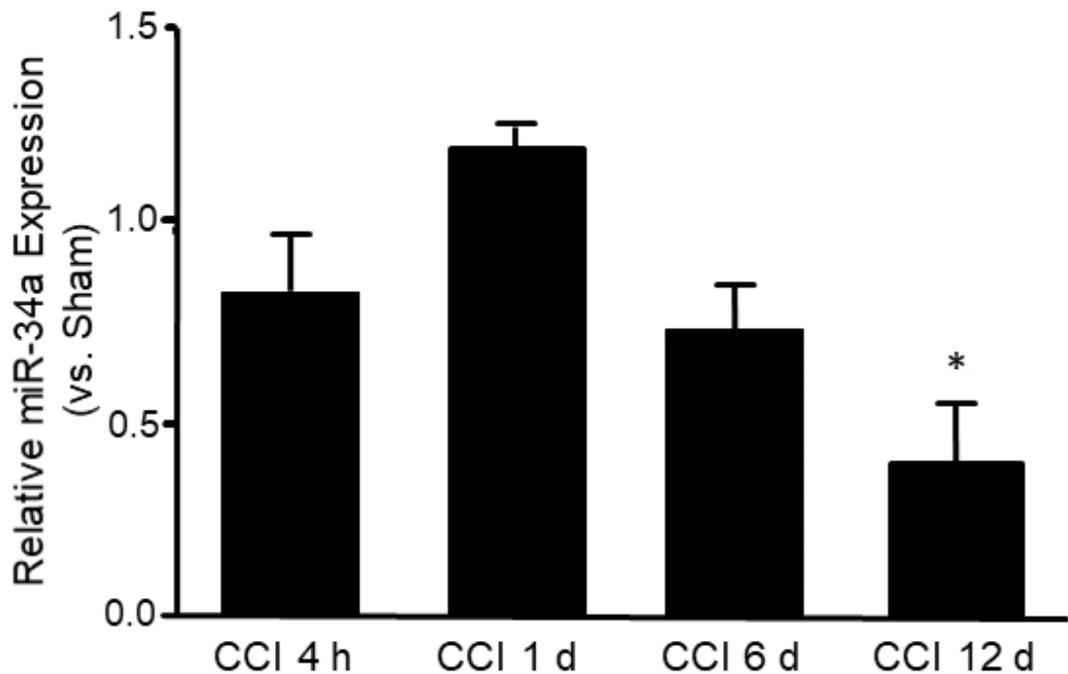


Abb. 4 - Relative Expression der miR-34a nach Induktion einer CCI

Relative Expression der miR-34a zu den Zeitpunkten vier Stunden (CCI 4 h), einen Tag (CCI 1 d), sechs Tage (CCI 6 d) und zwölf Tage (CCI 12 d) nach Induktion einer CCI. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta-CT*-Methode.

Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-34a-Expression \pm Standardabweichung dar. Der Mittelwert für die scheinoperierte Gruppe wurde zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten als 1 gesetzt. $n = 6$, * $p = 0,001$ vs. *Sham*.

4.2 Relative Expression der miR-9, -26b und -103 (qPCR)

Nach Induktion einer CCI findet sich zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage keine differentielle Expression der miR-9 im Spinalganglion der Ratte im Vergleich zu *Sham* (4 h: *fold change* 1,05; 1 d: *fold change* 1,14; 6 d: *fold change* 1,32; 12 d: *fold change* 1,22; jeweils $p > 0,05$ vs *Sham*). Die relative Expression zu den einzelnen Zeitpunkten ist in Abbildung 5 dargestellt.

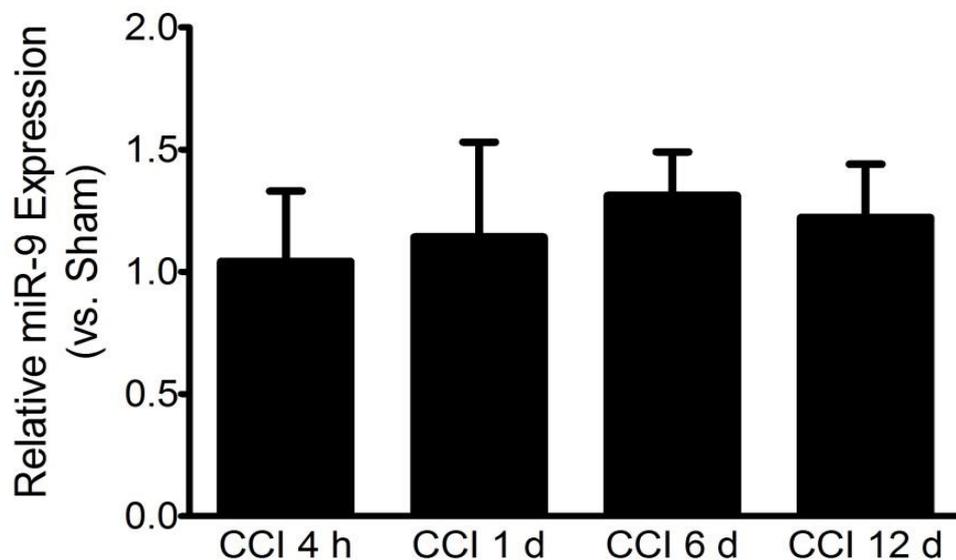


Abb. 5 - Relative Expression der miR-9 nach Induktion einer CCI

Dargestellt ist die relative Expression der miR-9 zu den Zeitpunkten vier Stunden (CCI 4 h), einen Tag (CCI 1 d), sechs Tage (CCI 6 d) und zwölf Tage (CCI 12 d) nach Induktion einer CCI. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mittels der *Delta-Delta-Ct*-Methode. Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-9-Expression \pm Standardabweichung dar. Der Mittelwert der scheinoperierten Gruppe wurde zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten als 1 gesetzt. Die Induktion neuropathischer Schmerzen führt zu keiner signifikanten differentiellen Veränderung der Expression der miR-9 zu den untersuchten Zeitpunkten verglichen mit *Sham*. $n = 6$, t-Test, $p > 0,05$ vs *Sham*.

Die Induktion einer CCI führt im Spinalganglion der Ratte zu den untersuchten Zeitpunkten zu keiner differentiellen Expression der miR-26b im Vergleich zu *Sham* (4 h: *fold change* 0,94; 1 d: *fold change* 0,68; 6 d: *fold change* 1,06; 12 d: *fold change* 1,11; jeweils $p > 0,05$ vs *Sham*). Die relative Expression zu den einzelnen Zeitpunkten ist in Abbildung 6 dargestellt.

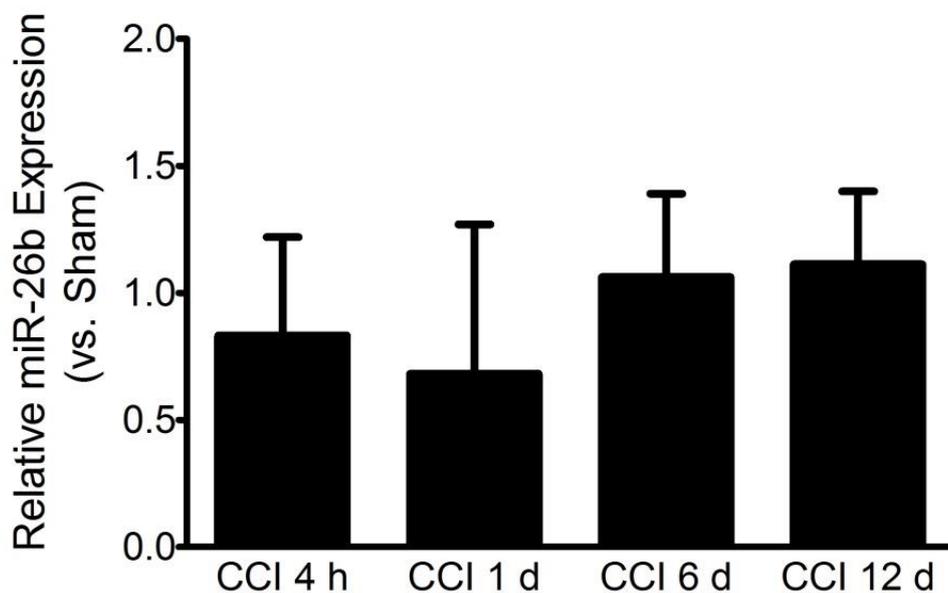


Abb. 6 - Relative Expression der miR-26b nach Induktion einer CCI

Relative Expression der miR-26b nach Induktion einer CCI im Vergleich zu *Sham* zu den Untersuchungszeitpunkten vier Stunden (CCI 4 h), einen Tag (CCI 1 d), sechs Tage (CCI 6 d) und zwölf Tage (CCI 12 d) nach Induktion einer CCI. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mit der *Delta-Delta*-CT-Methode. Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-9-Expression \pm Standardabweichung für die Gruppen *Sham* und CCI dar. Der Mittelwert der scheinoperierten Gruppe wurde als 1 gesetzt. Nach der Induktion neuropathischer Schmerzen findet sich keine signifikante differentielle Expression der miR-26b zu den untersuchten Zeitpunkten verglichen mit *Sham*. $n = 6$, t-Test, $p > 0,05$ vs *Sham*.

Nach Induktion einer CCI findet sich zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 1 Tag, 6 Tage und 12 Tage keine differentielle Expression der miR-103 im Spinalganglion der Ratte im Vergleich zu *Sham* (4 h: *fold change* 0,84; 1 d: *fold change* 0,38; 6 d: *fold change* 1,28; 12 d: *fold change* 1,17; jeweils $p > 0,05$ vs *Sham*). Die relative Expression zu den einzelnen Zeitpunkten ist in Abbildung 7 dargestellt.

