

Die Funktion von microRNAs bei der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen

Dissertation
zur Erlangung der Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Biowissenschaften
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Katharina Kynast
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2012)
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger
Prof. Dr. Beatrix Süß

Datum der Disputation: 14.06.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 microRNAs als neue Zielstrukturen für die Schmerztherapie.....	1
1.2 Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentstehung.....	2
1.2.1 Schmerzformen	3
1.2.2 Das nozizeptive System	4
1.2.3 Periphere und zentrale Sensibilisierung	6
1.3 Biosynthese von microRNAs und Erkennung von microRNA-Targets	12
1.4 Die Funktion von microRNAs	15
1.4.1 microRNAs im Nervensystem.....	16
1.4.2 microRNAs in der Schmerzentstehung	17
1.4.3 microRNAs bei der inflammatorischen Hyperalgesie	18
1.4.4 microRNAs bei neuropathischen Schmerzen.....	19
1.4.5 microRNAs bei schmerzhaften Erkrankungen	21
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen.....	24
2.1.1 Versuchstiere	24
2.1.2 Nozizeptive Tiermodelle	24
2.1.2.1 Formalin-Test	25
2.1.2.2 Zymosan-induzierte Pfotenentzündung	26
2.1.2.3 SNI-Modell neuropathischer Schmerzen	26
2.1.3 Gewebeentnahme.....	27
2.1.4 Fixierung des Gewebes	27
2.1.5 Anfertigung von Kryoschnitten	28
2.1.6 Applikation von microRNA-Inhibitoren und microRNA-Mimetika	28
2.2 Zellkultur	29
2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	29
2.2.2 Primärkulturen	30
2.2.2.1 Neuronenkultur.....	30
2.2.2.2 Primäre Gliakulturen	31
2.2.3 Stimulation der Primärzellen	32
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.3.1 RNA-Isolation.....	33
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.3.3 Genexpressionsanalyse und Microarrays	34
2.3.4 <i>In silico</i> Analyse potenzieller microRNA-Ziel-mRNA-Interaktionen	35
2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.3.5.1 Reverse Transkription	36
2.3.5.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	37

2.3.6 Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR	40
2.3.7 pMIR-REPORT™ Reporter System	41
2.3.7.1 pMIR-REPORT™ Reporter Vektoren.....	41
2.3.7.2 Präparative Plasmidisolierung	41
2.3.7.3 Annealing der microRNA-124a-Zielsequenz	42
2.3.7.4 Restriktionsverdau	43
2.3.7.5 DNA-Fällung	44
2.3.7.6 Ligation.....	44
2.3.7.7 Transformation	45
2.3.7.8 Selektion.....	46
2.3.7.9 Agarose-Gelelektrophorese	46
2.3.7.10 Sequenzierung.....	47
2.3.7.11 Analytische Plasmidisolierung	47
2.3.7.12 Transfektion der HeLa-Zellen.....	48
2.3.7.13 β -Gal ELISA	50
2.3.7.14 Luziferase-Assay.....	50
2.4 <i>In situ</i> Hybridisierung von Digoxigenin-markierten microRNA-Sonden	51
2.4.1 Fluoreszenzmarkierung der microRNA-Sonden.....	54
2.4.2 Chromogene Farbreaktion durch die Alkalische Phosphatase	55
2.4.3 Immunfluoreszenz an <i>in situ</i> hybridisierten Gewebe	55
2.4.4 Mikroskopische Aufnahmen	56
2.5 Statistik.....	56
2.6 Chemikalien und Reagenzien.....	58
3. Ergebnisse.....	61
3.1 Expression von microRNAs in nozizeptiven Geweben.....	61
3.1.1 microRNA Expression nach entzündlicher Stimulation mit Formalin	61
3.1.2 microRNA Expression nach entzündlicher Stimulation mit Zymosan.....	63
3.1.3 microRNA Expression bei SNI-induzierter Neuropathie	64
3.2 <i>In situ</i> Hybridisierung zur Lokalisation von miRs in Schmerz-relevanten Geweben	65
3.2.1 Zelluläre Lokalisation von microRNAs im Rückenmark.....	67
3.2.2 Kolokalisation von microRNAs mit neuronalen Zellen der Spinalganglien.....	71
3.3 Expression von microRNAs in neuronalen Primärzellen.....	73
3.3.1 Basale Expression von microRNA-124a und -134 in Primärzellen	73
3.3.2 Stimulation neuronaler Primärzellen mit inflammatorischen Mediatoren.....	74
3.4 <i>In vitro</i> microRNA-124a-Expressionskontrolle mittels microRNA-Modulatoren.....	76
3.5 <i>In vivo</i> Effekte der microRNA-124a-Modulatoren	77
3.6 microRNA-124a im peripheren Nervensystem.....	81
3.7 microRNA-124a-Ziel-mRNA Identifizierung	82
3.8 Validierung der Target-mRNAs von microRNA-124a.....	85
4. Diskussion.....	88
4.1 Untersuchung der Expression und Regulation verschiedener microRNAs.....	89
4.2 Zelluläre Expression und Lokalisation von microRNA-124a und -134.....	93

4.3 <i>In vivo</i> Modulation von microRNA-124a als Therapieoption zur Behandlung inflammatorischer Schmerzen	97
4.4 microRNA-124a Targets als therapeutische Zielstrukturen.....	100
4.5 Modulation von microRNAs als pharmakologische Therapieoption bei Schmerzen	105
5. Zusammenfassung	109
6. Ausblick	110
7. Verzeichnisse	112
7.1 Literaturverzeichnis	112
7.2 Abbildungsverzeichnis	133
7.3 Tabellenverzeichnis.....	134
7.4 Abkürzungsverzeichnis.....	135
8. Anhang	139
8.1 microRNA Microarray-Tabelle	
8.2 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	
8.3 Eidesstattliche Erklärung.....	

1. Einleitung

1.1 microRNAs als neue Zielstrukturen für die Schmerztherapie

microRNAs (miRNA, miR) beeinflussen als nicht-kodierende RNA-Moleküle entscheidend die Genexpression und greifen über den Mechanismus der RNA-Interferenz annähernd in jeden physiologischen und pathophysiologischen Prozess des Organismus ein (He/Hannon 2004). Experimentelle und bioinformatische Analysen weisen darauf hin, dass etwa 20-30 % des menschlichen Genoms durch die Aktivität von microRNAs reguliert werden (Lewis et al. 2005; Xie et al. 2005). Aufgrund der Regulation zahlreicher Zielgene können microRNAs daher nicht nur als Ausgangspunkt pathophysiologischer Mechanismen angesehen werden, sondern gelangen auch zunehmend als diagnostische Marker und innovative therapeutische Zielstrukturen in den Fokus der Wissenschaft. Insbesondere auf dem Gebiet der Krebsforschung und bei kardiovaskulären Erkrankungen konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl zell-inhärente als auch im Blut zirkulierende microRNAs eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Prozessen spielen. So können fehlregulierte microRNAs entweder als Tumor-Suppressoren (z.B. let-7 oder miR-34a) oder als Onkogene (z.B. miR-21,-155 oder -214) Einfluss auf die Tumorprogression nehmen (Esquela-Kerscher/Slack 2006; Garzon et al. 2010). Bei kardialer Fibrose und Herzinsuffizienz wird microRNA-21 in Fibroblasten vermehrt exprimiert und trägt so u.a. zur Fibrosebildung des Herzens bei. Dies geht mit der Entwicklung kardialer Dysfunktion einher; ein Prozess, der durch die Applikation von spezifischen microRNA-21-Inhibitoren verbessert werden kann (Thum et al. 2008). In einem Modell des zerebralen Infarktes lagen ZNS-spezifische microRNAs (z.B. miR-124a) im Blutplasma in erhöhter Konzentration vor und könnten daher als diagnostische Biomarker herangezogen werden (Weng et al. 2011). microRNAs als Targetstrukturen bzw. der Einsatz von microRNA-Modulatoren zur Regulierung bereits veränderter Proteinnetze erscheint als molekulare Therapiestrategie sinnvoll. Bisher konnten über 800 microRNAs in Säugetierzellen nachgewiesen werden, deren Molekülstruktur zwischen den unterschiedlichsten Spezies zum Teil stark konserviert ist (Ambros 2004; Bentwich et al. 2005). Entscheidend ist hierbei, dass jede microRNA mit unterschiedlichen mRNAs interagieren und umgekehrt jede einzelne mRNA von diversen microRNAs reguliert werden