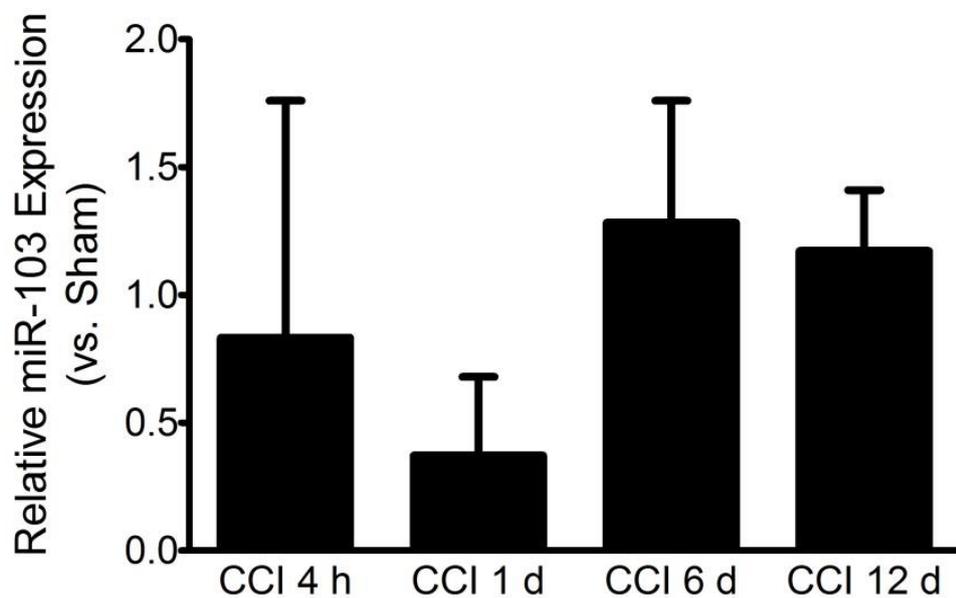


Abb. 7 - Relative Expression der miR-103 nach Induktion einer CCI

Relative Expression der miR-103 in der CCI-Gruppe im Vergleich zu *Sham* zu den Zeitpunkten vier Stunden (CCI 4 h), einen Tag (CCI 1 d), sechs Tage (CCI 6 d) und zwölf Tage (CCI 12 d) nach Induktion einer CCI. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mithilfe der *Delta-Delta*-CT-Methode. Das Säulendiagramm stellt jeweils die Mittelwerte der miR-9-Expression \pm Standardabweichung für die Gruppen *Sham* und CCI dar. Der Mittelwert der *Sham*-Gruppe wurde zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten als 1 gesetzt. Die Induktion neuropathischer Schmerzen führt zu keiner signifikanten Veränderung in der Expression der miR-103 zu den untersuchten Zeitpunkten verglichen mit *Sham* $n = 6$, t-Test, $p > 0,05$ vs *Sham*.

4.3 *In-silico* Analyse mittels Targetscan

Die *in-silico* Analyse erfolgte mittels *targetscan.org*. Die Analyse ergab als potentielle Ziel-mRNA der miR-34a die mRNA für eine Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals (SCN2B).

4.4 Plasmidsequenzierung der miR-34a und der SCN2B-mRNA

Die Sequenzierung der in die Plasmide überführten Sequenzen der miR-34a und der 3'-UTR der mRNA von SCN2B wurde im BMFZ durchgeführt. Die Originalsequenz der miR-34a sowie der *Target*-mRNA wurde den in die Plasmide eingebauten Sequenzen gegenübergestellt. Die Sequenzierung erfolgte zur Prüfung der einklonierten Nukleotidsequenz, um sicherzustellen, dass die Basenabfolge der Sequenzen den Originalsequenzen entsprechen.

```

Vmir34a -----CTACACGTCCTTCTCCACAGCCTCTCCATCCTCT 35
miR_3  CTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCTACACGTCCTTCTCCACAGCCTCTCCATCCTCT 415
miR_1  CTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCTACACGTCCTTCTCCACAGCCTCTCCATCCTCT 475
miR_2  CTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCTACACGTCCTTCTCCACAGCCTCTCCATCCTCT 477
      *****

Vmir34a  TGCAGCTGCAGGCACCTCAGCCTGGGCCGGCCGGCTGTGAGTAATTCTTTGGCAGTGTCT 95
miR_3   TGCAGCTGCAGGCACCTCAGCCTGGGCCGGCCGGCTGTGAGTAATTCTTTGGCAGTGTCT 475
miR_1   TGCAGCTGCAGGCACCTCAGCCTGGGCCGGCCGGCTGTGAGTAATTCTTTGGCAGTGTCT 535
miR_2   TGCAGCTGCAGGCACCTCAGCCTGGGCCGGCCGGCTGTGAGTAATTCTTTGGCAGTGTCT 537
      *****

Vmir34a  TAGCTGGTTGTTGTGAGTATTAGCTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGT 155
miR_3   TAGCTGGTTGTTGTGAGTATTAGCTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGT 535
miR_1   TAGCTGGTTGTTGTGAGTATTAGCTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGT 595
miR_2   TAGCTGGTTGTTGTGAGTATTAGCTAAGGAAGCAATCAGCAAGTATACTGCCCTAGAAGT 597
      *****

Vmir34a  GCTGCACGTTGTTAGGCCAAGAAGGAAAAGTCAGCGATGCCCAGACCTCCGAGAGGCGCC 215
miR_3   GCTGCACGTTGTTAGGCCAAGAAGGAAAAGTCAGCGATGCCCAGACCTCCGAGAGGCGCC 595
miR_1   GCTGCACGTTGTTAGGCCAAGAAGGAAAAGTCAGCGATGCCCAGACCTCCGAGAGGCGCC 655
miR_2   GCTGCACGTTGTTAGGCCAAGAAGGAAAAGTCAGCGATGCCCAGACCTCCGAGAGGCGCC 657
      *****

Vmir34a  AGGACTTCGGGAGCTGCTCTACCATGCTGGTGAGTAAGGGTTGCTGGGAGAGGCTGGCTT 275
miR_3   AGGACTTCGGGAGCTGCTCTACCATGCTGGTGAGTAAGGGTTGCTGGGAGAGGCTGGCTT 655
miR_1   AGGACTTCGGGAGCTGCTCTACCATGCTGGTGAGTAAGGGTTGCTGGGAGAGGCTGGCTT 715
miR_2   AGGACTTCGGGAGCTGCTCTACCATGCTGGTGAGTAAGGGTTGCTGGGAGAGGCTGGCTT 717
      *****

Vmir34a  TAGCACCCCAGGGGGAGCATGTTTAGGGGTTCTGAGTGT CAGGGGCAGGCACAGGGACTG 335
miR_3   TAGCACCCCAGGGGGAGCATGTTTAGGGGTTCTGAGTGT CAGGGGCAGGCACAGGGACTG 715
miR_1   TAGCACCCCAGGGGGAGCATGTTTAGGGGTTCTGAGTGT CAGGGGCAGGCACAGGGACTG 775
miR_2   TAGCACCCCAGGGGGAGCATGTTTAGGGGTTCTGAGTGT CAGGGGCAGGCACAGGGACTG 777
      *****

Vmir34a  GGATGTGAGCCACTTCTGGCTGAGAAAAGTTTGCATGTAGGGGTAA----- 381
miR_3   GGATGTGAGCCACTTCTGGCTGAGAAAAGTTTGCATGTAGGGGTAAAGAATTCTGCAGATA 775
miR_1   GGATGTGAGCCACTTCTGGCTGAGAAAAGTTTGCATGTAGGGGTAAAGAATTCTGCAGATA 835
miR_2   GGATGTGAGCCACTTCTGGCTGAGAAAAGTTTGCATGTAGGGGTAAAGAATTCTGCAGATA 837
      *****

```

Abb. 8 - Ergebnis der Sequenzierung der miR-34a

Dargestellt ist der Abschnitt des Vektors, der die Sequenz der miR-34a enthält (Bezeichnung: Vmir34a). Dieser wird der Sequenz der miR-34a gegenübergestellt. Grün markiert ist die Nukleotidsequenz der miR-34a. Die Sequenzierung erfolgte zur Prüfung der einklonierten Nukleotidsequenz, um sicherzustellen, dass die Basenabfolge der Abfolge der miR-34a entspricht. miR_1 - miR_3 stellen die jeweiligen Proben mit der in die Plasmide eingebauten Sequenz der miR-34a dar. Die mit * gekennzeichneten Basen markieren übereinstimmende Basenpaare dar. An Stelle 285 des Abschnitts der Vmir34a findet sich ein Austausch der Base Adenosin zu Guanosin in allen Proben (rot markiert). Die Nukleotidsequenz der miR-34a stimmt in allen Proben überein.

```

SCN2B      -----CTAGTTGGGAAAACAACCTTTCAGTCCAAACATTGTAGTTGGCTC 44
SCN2B_4    TGATGAAAGCTGCGCACTAGTTGGGAAAACAACCTTTCAGTCCAAACATTGTAGTTGGCTC 490
SCN2B_6    TGATGAAAGCTGCGCACTAGTTGGGAAAACAACCTTTCAGTCCAAACATTGTAGTTGGCTC 720
SCN2B_5    TGATGAAAGCTGCGCACTAGTTGGGAAAACAACCTTTCAGTCCAAACATTGTAGTTGGCTC 676
            *****

SCN2B      AGAACCTAACTGCCAGACATTGTAGAAGTCCAGAGAACACACTGCCAA----- 93
SCN2B_4    AGAACCTAACTGCCAGACATTGTAGAAGTCCAGAGAACACACTGCCAAAGCTTAATAAA 550
SCN2B_6    AGAACCTAACTGCCAGACATTGTAGAAGTCCAGAGAACACACTGCCAAAGCTTAATAAA 780
SCN2B_5    AGAACCTAACTGCCAGACATTGTAGAAGTCCAGGAACACACTGCCAAAGCTTAATAAA 736
            *****

SCN2B      -----
SCN2B_4    GGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 599
SCN2B_6    GGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 828
SCN2B_5    GGATCTTTTATTTTCATTGGATCTGTGTGTGGTTNNNNNNNNNNNNNNNNNN- 784

```

Abb. 9 - Ergebnis der Sequenzierung von SCN2B

Dargestellt ist die Basenabfolge der einklonierten Nukleotidsequenz, die der Basenabfolge der 3'-UTR der mRNA für SCN2B (grün markiert) gegenübergestellt wurde. Die Sequenzierung erfolgte zur Prüfung der einklonierten Nukleotidsequenz, um sicherzustellen, dass die Basenabfolge der Abfolge der 3'-UTR der mRNA für SCN2B entspricht. Die Proben SCN2B_4 - SCN2B_6 stellen die jeweiligen Proben mit der in die Plasmide eingebauten Sequenz der mRNA von SCN2B dar. Die mit * gekennzeichneten Basen stellen übereinstimmende Basenpaare der einklonierten mRNA-Sequenz dar. An Stelle 68 der Originalsequenz der mRNA für SCN2B findet sich eine Punktmutation der Base Adenosin zu Guanosin in Probe SCN2B_5 (rot markiert). Diese Probe wurde verworfen und für die weiterführenden Untersuchungen nicht verwendet.