kann (Friedman et al. 2009; Krek et al. 2005). In mehreren Schmerz-relevanten Studien konnte gezeigt werden, dass die ursprünglich exogenen, microRNA-ähnlichen siRNAs einen therapeutischen Ansatz für die Schmerztherapie darstellen (Tan et al. 2009). Aufgrund ihrer Schlüsselrolle als Feinregulatoren der Genexpression erscheint eine Funktion von microRNAs bei der Schmerzwahrnehmung und Chronifizierung daher äußerst wahrscheinlich. Im Rahmen von entzündlichen und neuropathischen Schmerzprozessen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wurden bereits differenziell regulierte microRNAs beschrieben (Aldrich et al. 2009; Bai et al. 2007; Hebert/De Strooper 2009; Recchiuti et al. 2011; Zhao et al. 2010). Spezifische microRNA-mRNA-Interaktionen könnten demzufolge einen vielversprechenden Ansatz für eine gezielte Modulation verschiedenster Schmerzmechanismen bieten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die Rolle einzelner microRNAs bei entzündlichen Schmerzen untersucht, um zu prüfen, ob sich microRNAs bzw. deren Ziel-mRNAs als potenzielle molekulare Targetstrukturen neuer antiphlogistischer und antinozizeptiver Therapeutika eignen.

1.2 Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentstehung

Schmerz wird von der *International Association for the Study of Pain* (IASP) als „ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ definiert (Vgl. <http://www.iasp-pain.org>). Insbesondere die Perzeption des physiologisch bedeutsamen akuten Schmerzes, als körpereigene Sinnesmodalität, übernimmt eine überlebensnotwendige Warnfunktion für unseren Organismus. Im Gegensatz dazu können persistierende Schmerzen zu pathophysiologischen Adaptationen des peripheren und zentralen Nervensystems und bei unzureichender Behandlung, zu einem eigenständigen Krankheitsbild führen (Mutschler et al. 2008). Laut der „Deutschen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes e.V.“ und der „Deutschen Schmerzgesellschaft e.V.“ leidet jeder dritte Erwachsene, also ca. 17 % der deutschen Bevölkerung, unter nicht-tumorbedingten chronischen Schmerzen, die bei den Betroffenen oftmals mit Beeinträchtigungen eines geregelten Alltags verbunden sind und zu psychosozialen Störungen (u.a. soziale Isolation, Depression, erhöhte Suizidgefahr) führen können (Vgl.

<http://www.dgss.org>). Die Behandlung chronischer Schmerzen ist zudem meist unzureichend und die Kosten belaufen sich hierfür in Deutschland jährlich auf rund 25 Milliarden Euro. Sie sind somit teurer als die Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und Krebs. Obwohl sich vor allem chronische Entzündungsschmerzen mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) und bei stärkeren Schmerzen, mit Opioiden gut behandeln lassen, ist ihr Einsatz aufgrund von Nebenwirkungen bei einer Langzeittherapie prekär (Lüllmann et al. 2006) und ihre Wirkung oftmals nicht zufriedenstellend. Allerdings sind bei dieser Indikation derzeit kaum Alternativen zu den klassischen Schmerzmitteln vorhanden, sodass die Entdeckung neuer antiphlogistischer und antinozizeptiver Targetstrukturen von besonderer Relevanz ist. Auch eine angemessene Behandlung neuropathischer Schmerzen stellt gegenwärtig immer noch eine große Hürde dar und ist bei vielen Patienten zumeist unzureichend (Dworkin et al. 2007). Mehrere Anhaltspunkte weisen darauf hin, dass die differenzielle Expression Schmerz-relevanter Gene im Nervensystem essenziell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen ist. Um gezielte, spezifische und damit effizientere Therapiealternativen für chronische Schmerzen zu entwickeln, die von therapeutischem und wirtschaftlichem Vorteil wären, ist die Aufklärung molekularer Mechanismen der Schmerzverarbeitung und insbesondere der Schmerzsensibilisierung von hohem medizinischem Bedarf und wissenschaftlichem Interesse.

1.2.1 Schmerzformen

Dauer, Lokalisation und Ursprung sowie die zugrunde liegende Pathophysiologie werden für die Klassifizierung von akuten und chronischen Schmerzen herangezogen. Ätiologisch lassen sich so der physiologische Nozizeptorschmerz (Akutschmerz), der pathophysiologische Nozizeptorschmerz (z.B. der entzündliche Schmerz) und der neuropathische Schmerz voneinander unterscheiden (Cervero/Laird 1991). Gewebeschädigende Reize auf gesundes Gewebe lösen einen akuten, sogenannten physiologischen Nozizeptorschmerz aus, der nach Beendigung des Reizes schnell abklingt. Dieser Akutschmerz hat eine wichtige Warn- und Schutzfunktion, indem er eine unmittelbare Reflexreaktion auslöst und so gefährliche Gewebeschädigungen verhindert oder eine Schonung verletzter Areale bewirkt. Davon

unterscheiden sich chronische Schmerzen, die auch nach Entfernung des nozizeptiven Reizes bestehen und einer pharmakologischen Behandlung bedürfen. Dabei werden der pathophysiologische Nozizeptorschmerz, der bei Gewebeschädigung oder Entzündung des umliegenden Gewebes entsteht, und der neuropathische Schmerz, bei dem Nerven selbst geschädigt sind, differenziert. Beim pathophysiologischen Nozizeptorschmerz kommt es zu peripheren und zentralen Sensibilisierungen des nozizeptiven Systems, wodurch eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit gegenüber nozizeptiven (Hyperalgesie) und z.T. auch nicht-nozizeptiven Reizen (Allodynie) entsteht. Neuropathische Schmerzen dagegen entstehen durch Schädigung oder Dysfunktionen neuronaler Zellen und führen zu substantiellen, strukturellen und funktionalen Modifikationen im somatosensorischen Nervensystem, die u.a. Sensibilisierungsreaktionen sowie die Entstehung ektopischer Entladungen der Primärafferenzen bewirken (Baron et al. 2010).