4.5 Luziferase Assay

Die miR-34a bindet an die 3'-UTR der mRNA für SCN2B. Im Luziferase Assay ergab sich ein signifikanter Unterschied der relativen Luziferaseaktivitäten beim Vergleich der Gruppen, die den miR-34a tragenden Vektor enthält (schwarzer Balken) und der Gruppe, die die miR-34a-Sequenz nicht enthält (weiße Säule). Beide Gruppen enthalten einen Vektor, der die Sequenz der mRNA des Proteins SCN2B trägt. Die miR-34a bindet die 3'-UTR der mRNA von SCN2B. Durch Inhibition der Translation stellt sich ein signifikanter Abfall der Luziferase-Aktivität (0,44 *fold change*, *** $p = 0,0001$) dar. In Abbildung 10 ist die relative Luziferaseaktivität der jeweiligen Gruppen dargestellt. Die mittlere Luziferase-Aktivität der Kontrollgruppe, die die Sequenz der miR-34a nicht enthält, wurde als 100 % gesetzt.

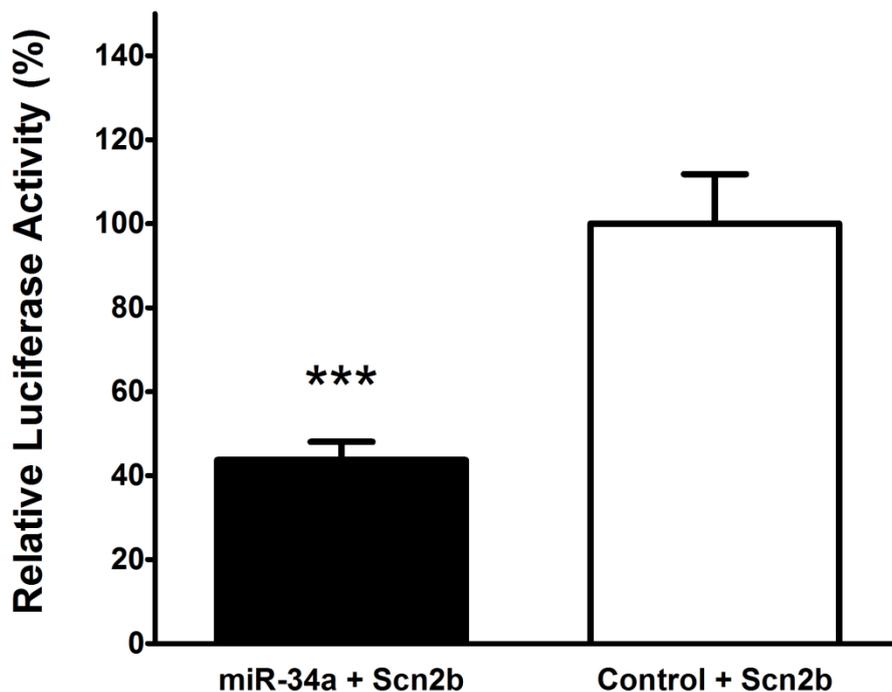


Abb. 10 - Nachweis eines inhibierenden Effekts der miR-34a im Luziferase-Assay

Relative Luziferaseaktivität der einzelnen Untersuchungsgruppen nach Normalisierung der Luziferaseaktivität durch die Aktivität der β -Galaktosidase. Die Gruppe, die den miR-34a tragenden Vektor enthält (schwarze Säule) und die Gruppe, die einen Vektor ohne miR-34a Sequenz beinhaltet (weiße Säule) ist mit dem Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde als 100 % gesetzt. $n = 4$ pro Gruppe, *** $p = 0,0001$ vs Kontrollgruppe.

4.6 ELISA des Proteins SCN2B nach Induktion einer CCI

Im ELISA stellt sich zum Zeitpunkt 12 Tage nach Induktion von CCI keine signifikant veränderte Expression des Proteins SCN2B im DRG der Ratte im Vergleich zu *Sham* dar. In Abbildung 9 ist das relative SCN2B Proteinlevel der Kontrollgruppe und CCI-Gruppe dargestellt. Der Mittelwert für die *Sham*-Gruppe wurde als 1 gesetzt.

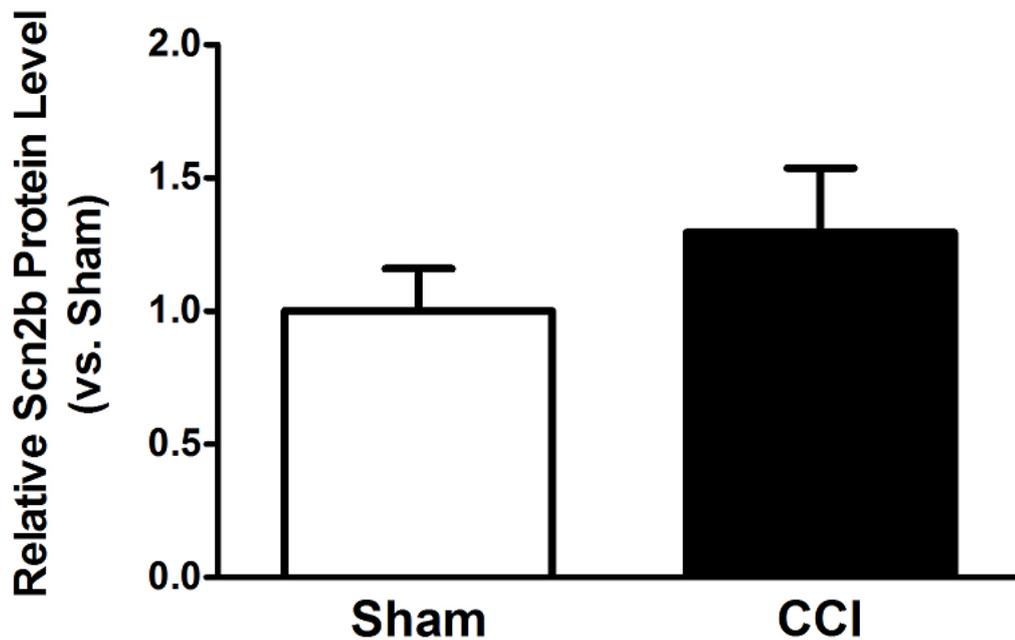


Abb. 11 - Relative Expression von SCN2B 12 Tage nach Induktion einer CCI
Sandwich-ELISA für SCN2B im DRG der Ratte 12 Tage nach Induktion einer CCI. Das Säulendiagramm stellt jeweils das relative SCN2B Proteinlevel \pm Standardfehler für die Gruppe CCI und *Sham* dar. Der Mittelwert für die *Sham*-Gruppe wurde als 1 gesetzt. $n = 8$ pro Gruppe, t-Test unabhängiger Stichproben, $p > 0,05$).

5 Diskussion

Die Prävalenz neuropathischer Schmerzen in der allgemeinen Bevölkerung beträgt 6,9 - 10 % [4]. Eine ursächliche Therapie neuropathischer Schmerzen ist nicht verfügbar. Eine völlige Schmerzfreiheit der Patienten wird nur selten erreicht [54]. Die aktuelle Therapie von neuropathischen Schmerzen führt über einen symptomatisch orientierten Therapieansatz zu einer Schmerzreduktion ohne ursächliche Behandlung der Schmerztransduktion [118]. Eine adäquate Schmerzlinderung könnte durch einen Pathomechanismus-orientierten medikamentengesteuerten Eingriff erreicht werden. Durch die Detektion möglicher Pathomechanismen in der Entwicklung und Persistenz neuropathischer Schmerzen könnten potentielle Therapieansatzpunkte für weiterführende Studien ermittelt werden [119]. Einen möglichen Ansatzpunkt bilden miRs. MiRs sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die über eine translationale Regulation Einfluss auf physiologische und pathologische Prozesse nehmen können [52].

Ausgehend von der Hypothese, dass die Modulation von miRs zu einer Schmerzlinderung führen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit die relative Expression von miRs nach Induktion neuropathischer Schmerzen sowie die mögliche Regulation von Zielgenen der miRs im Spinalganglion der Ratte untersucht. In dieser Studie wurde zu den Zeitpunkten 4 h, 1 d, 6 d und 12 d nach Induktion einer CCI die relative Expression der miR-9, -26b, -34a und -103 im Spinalganglion der Ratte mittels qPCR im Vergleich zu einer scheinoperierten Gruppe untersucht. Die Auswahl der miRs erfolgte hinsichtlich einer differentiellen Expression in einem im Vorfeld durchgeführten *microRNA Array* [103] sowie der Interaktion mit potentiell schmerzrelevanten Proteinen oder aufgrund bereits bekannter veränderten Expression bei neurologischen Erkrankungen. Weiterhin wurde eine Interaktion der miR-34a mit einer möglichen schmerzrelevanten Ziel-mRNA für das Protein SCN2B untersucht und die Proteinkonzentration von SCN2B zum Zeitpunkt der differentiellen Expression der miR-34a im Spinalganglion der Ratte bestimmt. Eine gesteigerte Expression von SCN2B im Rahmen neuropathischer Schmerzen wurde bereits gezeigt [38, 39]

Die zu Beginn der Arbeit formulierten Fragen lassen sich wie folgt beantworten:

1. Die Induktion einer CCI führt 12 Tage nach Induktion zu einer signifikanten Herunterregulation der miR-34a im Spinalganglion der Ratte im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe.
Für die miR-9, -26b und -103 ergab sich zu den gewählten Untersuchungszeitpunkten (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) keine signifikante differentielle Expression.
2. In der *in-silico* Analyse konnte die mRNA für das potentiell schmerzrelevante Protein SCN2B als mögliche Ziel-mRNA der miR-34a ermittelt werden. SCN2B bildet die Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals.
3. Im Luziferase-Assay erfolgte der Nachweis einer Interaktion der miR-34a mit der mRNA des Proteins SCN2B.
4. Eine signifikant veränderte Expression des Proteins SCN2B im Spinalganglion der Ratte 12 Tage nach Induktion der CCI zeigte sich nicht.

5.1 Diskussion der Methodik

Auswahl des Tiermodells

Eine Translation pathophysiologischer Veränderungen im Tierversuch auf den Menschen ist nur bedingt möglich. Ergebnisse aus dem Tiermodell können allerdings Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Ansatz zur Behandlung neuropathischer Schmerzen im Menschen geben. In der Literatur finden sich eine Vielzahl an neuropathischen Schmerzmodellen. Die Induktion der *Spinal Nerve Ligation* (SNL) [120], *Partial Nerve Ligation* (PNL) [121] oder *Chronic Constriction Injury* (CCI) [114] führt zu neuropathischen Schmerzen. Die einzelnen neuropathischen Schmerzmodelle sind in Abbildung 12

„Experimentelle Modelle zur Induktion von neuropathischen Schmerzen“ dargestellt. In allen Untersuchungen bildet der *N. ischiadicus* den Angriffspunkt zur Induktion neuropathischer Schmerzen.

Bei der SNL degenerieren alle Fasertypen durch Durchtrennung aller spinalen Nervenwurzeln vom fünften und sechsten Lendenwirbel und der Ligation des proximalen Stumpfes. Zeichen der *Allodynie* und *Hyperalgesie* entwickeln sich rasch und persistieren bis zu vier Monate [120]. Bei der PNL, bei der der *N. ischiadicus* mittels Durchstechung und nachfolgender Ligation auf die Hälfte seines Durchmessers reduziert wird, entwickeln sich eine *Allodynie* und *Hyperalgesie* nach mehreren Stunden. Die Symptome persistieren über sechs Monate [121].

Die Induktion der CCI bedingt durch eine vierfache lockere Ligation des *N. ischiadicus* die Ausbildung eines intraneuralen Ödems, welches eine Einschnürung des *N. ischiadicus* zur Folge hat. Dieser Vorgang führt nach mehreren Tagen zur sicheren Ausbildung einer *Hyperalgesie* und *Allodynie* [114].

Die Induktion einer CCI wurde bereits in mehreren Studien im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt [122-125]. Das Vorgehen der CCI wurde für die vorliegende Arbeit aufgrund der hohen Expertise in der Durchführung sowie hohen Objektivität, Reliabilität und Validität bezüglich *Allodynie* und *Hyperalgesie* als Zeichen neuropathischer Schmerzen mittels Pfotenrückzugs-Schwellenwert und Pfotenrückzugslatenz gewählt.

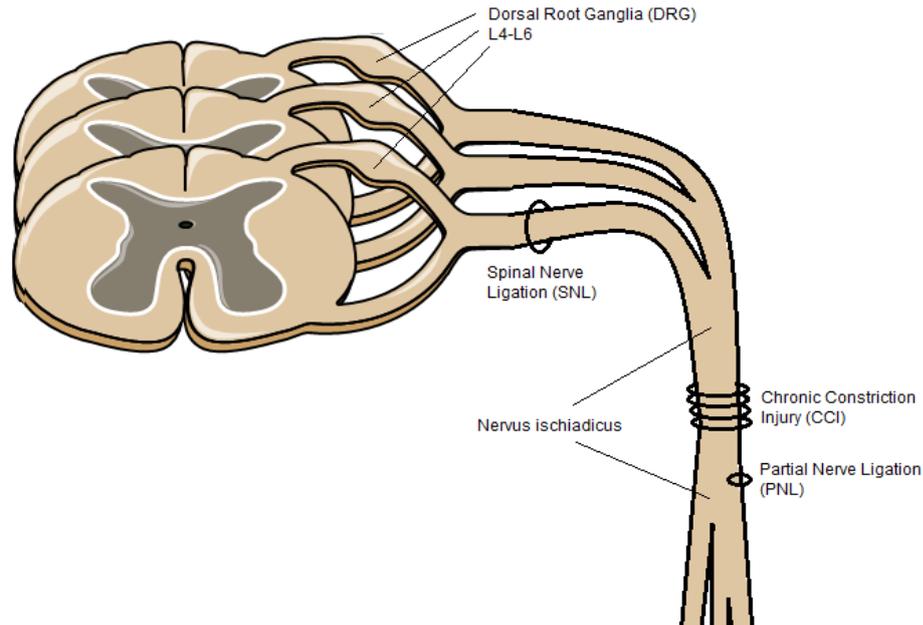


Abb. 12 - Experimentelle Modelle zur Induktion von neuropathischen Schmerzen

Schematische Darstellung der *Spinal Nerve Ligation* (SNL) [129], *Partial Nerve Ligation* (PNL) [130] und *Chronic Constriction Injury* (CCI) [131]. In allen Modellen bildet der *Nervus ischiadicus* den Angriffspunkt zur Induktion neuropathischer Schmerzen. Durch Durchtrennung aller spinalen Nervenwurzeln vom fünften und sechsten Lendenwirbel und einer Ligation des proximalen Stumpfes degenerieren alle Fasertypen im Rahmen der Induktion der SNL. Zeichen der *Allodynie* und *Hyperalgesie* entwickeln sich rasch und persistieren bis zu vier Monate. Bei der PNL, bei der der *N. ischiadicus* durch Durchstechung und Ligation auf die Hälfte seines Durchmessers reduziert wird, entwickelt sich *Allodynie* und *Hyperalgesie* nach Stunden. Die Symptome persistieren über sechs Monate. Die Induktion einer CCI führt über eine vierfache lockere Ligation des *N. ischiadicus* zur Ausbildung eines intraneuralen Ödems, welches eine Einschnürung des *N. ischiadicus* bedingt. Nach mehreren Tagen kommt es zur sicheren Ausbildung von *Hyperalgesie* und *Allodynie*.

Das Spinalganglion als Untersuchungsmaterial

Das Rückenmark als Teil des zentralen Nervensystems wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits auf eine differentielle Expression von miRs nach Induktion einer CCI untersucht [123]. Hier konnte nach Durchführung spezifischer PCR-Assays kein signifikant veränderter Expressionsunterschied von miRs im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe detektiert werden [123].

Das Spinalganglion (DRG) bildet eine Schaltstelle zwischen peripherem und zentralem Nervensystem. DRGs enthalten pseudounipolare Neurone, die die sensiblen Informationen wie Berührung, Temperatur und Schmerz aller sensorischen Nerven aus der Peripherie aufnehmen und an das zentrale Nervensystem weiterleiten [126]. Die meisten sensorischen Fasern aus dem Spinalganglion sind über Interneurone mit der grauen Substanz des Rückenmarks verschaltet. In mehreren Studien zeigte sich in ipsilateralen

aber auch kontralateralen DRGs eine differentielle Expression von Ionenkanälen, Botenstoffen, miRs und mRNAs nach Induktion neuropathischer Schmerzen [102, 127-129]. In der Therapie neuropathischer Schmerzen wurde das DRG bereits als Therapieansatzpunkt erkannt. Neben der chirurgischen Versorgung (*Ganglionectomie*) [130] und der Radio-Frequenzablation [131, 132] konnte unter anderem mittels Neurostimulation im DRG eine Abnahme der Schmerzsymptomatik bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen um mehr als 50 % in den ersten drei Monaten nach Beginn der Therapie beobachtet werden [133, 134]. Eine Detektion spezifischer Veränderungen der miR - und Proteinexpression im DRG der Ratte nach Induktion neuropathischer Schmerzen könnte zu potentiellen neuen therapeutischen Ansatzpunkten in der Therapie neuropathischer Schmerzen führen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es möglichst frühe Pathomechanismen des neuropathischen Schmerzes zu detektieren.

Auswahl der Zeitpunkte

Erste Zeichen neuropathischer Schmerzen finden sich innerhalb der ersten Woche, eine Verstärkung der Symptome innerhalb der zweiten Woche nach Induktion der CCI [123, 135]. Auf Basis der klinischen Beobachtungen der Ratten bezüglich der Entwicklung von *Allodynie* und *Hyperalgesie* wurden die Zeitpunkte vier Stunden, ein Tag, sechs Tage und zwölf Tage nach Induktion der CCI gewählt [123, 125, 135]. Da die Hemmung der Translation durch die Bindung einer miR an die 3'-UTR einer mRNA bedingt wird [53, 136-139], muss vor dem Auftreten oder der Verstärkung einer klinischen Symptomatik eine Änderung der miR-Expression stattgefunden haben, um einen Effekt auf Proteinebene erzielen zu können. Durch Auswahl der genannten Zeitpunkte im Intervall der Entstehung von neuropathischen Schmerzen sollte eine differentielle Expression von potentiell schmerzrelevanten miRs zum Zeitpunkt der Entwicklung neuropathischer Schmerzen detektiert werden.