1.2.2 Das nozizeptive System

Die Auslösung, sensorische Aufnahme im peripheren Gewebe und die zentrale Verarbeitung von Schmerzimpulsen wird als Nozizeption bezeichnet. Verschiedene Reizmodalitäten können die polymodalen, hochschwelligigen und bipolaren Schmerzrezeptoren, die Nozizeptoren, erregen. Diese freien Nervenendigungen der primär afferenten Neurone wandeln mechanische, chemische oder thermische Schmerzreize in Form von Aktionspotenzialen in ein elektrisches Signal um (Messlinger 1997 & 2002). Erregte A δ - und C-Fasern, deren Somata in den Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRGs) lokalisiert sind, übertragen diese peripheren Schmerzreize in den Laminae I, II und IV des Dorsalhorns synaptisch auf nozizeptive Rückenmarksneurone (Basbaum et al. 2009); (siehe Abb. 1). Zudem unterscheiden sich die Nozizeptoren hinsichtlich der Leitungsgeschwindigkeit, die vom Durchmesser und vom Umfang der Myelinisierung abhängt. Die nicht myelinisierten peptidergen und nicht-peptidergen C-Fasern haben einen kleinen Durchmesser und leiten mit einer Geschwindigkeit von 0,5 - 2 m/s, wohingegen die dünn myelinisierten A δ -Fasern einen mittleren Durchmesser aufweisen und Schmerzreize mit einer Geschwindigkeit von 5-30 m/s weiterleiten. Von den Nozizeptoren zu unterscheiden sind die myelinisierten A α - und A β -Fasern, die durch physiologische, niederschwellige, nicht-noxische Berührungen erregt

werden und für die Propriozeption verantwortlich sind (Julius/Basbaum 2001). Im Dorsalhorn vermitteln exzitatorische Transmitter (z.B. Glutamat) und Neuropeptide (z.B. BDNF, CGRP, Substanz P) die synaptische Schmerzübertragung auf ein zweites Rückenmarksneuron. Insbesondere Glutamat aktiviert in den oberflächlichen Laminae I und II des Dorsalorns postsynaptische AMPA-, NMDA- und metabotrope Glutamatrezeptoren der Projektionsneurone. Diese ascendieren kontralateral als Tractus spinothalamicus in Trigemuskern des Zwischenhirns und in verschiedene Gehirnregionen (D'Mello/Dickenson 2008); (siehe Abb. 1). Im primären und sekundären somatosensorischen Cortex wird schließlich eine bewusste Schmerzwahrnehmung erzeugt, der durch die Integration des limbischen Systems eine affektive Komponente beigemessen wird (Schmidt/Lang 2007). Aus dem Hirnstamm deszendierende Bahnen und Interneurone können die Schmerzverarbeitung im Sinne eines endogenen antinozizeptiven Systems zusätzlich modulieren (Trepel 2008). Neurotransmitter, Neuropeptide und andere Mediatoren alterieren dabei nicht nur die synaptische Transmission nozizeptiver Reize im Rückenmark, sondern regulieren auch Mechanismen der peripheren und zentralen Sensibilisierung (Schmidt/Lang 2007).

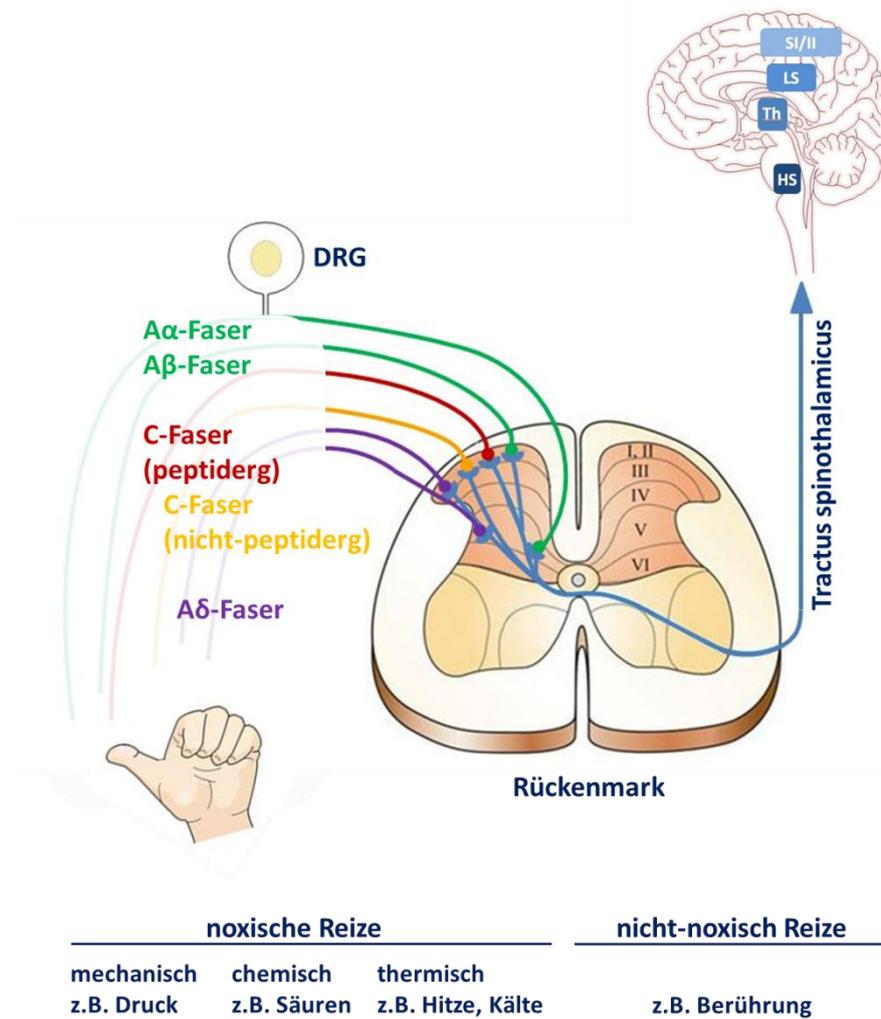


Abbildung 1: Das nozizeptive System. Bei Überschreitung des „Schwellenwertes“ wird der noxische Stimulus von den peripheren Nervenendigungen aufgenommen, in Form eines Aktionspotenzials über das Spinalganglion (DRG) dem Rückenmark zugeleitet und im Dorsalhorn synaptisch übertragen. Von dort wird der Schmerzreiz über den Hirnstamm (HS) und den Thalamus (Th) über das limbische System (LS) in den somatosensorischen Cortex I und II (SI/II) geleitet. Die Abbildung ist modifiziert nach Kuner 2010 & Schmidtke et al. 2009.

1.2.3 Periphere und zentrale Sensibilisierung

Bei chronischen Schmerzen kann es im entzündeten Gewebe (periphere Sensibilisierung), sowie im Rückenmark und Gehirn (zentrale Sensibilisierung) zu Sensibilisierungen des nozizeptiven Systems kommen (Woolf 2004). Langfristig führen solche Veränderungen zu einer Verstärkung des Schmerzes, die sich beim pathophysiologischen Nozizeptorschmerz in Form von Hyperalgesie und Allodynie, bzw. beim neuropathischen Schmerz zusätzlich über u.a. ektopische Entladungen, darstellen können.

Bei der peripheren Sensibilisierung werden infolge der Gewebeschädigung proinflammatorische Entzündungs- und Schmerzmediatoren vermehrt produziert und aus Nozizeptoren und Immunzellen, u.a. aus Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten, freigesetzt. Diese sind entweder bereits im Gewebe vorhanden oder infiltrieren aus dem Blutplasma in das verletzte Gewebe. Durch die Freisetzung von ATP und Protonen aus dem geschädigten Gewebe werden der membranständige Purinrezeptor P2X₃ bzw. der „transient receptor potential vanilloid 1“-Rezeptor TRPV1 aktiviert. Dies führt zu einem Calciumeinstrom in den Nozizeptor, wodurch dessen Depolarisation verursacht und die Entstehung eines Aktionspotentials eingeleitet werden (Basbaum et al. 2009). Ionenkanäle wie die TRP-Kanäle sind ausschlaggebend für die Umwandlung schmerzhafter Reize in elektrische Signale (Caterina et al. 1999; Clapham 2003). Darüber hinaus werden proinflammatorische Mediatoren in das umliegende Gewebe freigesetzt. Zu diesen gehören Peptide (Substanz P, CGRP, Bradykinin, Histamin, Serotonin), Eicosanoide und ihnen verwandte Lipide (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, Endocannabinoide), Neurotrophine (NGF, BDNF), Zytokine (TNF- α , IL-1- β) und Chemokine (CXC- und CC-Motif Chemokine); (Jung et al. 2004; Kang et al. 2010; McMahon 1997; White et al. 2005); (siehe Abb. 2). Vasodilatation und Plasmaextravasation begleiten die neurogene Inflammation, wodurch die entzündungsrelevanten Symptome Dolor (Schmerz), Rubor (Rötung), Calor (Wärme) und Tumor (Schwellung) generiert werden. Diese Symptome bewirken zudem eine gestörte Funktion des betroffenen Organs (*functio laesa*). Nozizeptoren tragen in ihren Endigungen für die Entzündungsmediatoren spezifische Rezeptoren und Ionenkanäle, die bei Aktivierung über bspw. „second messenger“ die Neusynthese und Freisetzung weiterer inflammatorischer und nozizeptiver Mediatoren induzieren und so zur peripheren Sensibilisierung beitragen. Häufig kommt es dabei zu einer Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren. So aktivieren Prostaglandine bspw. PKA-Kinasen, Bradykinin und Histamin dagegen Kinasen der PKC-Familie (Stucky et al. 2009; Yao et al. 2011; Yoshida et al. 2011). Infolge der Sensibilisierung entzündlich-stimulierter Nozizeptoren, bspw. durch die Phosphorylierung von cytosolischen Serin- oder Threonin-Resten der TRP-Kanäle, wird die Erregungsschwelle der Membran herabgesetzt und Aktionspotenziale folglich schneller generiert (Immke/Gavva 2006; Stucky et al. 2009; Szallasi et al. 2007; Venkatachalam/Montell 2007). Darüber hinaus werden stumme Nozizeptoren rekrutiert, die sich durch eine extrem hohe Erregungsschwelle auszeichnen und erst nach erfolgter

Sensibilisierung für mechanische und thermische Reize empfänglich sind (Dubin/Patapoutian 2010). Die genannten Sensibilisierungsmechanismen zeigen sich in einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit gegenüber nozizeptiven (Hyperalgesie) und z.T. auch nicht-nozizeptiven Reizen (Allodynie). Aufgrund der fortdauernden Reizung peripherer Nozizeptoren kommt es am Ursprungsort der Entzündung zu einer primären, bei Ausbreitung auf das umliegende Gewebe und dessen Überempfindlichkeit zu einer sekundären Hyperalgesie (Mutschler et al. 2008). Desweiteren können Nozizeptoren Spontanaktivität entwickeln und so Ruheschmerzen auslösen. Außerdem ist die Rekrutierung stummer Nozizeptoren möglich, wodurch der schmerzhafteste Input ins Rückenmark verstärkt wird. Bei neuropathischen Schmerzen kann es im Zuge peripherer Sensibilisierungen zur Bildung ektopischer Aktionspotenziale und zu Entladungen verletzter oder dysfunktionaler Nervenfasern kommen (von Hehn et al. 2012).

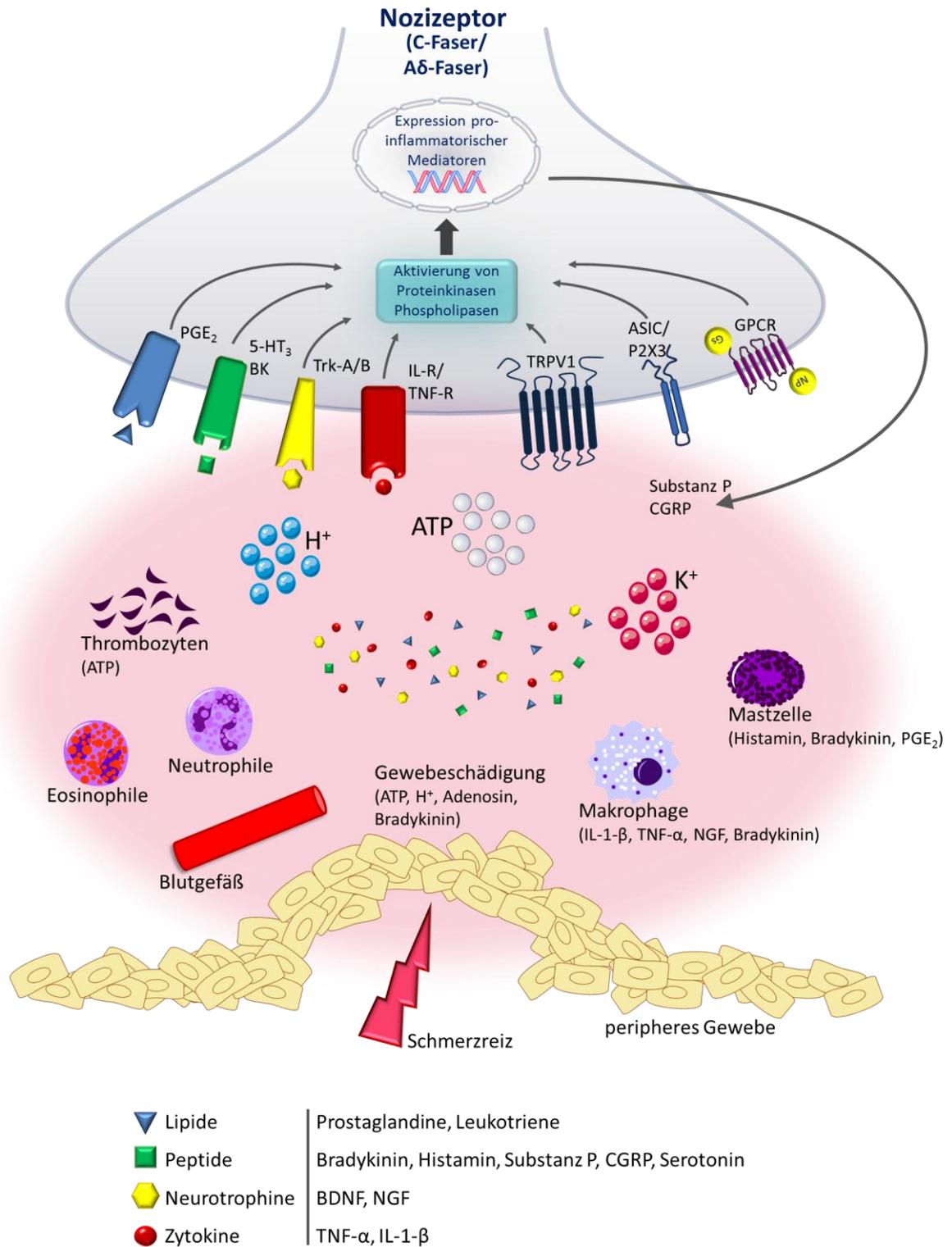


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der peripheren Sensibilisierung. Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren aus dem geschädigten Gewebe und aus infiltrierten Immunzellen, wodurch ein pro-nozizeptives, entzündliches Milieu um den Nozizeptor herum entsteht. Die Abbildung ist modifiziert nach Basbaum et al. 2009, Denk/McMahon 2012 & Julius/Basbaum 2001.