Auswahl der Methodik

Die qPCR bildet den Goldstandard zur Quantifizierung der Genexpression [140, 141]. MiRs bestehen aus etwa 21-23 Nukleotiden, weshalb eine sensitive und spezifische Quantifizierung aufgrund der kurzen

Sequenzen kaum möglich scheint. Es erfolgte die Auswahl von *TaqMan MicroRNA Assays*, da mit diesen Assays eine hohe Sensitivität und Spezifität in der Detektion von Expressionsunterschieden von miRs erreicht werden kann [142]. Durch die enthaltenen stem-loop Primer soll eine Bindung der Primer an doppelsträngige DNA Moleküle wie Vorstufen der reifen miR (bspw. ds-miR) verhindert und damit die Spezifität erhöht werden [142]. Bereits in mehreren Studien zu neuropathischen Schmerzen wurde die qPCR zur Analyse schmerzspezifischer miRs verwendet [102, 123, 125, 129].

Die Verwendung von HEK 293 zur Durchführung der Transfektion stellt ein etabliertes Vorgehen dar [129, 143, 144]. In weiterführenden Studien sollten statt HEK 293 neuronale Zellen, wie beispielsweise Neuronen aus dem DRG, zur Untersuchung der molekularen Veränderungen bei neuropathischen Schmerzen verwendet werden. Da in der vorliegenden Arbeit die differentielle Expression von miRs im DRG der Ratte untersucht wurde, erscheint eine Verwendung neuronaler Zellen anstelle von HEK 293 Zellen sinnvoll.

Mittels Luziferase-Assay kann eine Bindung einer miR an die 3'-UTR einer mRNA verifiziert werden [145]. Auch der Luziferase Assay stellt eine etablierte und häufig verwendete Untersuchungsmethode dar [146] und wurde in unser Studie zur Verifizierung der Bindung der miR an die 3'-UTR der potentiell schmerzrelevanten mRNA verwendet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Bisher konnten die spezifischen Funktionen aller miRs bei neuropathischen Schmerzen noch nicht vollständig entschlüsselt werden. Das Vorhandensein von miRs in neuronalem Gewebe [107, 111-113] und der bereits bekannte Einfluss auf kortikale Neurone [110] legt einen neuromodulatorischen Effekt auch im Rahmen neuropathischer Schmerzen nahe. Es wurde in mehreren Studien bereits eine veränderte Expression von miRs und auch deren *Targets* nach Induktion neuropathischer Schmerzen nachgewiesen [95, 102, 129, 147], ihre genaue Funktion bei der Entwicklung und Persistenz neuropathischer Schmerzen konnte bisher aber nur unzureichend geklärt werden.

Ausgehend von der Hypothese, dass miRs an der Entstehung und Persistenz des neuropathischen Schmerzes beteiligt sind, wurde in dieser Studie die Expression spezifischer miRs und deren potentielle Regulation schmerzrelevanter *Targets* untersucht. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über potentielle Therapieansatzpunkte für weiterführende Studien ergeben.

Im Fokus der Untersuchung standen zunächst die miR-9, -26b, -34a und -103. Diese miRs waren neben anderen differentiell exprimierten miRs in einem im Vorfeld durchgeführten *miRNA Microarray* [103] durch eine signifikant veränderte Expression aufgefallen. Das Ergebnis des *miRNA Microarrays* hatte eine differentielle Expression von 114 miRs im DRG der Ratte zu den untersuchten Zeitpunkten (4 h, 1 d, 6 d und 12 d) nach Induktion einer CCI ergeben [103].

Die Auswahl der unsererseits weitergehend untersuchten miR-9, -26b, -34a und -103 erfolgte unter anderem aufgrund der bekannten Interaktion der miRs hinsichtlich der Differenzierung und Migration embryonaler und adulter neuronaler Zellen (miR-9) [84, 104, 105], der differentiellen Expression bei neurologischer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und der Epilepsie (miR-26b, -34a) [107, 113], der Beeinflussung des dendritischen Wachstums von kortikalen Neuronen (miR-34a) [110], dem Nachweis in neuronalem Gewebe (miR-9, -26b, -34a, -103) [107, 111-113] und der Interaktion mit potentiell schmerzrelevanten *Targets* [106, 109].

Von Schack et al. untersuchten 365 miRs im Spinalganglion der Ratte vier Wochen nach Induktion einer SNL. Mittels spezifischer *TaqMan low density arrays* ermittelten von Schack et al. 63 signifikant veränderte miRs. Dabei fiel bei 10 miRs ein ausgeprägter Expressionsunterschied mit einem *fold change* von bis zu 900 auf [129]. Im weiteren Verlauf der Studie wurde die Interaktion der signifikant veränderten miRs mit potentiell schmerzrelevanten *Targets* in einem Luziferase-Assay bestätigt. Aus diesen Ergebnissen wurde auf einen möglichen modulatorischen Effekt durch eine veränderte Expression von miRs in der Ausbildung und Persistenz neuropathischer Schmerzen geschlossen [129]. Dies entspricht der Hypothese, von der auch wir in der vorliegenden Arbeit ausgegangen sind.

Durch den Untersuchungszeitpunkt 4 Wochen nach Induktion der SNL wurde allerdings (entgegengesetzt zu unserem Ansatz) nicht die Veränderungen in der frühen Phase der Ausbildung neuropathischer Schmerzen, sondern ein späterer Zeitpunkt, also die Veränderung der miR-Expression in der Persistenz und Chronifizierung neuropathischer Schmerzen gewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein früher Zeitpunkt gewählt, da ein frühzeitiger medikamenten-gesteuerter Eingriff in die molekularen Pathomechanismen, die Kaskade neuropathischer Schmerzen direkt zu Beginn durchbrechen und die Ausbildung neuropathischer Schmerzen unterbinden könnte. Eine Chronifizierung neuropathischer Schmerzen kann so vermieden werden.

Korrelierend zu den Ergebnissen in der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten *miRNA Microarray* finden sich in der Analyse des *TaqMan low density arrays* in der Studie von von Schack et al. ebenfalls die miR-34a und -103 neben anderen miRs signifikant vermindert exprimiert. Allerdings findet sich die miR-9 und -26b in der Studie von von Schack et al. ebenfalls vermindert exprimiert, während in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression der miR-9 und -26b zum Zeitpunkt 4 h nach Induktion einer CCI im *miRNA Microarray* detektiert wurde. Erneut sind die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte (4 Wochen nach Induktion einer SNL vs 4 h nach Induktion einer CCI) zu berücksichtigen. Ob es im Rahmen einer SNL zu einem früheren Zeitpunkt ebenfalls zu einer vermehrten Expression der miR-9 und -26b kommt, bleibt ungeklärt.

Von Schack et al. untersuchten auch die kontralateral zur Läsion gelegenen DRGs. Interessanterweise ergaben die Untersuchungen, dass die Mehrzahl der differentiell veränderten miRs im kontralateralen Spinalganglion zu finden waren [129]. In unserer Studie wurden nach Induktion der CCI nur die ipsilateral zur Läsion gelegenen DRGs untersucht, eine Untersuchung der kontralateralen DRGs wurde nicht durchgeführt, erscheint allerdings nach den Ergebnissen von von Schack et al. sinnvoll und sollte auch in weiterführenden Studien erwogen werden.

Nicht nur aufgrund der unterschiedlich untersuchten Zeitpunkte, auch aufgrund der Verwendung eines anderen neuropathischen Schmerzmodells (SNL vs CCI) ist eine direkte Übertragung der jeweiligen Ergebnisse der einzelnen Studien nicht möglich.

Die Ergebnisse der differentiellen Expression der miRs im *miRNA Microarray* wurden in der vorliegenden Studie mittels qPCR geprüft. Ein signifikanter Expressionsunterschied (vs *Sham*) ergab sich nur für die miR-34a zum Zeitpunkt 12 d nach Induktion der CCI. Für die miR-9, -26b und -103 konnte die im *miRNA Microarray* nachgewiesene signifikant verminderte Expression mittels qPCR nicht bestätigt werden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der qPCR und des *miRNA Microarrays* lassen sich möglicherweise durch die kurze Nukleotidsequenz der miRs erklären. Da miRs aus einer Nukleotidsequenz von etwa 20 Nukleotiden bestehen, dient im *Microarray* häufig die komplette Sequenz als Sonde. Dies hat zur Folge, dass eine Varianz der Schmelztemperaturen um mehr als 20 °C besteht. Dies führt zu einer Abnahme der Spezifität der Bindung [148]. Durch die Verwendung von *TaqMan MicroRNA Assays* für die qPCR kann eine hohe Sensitivität und Spezifität in der Detektion von Expressionsunterschieden von miRs erreicht werden [137].