Im Rückenmark und Gehirn kommt es im Rahmen der zentralen Sensibilisierung zu einer gesteigerten neuronalen Aktivität sowie zu Modifikationen Schmerz- und Entzündungs-

relevanter Gene und Proteine, die Mechanismen der Nozizeption im ZNS verstärken (Kuner 2010). Durch Prozesse der primären und sekundären Hyperalgesie wird das rezeptive Feld eines Rückenmarksneurons vergrößert und dessen Empfindlichkeit erhöht. Während der frühen Phase der zentralen Sensibilisierung werden periphere Schmerzreize im Dorsalhorn des Rückenmarks vorwiegend über die Freisetzung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat synaptisch auf Projektionsneurone übertragen, wodurch verschiedene Rezeptoren an der Postsynapse aktiviert werden (siehe Abb. 3). Bei schwacher Reizung aktiviert Glutamat ausschließlich AMPA-Rezeptoren, sodass postsynaptisch eine kurzzeitige Depolarisation hervorgerufen wird. Bei anhaltender Stimulation und stärkeren, noxischen Reizen werden an der vordepolarisierten Membran zusätzlich NMDA-Rezeptoren aktiviert. In diesem Fall werden durch die kurzzeitige und schwache Depolarisation der AMPA-Rezeptoren gebundene Magnesiumionen im NMDA-Rezeptor freigesetzt und die NMDA-Rezeptorblockade aufgehoben. Infolgedessen können Kationen durch diesen unspezifischen Kanal in das Neuron einströmen und das Membranpotenzial positivieren. Zudem bindet Glutamat an metabotrope Glutamatrezeptoren, wodurch G_s -Protein-gekoppelte Signalkaskaden aktiviert werden und so zur Entstehung neuroplastischer Adaptationen beitragen. Erregende Neuropeptide (BDNF, Substanz P, CGRP) verstärken die Glutamat-Wirkung, wohingegen hemmende Transmitter (GABA, Glycin) und Neuropeptide (endogene Opiode, in Abb. 3 abgekürzt mit EO) sowie aminerge Transmitter (Serotonin) die synaptische Übertragung elektrophysiologisch modulieren. Die frühe Phase der zentralen Sensibilisierung wird in erster Linie über post-translationale Modifikationen bestehender Ionenkanäle und Rezeptoren reguliert. In der späten Phase der zentralen Sensibilisierung führt insbesondere der erhöhte postsynaptische Calciumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren zur Aktivierung zahlreicher Proteinkinasen (PKA, PKC, CaMKII, MAPK, PI3K) und Phospholipasen (PLA₂, PLC β , PLC γ), die über intrazelluläre Signalkaskaden die Expression pro-inflammatorischer Gene (COX-2, NK1-R, TrkB-R, c-Fos) bzw. die Freisetzung entzündlicher Mediatoren (NO, PGE₂, TNF- α , Bradykinin, NGF, IL-1- β) regulieren (Abkürzungen siehe Abb. 3 und Anhang 7.4). Durch die Stimulation der PKA, PKC und CaMKII werden zudem verschiedene Targets, u.a. die NMDA-Rezeptoren, phosphoryliert und so deren Sensitivität erhöht (Jones/Sorkin 2005; Woolf 2004). Neben den genannten exzitatorischen Sensibilisierungsmechanismen kann jedoch auch der Verlust inhibitorischer Interneurone oder die Interaktion von Neuronen mit Gliazellen zu einem gesteigerten Schmerzempfinden führen. Vor allem Mikroglia können

über die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine die Genexpression in spinalen Neuronen und Gliazellen regulieren und auf diesem Weg die Schmerzweiterleitung im Dorsalhorn des Rückenmarks modulieren (Jin et al. 2003; Milligan/Watkins 2009; Woolf 2004).

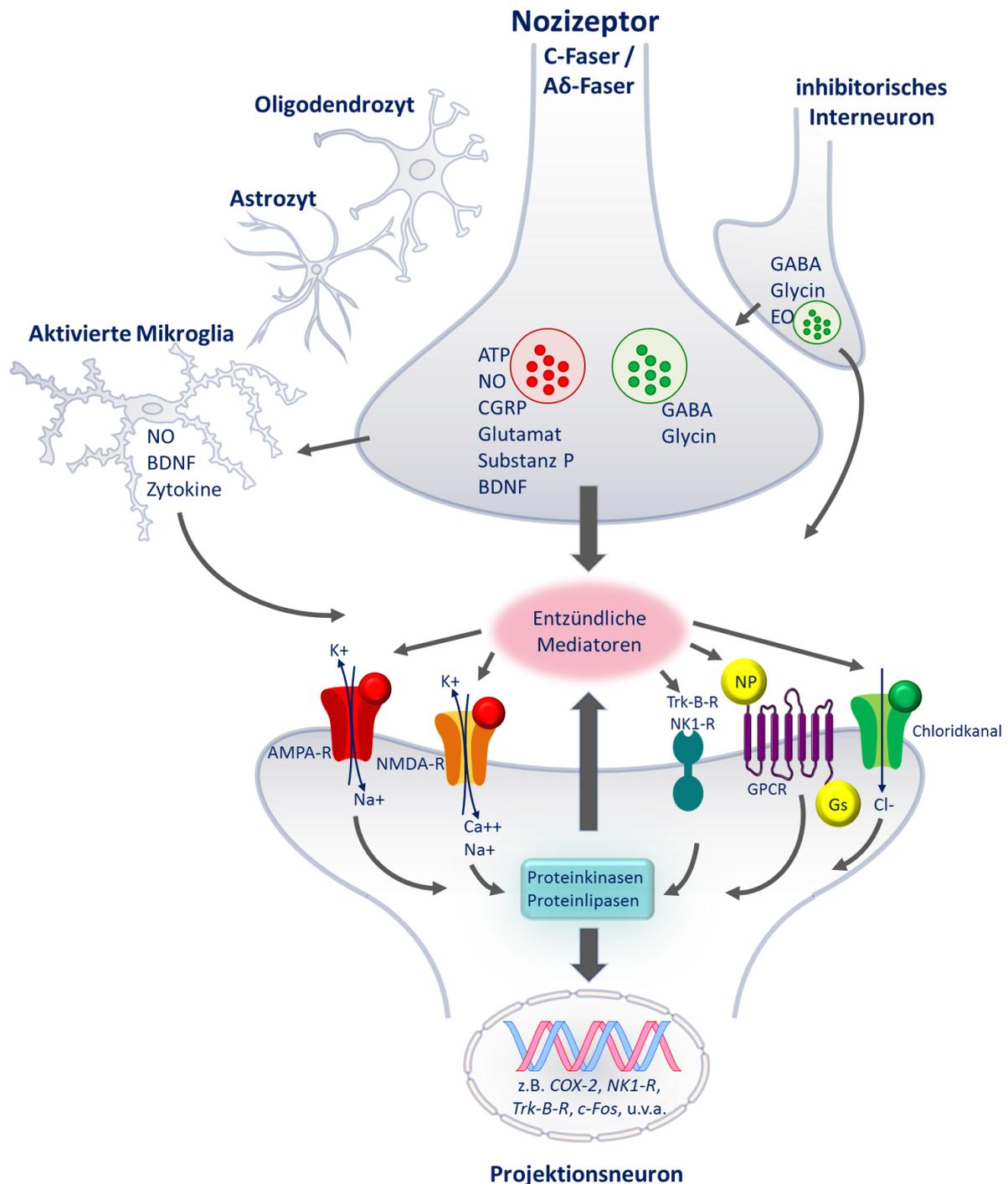


Abbildung 3: Zentrale Sensibilisierung; synaptische Übertragung im Dorsalhorn des Rückenmarks. Die Postsynapse erhält exzitatorischen Input über die nozizeptiven C- und Aδ-Fasern. Gliazellen und inhibitorische Interneurone modifizieren die Erregungsweiterleitung zusätzlich. Je nach Reizmodalität bzw. -intensität werden in der Postsynapse des Projektionsneuron erregende AMPA-, NMDA- sowie metabotrope Glutamat- und Neuropeptidrezeptoren oder inhibitorische GABA-/Glycin- und Opioidrezeptoren aktiviert. Die Abbildung ist modifiziert nach Schmidt/Lang 2007. NP: Neuropeptid, EO: endogene Opiode, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor [weitere Abkürzungen siehe Anhang 7.4]