Trotz der in unserer Studie nicht signifikanten Expressionsveränderung der miR-9, -26b und -103 in der qPCR sollte in weiterführenden Studien eine erneute Analyse dieser miRs erfolgen. Es ist denkbar, dass die ausgewählten Zeitpunkte (4 h, 1 d, 6 d, 12 d) den Zeitpunkt einer signifikanten Expressionsänderung dieser drei miRs nicht abdeckt. In der qPCR der miR-103 findet sich beispielsweise eine deutliche (nicht signifikante) Abnahme der Expression der miR einen Tag nach Induktion der CCI. Eine

Beeinflussung neuropathischer Schmerzen durch die miR-103 im Rückenmark ist bereits bekannt. Die miR-103 reguliert drei Untereinheiten eines Calciumkanals (Ca(v)1.2) im Hinterhorn des Rückenmarks. Ein Knock-down der miR-103 in einem neuropathischen Tierversuch führte zu erhöhtem Schmerzempfinden [108]. Es ist denkbar, dass eine signifikant verminderte Expression der miR-103 im Zeitintervall zwischen vier Stunden und sechs Tagen nach Induktion der CCI auftritt, diese aber nicht durch die unsererseits gewählten Zeitpunkte abgedeckt wird. Eine erneute Evaluation der miR-103 mit Auswahl weiterer Zeitpunkte könnte darüber Aufschluss geben. Eine erneute Re-Evaluation der Expression der miR-9, -26b und -103 zu anderen Zeitpunkten oder in anderem Gewebe (bspw. Rückenmark) in weiterführenden Studien erscheint daher sinnvoll.

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Herunterregulation der Expression der miR-34a 12 Tage nach Induktion einer CCI (*fold change*: 0,4; * $p = 0,001$ vs *Sham*). Auch von Schack et al. beschreibt eine verminderte Expression miR-34a nach Induktion neuropathischer Schmerzen [129]. Im Zusammenschau dieser beiden Studien erscheint ein neuromodulatorischer Effekt der miR-34a im Rahmen neuropathischer Schmerzen wahrscheinlich. Die miR-34a erlangte eine Schlüsselrolle in der Tumorsuppression durch Kontrolle von Zielproteinen im Bereich des Zellzyklus, Differenzierung, Apoptose (p53) sowie Antagonisierung notwendiger Prozesse in der Lebensfähigkeit, der Stammzeleigenschaften, Metastasierung und Chemoresistenz [118, 119]. Auch eine Beeinflussung neuronaler Ereignisse konnte durch Nachweis eines verminderten dendritischen Wachstums von kortikalen Neuronen in Mäusen bei Inhibition der miR-34a und durch eine Verkürzung der Länge und Verästelung der Dendriten bei einer erhöhten Expression der miR belegt werden [110]. Ein signifikant erhöhtes Expressionslevel der miR-34a nach Rückenmarksverletzung wurde ebenfalls bereits gezeigt [149]. Brandenburger et al. konnten zwar keine differentielle Expression von miRs im Rückenmark von Ratten nach Induktion der CCI nachweisen [123], eine Untersuchung verschiedener neuronaler Gewebe in der Untersuchung der Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen erscheint allerdings sinnvoll um die die Ätiologie gänzlich zu klären.

Faveraux et al. zeigten als eine der ersten Studien einen Zusammenhang zwischen einer miR und seinem *Target*. Ein *Knock-down* der miR-103 in einem neuropathischen Tierversuch führte über die Regulation der drei Untereinheiten eines Calciumkanals (Ca(v)1.2) zu einem erhöhtem Schmerzempfinden, eine intrathekale Injektion zu Schmerznachlass [116]. Somit findet sich ein direkter Zusammenhang zwischen einer miR und dem zugehörigen *Target in-vivo*.

Mittels *in-silico* Analyse mit Hilfe der Internetdatenbank *targetscan.org* wurden potentiell schmerzrelevante *Targets* der miR-34a demaskiert. Hier ergab sich für die miR-34a die 3'-UTR der mRNA des Proteins SCN2B als mögliche Interaktionsstruktur. SCN2B bildet die Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals [37]. Die Verifizierung einer Bindung der miR-34a an die 3'-UTR der mRNA für SCN2B erfolgte über eine Transfektion von HEK 293 Zellen mit entsprechenden Plasmiden und anschließender Durchführung eines Luziferase-Assays.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals eine Interaktion der miR-34a an die 3'-UTR der mRNA von SCN2B im Luziferase-Assay durch eine signifikante Abnahme der Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (*fold change*: 0,44, ***p = 0,0001).

Durch die Herunterregulation einer miR erhöht sich die Translation der von der miR regulierten mRNA. Eine Steigerung der Proteinkonzentration sollte die Folge sein. Da die miR-34a in der qPCR zum Zeitpunkt 12 Tage nach Induktion neuropathischer Schmerzen signifikant vermindert exprimiert war, sollte es konsekutiv zu einer verminderten Hemmung der mRNA und damit erhöhten Proteinexpression von SCN2B kommen. Durch eine vermehrte Expression von Ionenkanälen ist eine erhöhte elektrische Erregbarkeit durch Senkung des Schwellenpotenzials und damit einhergehend eine erleichterte Auslösung eines Aktionspotentials zu erwarten [16, 17, 150]. Bei einer peripheren Nervenverletzung konnte eine vermehrte Expression von Natriumkanälen, wie Nav 1.3, 1.6 oder 1.9 bereits beobachtet werden [18]. So findet sich auch eine Reduktion des Schmerzverhaltens nach Induktion einer *Spinal Cord Injury* (SNI) nach selektivem Knockdown des Natriumkanals Nav 1.3 [26]. In der vorliegenden sollte die Abnahme der miR-34a Expression 12 Tage nach Induktion der CCI zu einer verminderten Hemmung der mRNA

für SCN2B und damit zu einer erhöhten Expression des Proteins SCN2B führen.

Interessanterweise untersuchten Pertin et al. die Expression von SCN2B in primär sensorischen Neuronen und deren peripheren Axonen in zwei verschiedenen neuropathischen Schmerzmodellen (SNI und SNL) [39]. Drei Tage nach Induktion der neuropathischen Schmerzen konnte immunohistochemisch und mittels Westernblot ein Anstieg von SCN2B sowohl in den Zellkernen als auch in den peripheren Axonen von verletzten und unverletzten Nervenfasern gemessen werden. Bei der Testung mit Frey-Ligamenten stellte sich eine *Allodynie* im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Auch zeigten SCN2B Null Mäuse eine reduzierte Sensitivität für schmerzhafte Stimuli im Vergleich zu Wildtypmäusen [39]. Auffällig in dieser Studie war, dass eine stabile Expression der mRNA von SCN2B im Spinalganglion L4/5 nach Induktion der neuropathischen Schmerzen gemessen werden konnte [39], trotz Zunahme der Expression von SCN2B. Das Ergebnis der Studie von Pertin et al. deutet auf eine posttranskriptionelle Regulation bei neuropathischen Schmerzen hin. Eine Regulation durch miRs ist denkbar. Der Nachweis einer Bindung der miR-34a an die mRNA für SCN2B im Luziferase-Assay in der vorliegenden Studie gibt Hinweise darauf, dass die miR-34a die mRNA von SCN2B reguliert. So stützen die Ergebnisse von Pertin et al. die Hypothese, dass eine Herunterregulation der miR-34a über die daraus resultierende Abnahme der Hemmung der Translation, zu einer Zunahme der Expression von SCN2B führt.

Entgegengesetzt unserer Erwartungen zeigte sich allerdings keine signifikante Veränderung der Expression des Proteins SCN2B im ELISA zum Zeitpunkt der signifikanten Herunterregulation der miR-34a 12 Tage nach Induktion der CCI. Für die fehlende signifikante Veränderung der Proteinexpression im ELISA gibt es mehrere Argumente.

Einen Diskussionspunkt bietet der Zeitpunkt, zu dem der ELISA durchgeführt wurde. Die Untersuchungen der Proteinexpression mittels ELISA erfolgten 12 Tage nach Induktion der CCI. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in der qPCR eine signifikante Herunterregulation der Expression der miR-34a im DRG der Ratte. Ausgehend von der Hypothese, dass die Bindung der miR an eine

mRNA zur Hemmung der Translation führt [57, 151], ist ein Effekt auf Proteinebene mit einer gewissen Zeitverzögerung zwischen Herunterregulation der miR und gesteigerter Expression des *Targets* zu erwarten. Eine statistisch nicht relevante leichte Zunahme der Expression von SCN2B geht aus dem ELISA hervor. Es erscheint sinnvoll, weitere Zeitpunkte nach dem Nachweis einer differentiellen Expression einer miR zu untersuchen, um einen Effekt auf Proteinebene detektieren zu können. Bedenkt man, dass die erhöhte Expression von SCN2B noch 4 Wochen nach Induktion der neuropathischen Schmerzen detektierbar war [39], erscheint eine Auswahl späterer Zeitpunkte als 12 Tage nach Induktion der CCI sinnvoll. Des Weiteren darf nicht vernachlässigt werden, dass jede miR mit vielen unterschiedlichen mRNAs interagiert und somit eine einzelne mRNA durch viele miRs reguliert werden kann [57, 151]. Es ist denkbar, dass die Induktion neuropathischer Schmerzen zu einer erhöhten Expression weiterer miRs, die die mRNA von SCN2B ebenfalls binden, führt. Diese Bindung weiterer miRs an die 3'-UTR der mRNA von SCN2B könnte die Translation trotz Herunterregulation der miR-34a weiterhin hemmen. Ein stabiles Proteinlevel von SCN2B wäre die Folge. Diese These erscheint zunächst konträr zu der Arbeit von Pertin et al., die eine vermehrte Expression von SCN2B detektierten [39]. Aufgrund der Wahl der unterschiedlichen Schmerzmodelle und untersuchten Zeitpunkte der beiden Studien, sind die Ergebnisse allerdings nicht unvoreingenommen aufeinander übertragbar.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Induktion neuropathischer Schmerzen mittels CCI führt im DRG der Ratte zu einer signifikant verminderten Expression der miR-34a. Wir konnten erstmalig eine Bindung der miR-34a an die 3'-UTR der mRNA von SCN2B, einer Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals, *in-vitro* nachweisen. Ein signifikanter Effekt auf Proteinebene *in-vivo* im ELISA blieb aus. Weiterhin bleibt die Bindungsmodalität der miR-34a an die mRNA für SCN2B ungeklärt. Zudem konnten wir keine relevanten Veränderungen der Expression der miR-9, -26b und -103 im DRG der Ratte zu den gewählten Zeitpunkten objektivieren.

Die bestehenden therapeutischen Ansätze zur Behandlung neuropathischer Schmerzen sind derzeit nicht ausreichend, sodass auch in Zukunft ein Bedarf der Detektion weiterer Pathomechanismen in der Entwicklung neuropathischer Schmerzen besteht, um neue Behandlungsansätze entwickeln zu können.

In weiterführenden Studien sollte die Untersuchung der Proteinexpression mittels ELISA mit zeitlicher Latenz zum Zeitpunkt der *in-vitro* detektierten verminderten Expression der miR-34a erfolgen. Alternativ muss untersucht werden, ob auch andere miRs an die 3'-UTR der mRNA von SCN2B binden und so einer Zunahme der Expression von SCN2B nach Induktion einer CCI entgegenwirken.

Eine Evaluation der miR-9, -26b und -103 erscheint zudem vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage im Rahmen eines möglichen neuroregenerativen Effektes interessant. Aufgrund der in unserer Arbeit nicht signifikanten Ergebnisse zu den gewählten Zeitpunkten ist auch hier die Betrachtung der Expressionslevel der genannten miRs zu anderen Zeitpunkten von Bedeutung und sollte nicht aus dem Blickfeld künftiger Forschungsaufträge verloren gehen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Biogenese der microRNA.....	7
Abbildung 2 - Abbildung des pcDNA™3.1(+/-)(Invitrogen)-Vektors	33
Abbildung 3 - Abbildung des pMIR-REPORT™ Systems	33
Abbildung 4 - Relative Expression der miR-34a nach Induktion einer CCI	42
Abbildung 5 - Relative Expression der miR-9 nach Induktion einer CCI	43
Abbildung 6 - Relative Expression der miR-26b nach Induktion einer CCI	44
Abbildung 7 - Relative Expression der miR-103 nach Induktion einer CCI	45
Abbildung 8 - Ergebnis der Sequenzierung der miR-34a	46
Abbildung 9 - Ergebnis der Sequenzierung von SCN2B	47
Abbildung 10 - Nachweis eines inhibierenden Effekts der miR-34a im Luziferase- Assay.....	48
Abbildung 11 - Relative Expression von SCN2B 12 Tage nach Induktion einer CCI	49
Abbildung 12 - Experimentelle Modelle zur Induktion von neuropathischen Schmerzen	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Anzahl differentiell exprimierter miRs im <i>miRNA Microarray</i>	11
Tabelle 2 - Ergebnis der Analyse des <i>miRNA Microarrays</i>	11
Tabelle 3 - Reverser Transkriptions-Master-Mix (qPCR)	24
Tabelle 4 - Thermocycler Reaktionsprotokoll für die reverse Transkription.....	25
Tabelle 5 - Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes (qPCR)	25
Tabelle 6 - Reaktionsansatz zur Herstellung von komplementärer DNA.....	26
Tabelle 7 - Primer der miR-34a (konventionelle PCR)	27
Tabelle 8 - Reaktionsansatz zur Amplifizierung der miR-34a.....	27
Tabelle 9 - Thermocycler-Protokoll (konventionelle PCR).....	27
Tabelle 10 - Komponenten zur Herstellung von 1 x TAE-Puffer.....	28
Tabelle 11 - Zusammensetzung eines 2 %-igen Agarose-Gels	28
Tabelle 12 - Zusammensetzung der Orange G-Lösung	29
Tabelle 13 - Klonierung eines PCR-Produktes in den pGEM-T-Easy Vektor ...	30
Tabelle 14 - Zusammensetzung einer 10 x HBSS Lösung (Transfektion).....	35
Tabelle 15 - Zusammensetzung des <i>Working Luciferase Assay Reagents</i>	37
Tabelle 16 - Reaktionsansatz zur Messung der β -Galaktosidase Aktivität.....	38
Tabelle 17 - Zusammensetzung des RIPA Puffer	39

Literaturverzeichnis

1. Treede, R.D., et al., *Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes*. Neurology, 2008. **70**(18): p. 1630-5.
2. von Hehn, C.A., R. Baron, and C.J. Woolf, *Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms*. Neuron, 2012. **73**(4): p. 638-52.
3. Baron, R., *Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective*. Nat Clin Pract Neurol, 2006. **2**(2): p. 95-106.
4. van Hecke, O., et al., *Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies*. Pain, 2014. **155**(4): p. 654-62.
5. Baron, R., A. Binder, and G. Wasner, *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment*. Lancet Neurol, 2010. **9**(8): p. 807-19.
6. Koltzenburg, M., H.E. Torebjork, and L.K. Wahren, *Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain*. Brain, 1994. **117 (Pt 3)**: p. 579-91.
7. Treede, R.D., et al., *Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia*. Prog Neurobiol, 1992. **38**(4): p. 397-421.
8. Campbell, J.N. and R.A. Meyer, *Mechanisms of neuropathic pain*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 77-92.
9. Woolf, C.J. and Q. Ma, *Nociceptors--noxious stimulus detectors*. Neuron, 2007. **55**(3): p. 353-64.
10. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.
11. 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.
12. Kim, H.Y., et al., *Differential Changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury*. J Pain, 2008. **9**(3): p. 280-8.
13. 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.
14. Hong, S. and J.W. Wiley, *Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 618-27.
15. Davis, J.B., et al., *Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 183-7.
16. 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.
17. Wood, J.N., et al., *Voltage-gated sodium channels and pain pathways*. J Neurobiol, 2004. **61**(1): p. 55-71.
18. Craner, M.J., et al., *Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy*. Ann Neurol, 2002. **52**(6): p. 786-92.
19. Scholz, J. and C.J. Woolf, *The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia*. Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1361-8.

20. Moalem, G. and D.J. Tracey, *Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain*. Brain Res Rev, 2006. **51**(2): p. 240-64.
21. 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.
22. Sommer, C., *Painful neuropathies*. Curr Opin Neurol, 2003. **16**(5): p. 623-8.
23. Pezet, S. and S.B. McMahon, *Neurotrophins: mediators and modulators of pain*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 507-38.
24. Lindenlaub, T. and C. Sommer, *Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies*. Acta Neuropathol, 2003. **105**(6): p. 593-602.
25. Goldin, A.L., *Resurgence of sodium channel research*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 871-94.
26. Hains, B.C., et al., *Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury*. J Neurosci, 2003. **23**(26): p. 8881-92.
27. Waxman, S.G., et al., *Sodium channel genes in pain-related disorders: phenotype-genotype associations and recommendations for clinical use*. Lancet Neurol, 2014. **13**(11): p. 1152-60.
28. Hoeijmakers, J.G., et al., *Painful peripheral neuropathy and sodium channel mutations*. Neurosci Lett, 2015. **596**: p. 51-9.
29. Catterall, W.A., *Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 11): p. 2577-89.
30. Yu, F.H., et al., *Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7577-85.
31. Morgan, K., et al., *beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2308-13.
32. Isom, L.L., et al., *Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel*. Science, 1992. **256**(5058): p. 839-42.
33. Isom, L.L., et al., *Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif*. Cell, 1995. **83**(3): p. 433-42.
34. Patino, G.A. and L.L. Isom, *Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease*. Neurosci Lett, 2010. **486**(2): p. 53-9.
35. Zhang, M.M., et al., *Co-expression of Na(V)beta subunits alters the kinetics of inhibition of voltage-gated sodium channels by pore-blocking mu-conotoxins*. Br J Pharmacol, 2013. **168**(7): p. 1597-610.
36. Noda, M., et al., *Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 121-7.
37. Brackenbury, W.J. and L.L. Isom, *Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family*. Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 53.
38. Lopez-Santiago, L.F., et al., *Sodium channel beta2 subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain*. J Neurosci, 2006. **26**(30): p. 7984-94.

39. Pertin, M., et al., *Upregulation of the voltage-gated sodium channel beta2 subunit in neuropathic pain models: characterization of expression in injured and non-injured primary sensory neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(47): p. 10970-80.
40. Woolf, C.J., *Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain*. Pain, 2011. **152**(3 Suppl): p. S2-15.
41. Magerl, W., S.H. Wilk, and R.D. Treede, *Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans*. Pain, 1998. **74**(2-3): p. 257-68.
42. Woolf, C.J., S.W. Thompson, and A.E. King, *Prolonged primary afferent induced alterations in dorsal horn neurones, an intracellular analysis in vivo and in vitro*. J Physiol (Paris), 1988. **83**(3): p. 255-66.
43. Costigan, M. and C.J. Woolf, *Pain: molecular mechanisms*. J Pain, 2000. **1**(3 Suppl): p. 35-44.
44. Simone, D.A., et al., *Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons*. J Neurophysiol, 1991. **66**(1): p. 228-46.
45. Baron, R., *Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms*. Clin J Pain, 2000. **16**(2 Suppl): p. S12-20.
46. Ma, Q.P. and C.J. Woolf, *Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord*. Pain, 1996. **67**(1): p. 97-106.
47. Kohno, T., et al., *Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord*. Pain, 2005. **117**(1-2): p. 77-87.
48. Yoshimura, M. and N. Yonehara, *Alteration in sensitivity of ionotropic glutamate receptors and tachykinin receptors in spinal cord contribute to development and maintenance of nerve injury-evoked neuropathic pain*. Neurosci Res, 2006. **56**(1): p. 21-8.
49. Dougherty, P.M., et al., *Combined application of excitatory amino acids and substance P produces long-lasting changes in responses of primate spinothalamic tract neurons*. Brain Res Brain Res Rev, 1993. **18**(2): p. 227-46.
50. Li, C.Y., et al., *Spinal dorsal horn calcium channel alpha2delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia*. J Neurosci, 2004. **24**(39): p. 8494-9.
51. Neurologie, K.L.d.D.G.f., *Pharmakologisch nicht interventionelle Therapie chronisch neuropathischer Schmerzen*. 2015(AWMF-Registernummer:030/114).
52. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
53. 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.
54. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
55. Saxena, S., Z.O. Jonsson, and A. Dutta, *Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44312-9.