1.3 Biosynthese von microRNAs und Erkennung von microRNA-Targets

microRNAs sind eine Klasse nicht-kodierender 19-25 Nukleotid langer RNA-Moleküle, die über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) post-transkriptionell in die Regulation der Proteinexpression eingreifen, indem sie den Abbau der Ziel-mRNA oder eine Inhibierung der Translation induzieren (Bartel 2004). Im Gegensatz zu den exogenen siRNAs werden microRNAs entweder als eigenständige Gene kodiert oder aus Introns gespleißt und durch Polymerase-Aktivität transkribiert (Kim et al. 2009). Die lang-kettigen Primärtranskripte (pri-miRNAs, pri-miRs) werden im Zellkern von der Endoribonuklease „Drosha“ in circa 70 Nukleotid-lange Vorläufermoleküle (pre-miRNAs, pre-miRs) prozessiert (Gregory et al. 2004), die dann über das nukleäre Rezeptortransportprotein 5 (Exportin 5) in das Zytoplasma exportiert werden (Yi et al. 2003). Dort erfolgt eine weitere RNase-III-abhängige endonukleolytische Prozessierung durch „Dicer“. Die reife doppelsträngige 19-25 Nukleotid lange microRNA bindet an einen RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC), in dem Proteine der AGO-Familie schließlich die Translation gebundener Target-mRNAs verhindern (Filipowicz et al. 2008). Generell fungiert der Einzelstrang, der am 5'-Ende eine geringere thermodynamische Stabilität aufweist, als Sequenz-spezifischer und funktional-aktiver microRNA-Leitstrang (Kim et al. 2009). Die Bindung der microRNA an ihre Ziel-mRNA kann entweder zum Abbau der mRNA oder zu deren Translationsrepression führen (Kong et al. 2008). Dabei kann eine einzige microRNA die Translation hunderter Gene gleichzeitig kontrollieren und so die Feinregulation der Proteinexpression beeinflussen (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008). Der Umfang der Komplementarität des microRNA-mRNA-Duplex ist darüber hinaus für die Art der Ziel-mRNA Repression entscheidend. Durchgängig komplementäre microRNAs binden für gewöhnlich im offenen Leserahmen (ORF) und induzieren den Abbau der Ziel-mRNA, wohingegen partiell komplementäre microRNAs in der 3'-UTR (3'-untranslated-region) der Ziel-mRNA binden und eine Hemmung der Translation bewirken (Preall/Sontheimer 2005); (siehe Abb. 4).

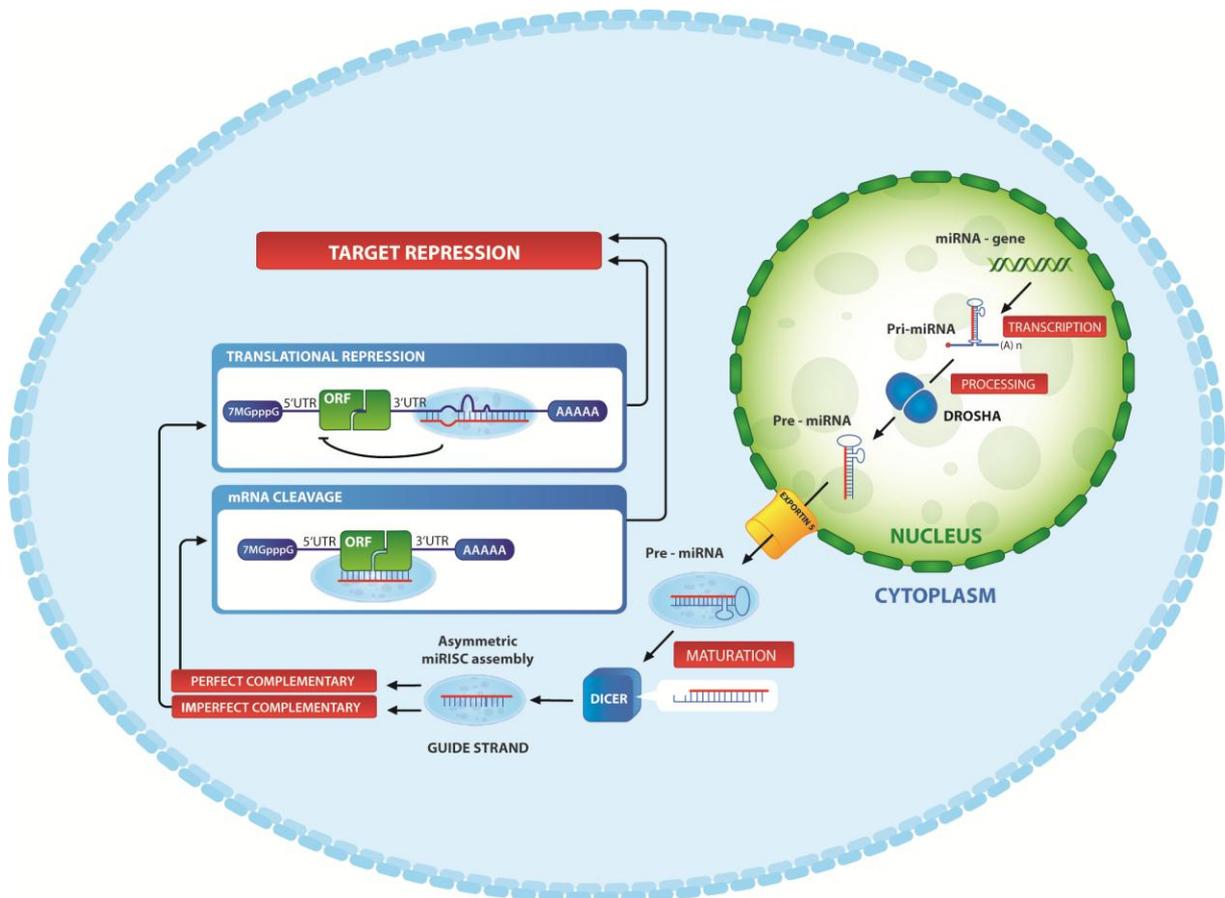


Abbildung 4: microRNA Prozessierung. microRNAs werden im Genom kodiert. Das Primärtranskript wird durch die Endonuklease Drosha in die pre-miRNA prozessiert und über Exportin 5 in das Zytoplasma transloziert. Dort erfolgt eine weitere Prozessierung in reife doppelsträngige microRNA-Duplexe, die durch die Aktivität des RISC in Sequenz-spezifische Einzelstränge gespalten werden und an Ziel-mRNAs binden. Bei vollständiger Komplementarität bindet die microRNA innerhalb des offenen Leserahmens und induziert den Abbau der Ziel-mRNA. microRNAs, die nur teilweise komplementär zur Ziel-mRNA sind, binden in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) und bewirken eine Inhibierung der Translation der entsprechenden Ziel-mRNAs. Bildquelle: Niederberger et al. 2011.

Eine hochkonservierte sogenannte microRNA-„seed“-Region am 5'-Ende der microRNA (6mer, Nukleotide 2-7) ist für die Target-Repression von ausschlaggebender Funktion (siehe Abb. 5). Dabei ist die perfekte Komplementarität zwischen mRNA und der „seed“-Region für die translationale Repression der Ziel-mRNA essenziell (Lewis et al. 2003). Die erweiterte Bindung „seed“-benachbarter Adenosin- bzw. Uracil-Nukleotide sowie der Nukleotide 13-16 in der 3'-Region stabilisiert den Doppelstrang zusätzlich (Grimson et al. 2007; Lewis et al. 2005) und steigert die Effektivität der microRNA-induzierten Protein-Repression (Baek et al. 2008). Die Bindung zwischen microRNA und Ziel-mRNA an der zentralen Stelle des Duplex verhindert eine endonukleolytische Spaltung und führt so zur translationalen Repression der Ziel-mRNA. Ferner wird die Effizienz der microRNA-Ziel-mRNA-Interaktion durch AU-reiche Sequenzen innerhalb der 3'-UTR erhöht. Dementsprechend sind microRNA-Bindestellen in der Nähe des Poly(A)-Schwanzes der 3'-UTR für microRNA-mRNA-Interaktion und schließlich

für die Target-Repression im miRISC von Vorteil. Eine gesteigerte Inhibierung kann durch die Funktion einer einzelnen, oder durch die kooperative Bindung verschiedener microRNAs an ein und dasselbe Transkript erzielt werden (Brennecke et al. 2005; Grimson et al. 2007; Lewis et al. 2005). Allerdings gibt es bereits experimentelle Beispiele, die aufzeigen, dass nicht alle microRNA-mRNA-Interaktionen den genannten Charakteristika notwendigerweise unterliegen und so können funktionale Interaktionen bestehen, die keine durchgängige Komplementarität innerhalb der „seed“-Region aufweisen (Vella et al. 2004).

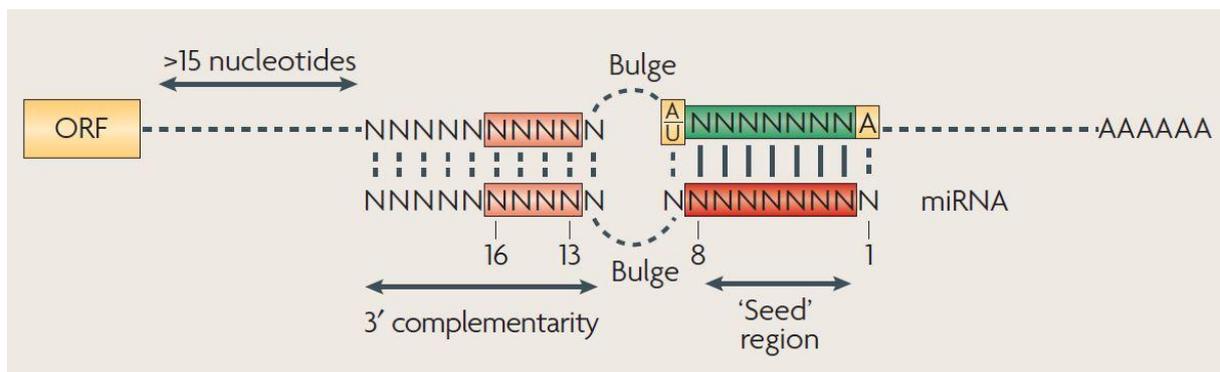


Abbildung 5: Prinzipien der microRNA-mRNA Interaktionen. Die „seed“-Übereinstimmung ist für die Interaktion von microRNA (rot) und mRNA (grün) erforderlich. Obwohl keine unbedingte Watson-Crick-Paarung notwendig ist, stabilisieren die Adenosin- und Uracilnucleotide neben der „seed“-Region das microRNA-mRNA-Duplex. Die Blasenbildung an zentraler Position verhindert die Argonaute-induzierte endonukleolytische Spaltung des Duplex. Die Komplementarität der Nucleotide 13-16 erhöht die Stabilität der Interaktion zusätzlich. Bildquelle: Filipowicz et al. 2008.

Die genannten Bindungseigenschaften von microRNA und Ziel-mRNA können für die computerbasierte Vorhersage potenzieller microRNA-mRNA-Interaktionen genutzt werden. Zur Analyse der vielfältigen Interaktionen von microRNA und mRNA stehen verschiedene bioinformatischen Quellen im Internet zur Verfügung, die anhand der Sequenzeigenschaften Algorithmen zur Target-Identifizierung von microRNAs definieren (siehe Tab. 1). Neben den klassischen Interaktionscharakteristika, die bislang häufig zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen (Baek et al. 2008; Selbach et al. 2008), werden z.T. weitere Kriterien, wie bspw. die Konservierung der 3'-UTR, berücksichtigt. Dabei werden 3'-UTRs, die einer Regulation durch microRNAs unterliegen, evolutionär stärker konserviert als solche, die nicht von microRNAs kontrolliert werden (Friedman et al. 2009). Neben der computerbasierten Vorgehensweise konnte 2009 auch eine erste genomweite, experimentelle Methode die Erkennung von microRNA-Zielstrukturen konkretisieren (Chi et al. 2009). Dabei werden funktionale miRISC-Komplexe durch die Argonaute-gekoppelte Immunpräzipitation isoliert. Die Aufreinigung der Protein-gebundenen microRNA-mRNA-

Komplexe erlaubt nach erfolgter Sequenzierung die Identifizierung interagierender microRNAs und ihrer Ziel-mRNAs (HITS-CLIP Methode); (Chi et al. 2009). Dennoch ist die genaue Interaktion von microRNA und mRNA noch lange nicht detailliert geklärt und es ist davon auszugehen, dass auch in Zukunft neue Methoden und Erkenntnisse die Interpretation computerbasierter Vorhersagen zunehmend präzisieren und das Verständnis der microRNA-induzierten Translationskontrolle erweitern werden.

Tabelle 1: Bioinformatische Datenbanken, die Informationen über microRNA-Sequenzen, potenzielle microRNA-Targets und über genetische Variationen der microRNA-Gene liefern. Die Tabelle ist modifiziert nach Mu/Zhang 2012.

<u>Informationsgehalt</u>	<u>Bioinformatische Datenbank</u>
<u>microRNA-Sequenz</u>	miRBase Ensemble UCSC genome browser
<u>microRNA-Targets</u>	MicroCosm TargetScan PicTar ExprTarget miRDB microRNA.org TarBase miRecords
<u>microRNA-Genvariationen</u>	miRvar

1.4 Die Funktion von microRNAs

microRNAs konnten bereits mit den unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Embryonale Stammzellen verfügen über eine eindeutige microRNA-Signatur, die für die Differenzierung und Erhaltung dieser Zellen unabdingbar ist. In adulten somatischen Stammzellen regulieren microRNAs ferner Prozesse der Hämatopoese, Myo-, Neuro- und Osteogenese sowie die Entwicklung der Haut (Gangaraju/Lin 2009) und beeinflussen zudem Mechanismen der Proliferation und Apoptose, der Zell-Kommunikation und der neuronalen Plastizität (Ambros 2004). Allerdings sind microRNAs auch an der Entstehung maligner Tumorerkrankungen (Esquela-

Kerscher/Slack 2006) sowie an neurodegenerativen und neuropsychiatrischen Prozessen beteiligt (Junn/Mouradian 2012; Xu et al. 2012). Des Weiteren spielen microRNAs eine Rolle bei viralen Infektionen wie z.B. Hepatitis und HIV (Sullivan/Ganem 2005) und bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Alevizos/Illei 2010).