56. 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.
57. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
58. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
59. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1097-101.
60. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
61. 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.
62. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
63. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
64. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27595-603.
65. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
66. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
67. 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.
68. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
69. 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.
70. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
71. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
72. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
73. Lim, L.P., et al., *The microRNAs of Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 2003. **17**(8): p. 991-1008.
74. Kawamata, T. and Y. Tomari, *Making RISC*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 368-76.
75. Lingel, A., et al., *Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 465-9.
76. Keller, G., et al., *Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 473-86.
77. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.

78. Curtis, M.A., et al., *Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension*. *Science*, 2007. **315**(5816): p. 1243-9.
79. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1313-7.
80. Berezikov, E., et al., *Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain*. *Nat Genet*, 2006. **38**(12): p. 1375-7.
81. Kim, J., et al., *Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(1): p. 360-5.
82. Kawase-Koga, Y., et al., *RNAase-III enzyme Dicer maintains signaling pathways for differentiation and survival in mouse cortical neural stem cells*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 4): p. 586-94.
83. Kawase-Koga, Y., G. Otaegi, and T. Sun, *Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system*. *Dev Dyn*, 2009. **238**(11): p. 2800-12.
84. Delaloy, C., et al., *MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(4): p. 323-35.
85. Stappert, L., et al., *MicroRNA-based promotion of human neuronal differentiation and subtype specification*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e59011.
86. Choi, P.S., et al., *Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis*. *Neuron*, 2008. **57**(1): p. 41-55.
87. Schratt, G.M., et al., *A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development*. *Nature*, 2006. **439**(7074): p. 283-9.
88. Satoh, J., *MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: aberrant microRNA expression in Alzheimer's disease brains*. *J Pharmacol Sci*, 2010. **114**(3): p. 269-75.
89. Cogswell, J.P., et al., *Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways*. *J Alzheimers Dis*, 2008. **14**(1): p. 27-41.
90. Lukiw, W.J., *Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus*. *Neuroreport*, 2007. **18**(3): p. 297-300.
91. Sethi, P. and W.J. Lukiw, *Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex*. *Neurosci Lett*, 2009. **459**(2): p. 100-4.
92. Kim, J., et al., *A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons*. *Science*, 2007. **317**(5842): p. 1220-4.
93. Schaefer, A., et al., *Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs*. *J Exp Med*, 2007. **204**(7): p. 1553-8.
94. Haramati, S., et al., *miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(29): p. 13111-6.
95. Bai, G., et al., *Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain*. *Mol Pain*, 2007. **3**: p. 15.
96. 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.
97. Willemen, H.L., et al., *MicroRNA-124 as a novel treatment for persistent hyperalgesia*. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 143.

98. Wu, D., et al., *MicroRNA machinery responds to peripheral nerve lesion in an injury-regulated pattern*. Neuroscience, 2011. **190**: p. 386-97.
99. Li, H., et al., *Differential expression of miRNAs in the nervous system of a rat model of bilateral sciatic nerve chronic constriction injury*. Int J Mol Med, 2013. **32**(1): p. 219-26.
100. Arai, M., et al., *The miRNA and mRNA changes in rat hippocampi after chronic constriction injury*. Pain Med, 2013. **14**(5): p. 720-9.
101. 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.
102. 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.
103. Prassek, V., *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* Dissertationsschrift: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=41376>. 2017.
104. Radhakrishnan, B. and A. Alwin Prem Anand, *Role of miRNA-9 in Brain Development*. J Exp Neurosci, 2016. **10**: p. 101-120.
105. Li, Y., et al., *MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in Drosophila*. Genes Dev, 2006. **20**(20): p. 2793-805.
106. Laumet, G., et al., *G9a is essential for epigenetic silencing of K(+) channel genes in acute-to-chronic pain transition*. Nat Neurosci, 2015. **18**(12): p. 1746-55.
107. Liu, H., et al., *MicroRNA-26b is upregulated in a double transgenic mouse model of Alzheimer's disease and promotes the expression of amyloid-beta by targeting insulin-like growth factor 1*. Mol Med Rep, 2016. **13**(3): p. 2809-14.
108. 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.
109. Enes, J., et al., *Electrical activity suppresses axon growth through Ca(v)1.2 channels in adult primary sensory neurons*. Curr Biol, 2010. **20**(13): p. 1154-64.
110. Agostini, M., et al., *microRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. 21099-104.
111. Hu, K., et al., *MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus*. BMC Neurosci, 2012. **13**: p. 115.
112. Hu, K., et al., *Expression profile of microRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus*. Neurosci Lett, 2011. **488**(3): p. 252-7.
113. Jimenez-Mateos, E.M. and D.C. Henshall, *Epilepsy and microRNA*. Neuroscience, 2013. **238**: p. 218-29.
114. 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.

115. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
116. Holzapfel, W., *Methoden und Anwendungsgebiete: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)*. Biol. unserer Zeit, 2007: p. 120-126.
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. Gilron, I., R. Baron, and T. Jensen, *Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment*. Mayo Clin Proc, 2015. **90**(4): p. 532-45.
119. Erson, A.E. and E.M. Petty, *MicroRNAs in development and disease*. Clin Genet, 2008. **74**(4): p. 296-306.
120. Kim, S.H. and J.M. Chung, *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat*. Pain, 1992. **50**(3): p. 355-63.
121. Seltzer, Z., R. Dubner, and Y. Shir, *A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury*. Pain, 1990. **43**(2): p. 205-18.
122. Hermanns, H., et al., *Loss of spinal glycinergic neurons is not necessary for development of neuropathic pain in transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein in glycinergic neurons*. Neuroscience, 2009. **159**(3): p. 1148-53.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. Black, J.A., et al., *Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons*. J Neurophysiol, 1999. **82**(5): p. 2776-85.
128. Fukuoka, T., et al., *Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model*. Pain, 1998. **78**(1): p. 13-26.
129. 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).
130. Acar, F., et al., *Pain relief after cervical ganglionectomy (C2 and C3) for the treatment of medically intractable occipital neuralgia*. Stereotact Funct Neurosurg, 2008. **86**(2): p. 106-12.
131. Lord, S.M., et al., *Percutaneous radio-frequency neurotomy for chronic cervical zygapophyseal-joint pain*. N Engl J Med, 1996. **335**(23): p. 1721-6.
132. Liem, L., et al., *The Dorsal Root Ganglion as a Therapeutic Target for Chronic Pain*. Reg Anesth Pain Med, 2016. **41**(4): p. 511-9.

133. Pope, J.E., et al., *The Proper Use of Neurostimulation for Hand Pain*. Hand Clin, 2016. **32**(1): p. 81-90.
134. Deer, T.R., et al., *Dorsal root ganglion stimulation yielded higher treatment success rate for CRPS and causalgia at 3 and 12 months: randomized comparative trial*. Pain, 2016.
135. 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.
136. Llave, C., et al., *Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.
137. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
138. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
139. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
140. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
141. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
142. Chen, C., et al., *Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(20): p. e179.
143. Varendi, K., et al., *miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(22): p. 4443-56.
144. Heyn, J., et al., *miR-124a and miR-155 enhance differentiation of regulatory T cells in patients with neuropathic pain*. J Neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 248.
145. Clement, T., V. Salone, and M. Rederstorff, *Dual luciferase gene reporter assays to study miRNA function*. Methods Mol Biol, 2015. **1296**: p. 187-98.
146. Yang, D., et al., *The role of miR-190a-5p contributes to diabetic neuropathic pain via targeting SLC17A6*. J Pain Res, 2017. **10**: p. 2395-2403.
147. Kusuda, R., et al., *Differential expression of microRNAs in mouse pain models*. Mol Pain, 2011. **7**: p. 17.
148. 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.
149. Chen, Y., et al., *Changes in the Expression of miR-34a and its Target Genes Following Spinal Cord Injury In Rats*. Med Sci Monit, 2016. **22**: p. 3981-3993.
150. Waxman, S.G., J.D. Kocsis, and J.A. Black, *Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy*. J Neurophysiol, 1994. **72**(1): p. 466-70.
151. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer bedanken. Vielen Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit und die stetige und tatkräftige Unterstützung vor allem in der Endphase des Promotionsvorhabens.

Ein großes Dankeschön auch an PD Dr. med. Timo Brandenburger für die Überlassung des interessanten Themas, der Unterstützung und Betreuung meiner Promotion.

Herzlichen Dank an Hilbert Grievink, PhD, der mir im Labor jederzeit geduldig, freundlich und offen zur Seite stand und von dem ich viele experimentelle Techniken erlernen durfte.

Sowie herzlichen Dank an Yvonne Gruber und Claudia Dohle sowie an alle Mitarbeiter der Experimentelle Anästhesiologie und des BMFZ für die gute Einarbeitung, Zusammenarbeit und schöne Zeit im Labor. Ein großes Dankeschön an Nadine Lottmann für die Durchführung des ELISAs.

Ein besonderer Dank geht auch an unsere tiermedizinischen Doktoranden und Ärzte - insb. Fr. Dr. med. vet. Franziska Barthel - für die Durchführung der CCI-Operationen an den Versuchstieren und der freundschaftlichen Unterstützung während meiner Zeit im Forschungslabor.

Ich bedanke mich bei meinem Partner und Freunden für die Geduld und stetig offenen Ohren in allen Phasen der Erstellung der Arbeit. Besonders danke ich meinen Eltern und Schwestern für die Motivation und umfassende Unterstützung vom ersten Tag meines Medizinstudiums an. Ihnen widme ich diese Arbeit.