1.4.1 microRNAs im Nervensystem

Im Nervensystem sind microRNAs an umfassenden Prozessen der Entwicklung und Differenzierung beteiligt, die einer funktionalen Ausbildung neuronaler Netzwerke, synaptischer Plastizität und einer Aktivitäts-abhängigen Regulation zugrunde liegen (Kosik 2006). Damit übereinstimmend führt eine vollständige Deletion von Dicer in Mäusen zu embryonaler Lethalität (Bernstein et al. 2003). Insbesondere die Expression ZNS- und entwicklungspezifischer microRNAs (let-7, miR-124a, -125 und -128) führt zur Differenzierung neuronaler Stammzellen in ausgereifte Nervenzellen (Bak et al. 2008; Kawahara et al. 2012). Anhand von konditionellen Knockout-Studien ist zudem gezeigt worden, dass die Prozessierung von microRNAs durch Dicer auch für die Entwicklung und Migration von Gliazellen und Neuronen entscheidend ist (De Pietri Tonelli et al. 2008; Kawase-Koga et al. 2009; Zheng et al. 2010). Der konditionelle Knockout von Dicer in exzitatorischen Neuronen des Cortex und Hippocampus resultiert in einer reduzierten Ausbildung dendritischer Verzweigungen und aufgrund einer vermehrten, frühen postnatalen Zellapoptose in einer ausgeprägten Mikrozephalie (Davis et al. 2008). Während microRNAs bereits als universelle Regulatoren der neuronalen Entwicklung und Differenzierung anerkannt sind, ist ihre Funktion und Regulation in ausgereiften Neuronen weitestgehend unbekannt. Eine Ablation von Dicer in post-mitotischen Purkinjezellen des Kleinhirns führt zur neuronalen Degeneration und Ataxie (Schaefer et al. 2007). Folglich wurde eine veränderte microRNA Expression bereits sowohl mit mehreren neurologischen Entwicklungsstörungen, wie z.B. Down-Syndrom (miR-99a), Fragiles-X-Syndrom (miR-124a, -132), Rett-Syndrom (miR-132) und Autismus (miR-134) als auch mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Tourettesyndrom oder Parkinson (miR-9, -29a/b, -124a, -125b, miR-133b) in Verbindung gebracht (Hebert/De Strooper 2009; Kosik 2006; Xu et al. 2012). Die quantitative Detektion von microRNAs im Liquor könnte daher als indikativer Biomarker

für neuropsychiatrische und –degenerative Erkrankungen dienen (Gallego et al. 2012). In dopaminergen Neuronen des Striatums, das grundlegend für die Ausführung motivierter Verhaltensweisen ist (Drago et al. 1994), resultiert ein konditioneller Knockout von Dicer nicht in neuronaler Apoptose, sondern in ausgeprägten motivationsbedingten Verhaltensdefiziten, die mit einem körperlichen Verfall einhergehen (Cuellar et al. 2008). Ein konditioneller Dicer-Knockout in post-mitotischen Neuronen des Vorderhirns führt dagegen zu einer gesteigerten Lern- und Gedächtnisleistung, was vermutlich mit einer vermehrten und unkontrollierten Expression Plastizitäts-abhängiger Gene, wie z.B. BDNF, zusammenhängt. Demnach könnten microRNAs auch an Prozessen synaptischer Plastizität beteiligt sein (Konopka et al. 2010). Diese Annahme wird zusätzlich von Ergebnissen gestützt, die zeigen, dass microRNAs z.T. erst in den terminalen Synapsen prozessiert werden und auf diese Weise die Translation von Ziel-mRNAs lokal und Aktivitäts-abhängig kontrollieren können (Smalheiser/Lugli 2009).

1.4.2 microRNAs in der Schmerzentstehung

Neuronale Adaptationen und Sensibilisierungsprozesse sind maßgeblich an der Ausbildung klinisch bedeutsamer, pathophysiologischer Nozizeptor- und neuropathischer Schmerzen beteiligt, die unter Umständen einen chronischen Verlauf nehmen können. Diesen Mechanismen liegen Änderungen in der Proteinexpression und -aktivität zugrunde, die gleichermaßen Transmitter, Ionenkanäle, Signalmoleküle und strukturelle Proteine betreffen können (Ji et al. 2003). Da microRNAs als Feinregulatoren der Genexpression fungieren, sind sie aller Wahrscheinlichkeit nach auch an der Entstehung pathophysiologischer Adaptationsmechanismen beteiligt. Erste Studien, die die Regulation und Funktion von microRNAs in verschiedenen pathophysiologischen Schmerzmodellen untersuchten, unterstützen diese Hypothese. So konnte bspw. gezeigt werden, dass microRNAs zur Toleranzentwicklung gegenüber Morphin beitragen. Eine dauerhafte Behandlung mit Morphin induziert die Expression von let-7, was zu einer verringerten Expression von μ -Opioidrezeptoren und schließlich zur Ausbildung einer Opioidtoleranz führt. Durch Hemmung von let-7f konnte diese Entwicklung zumindest teilweise unterdrückt werden (He et al. 2010).

1.4.3 microRNAs bei der inflammatorischen Hyperalgesie

Im Rahmen entzündungsbedingter Sensibilisierungsprozesse arbeiten das periphere und zentrale Nervensystem sowie das angeborene Immunsystem über hormonale und neuronale Bahnen koordiniert zusammen, um Entzündungsgeschehen im Gewebe und in den somatosensorischen Organen entgegenzuwirken und schließlich die Homöostase wiederherzustellen (Sternberg 2006). In diesem Zusammenhang konnte in einem Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induzierten inflammatorischen Muskelschmerz-Modell eine signifikante und differenzielle Repression spezifischer neuronaler microRNAs (miR-10a, -29a, -98, -99a, -124a, -134 und -183) in ipsilateralen trigeminalen Ganglien gemessen werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Abnahme der microRNAs eine vermehrte Expression Schmerz-relevanter Proteine und damit die Entwicklung entzündlicher Prozesse ermöglicht (Bai et al. 2007). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass sowohl die CFA-induzierte chronische Entzündung als auch die akute nozizeptive Stimulation der Hinterpfote mit Capsaicin eine Stimulus-abhängige, differenzielle Expression von microRNAs (miR-1, -16 und -206) in Spinalganglien und im Dorsalhorn des Rückenmarks bewirken (Kusuda et al. 2011). Die Carrageenan-induzierte faziale Inflammation ruft eine differenzielle Expression verschiedener microRNAs (miR-155, -223) im präfrontalen Cortex hervor. Die vermehrte Expression von microRNA-155 resultiert über die Repression von c/ebp Beta in einer gesteigerten Expression des pro-inflammatorisch wirksamen Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (GCSF); (Poh et al. 2011). Demgegenüber führt die Antagonisierung von microRNA-155 zur Derepression von c/ebp Beta und inhibiert die Aktivierung des GCSF *in vitro* und *in vivo* (Worm et al. 2009). In einer funktionellen Studie führt die konditionelle Deletion von Dicer in postmitotischen Na_v1.8-Nozizeptoren der Spinalganglien, die essenziell an der Transduktion inflammatorischer Schmerzen beteiligt sind, zur Hemmung von mehr als 60 microRNAs (Zhao et al. 2010). Obwohl davon auszugehen war, dass dies zur Hochregulation der microRNA-Zielgene führte, wurden überraschenderweise Schmerz-relevante Transkripte, darunter CamKII und Na_v1.8, inhibiert, was jedoch mit einem verringerten nozizeptiven Verhalten in unterschiedlichen Entzündungsmodellen übereinstimmte (Formalin-Test, Carrageenan- und CFA-induzierte Pfotenentzündung). Dieses Ergebnis konnte u.a. auf eine verringerte Anzahl c-FOS-positiver Neurone im Rückenmark und damit auf eine reduzierte Schmerztransmission ins zentrale

Nervensystem sowie auf eine verminderte Erregbarkeit von Dicer-defizienten $\text{Na}_v1.8$ -Neuronen zurückgeführt werden. Die $\text{A}\delta$ - und C-Faser-bedingte Schmerztransmission der physiologisch bedeutenden, akuten Nozizeption sowie das Schmerzverhalten SNL-induzierter Neuropathie, bei der $\text{Na}_v1.8$ -Neurone nur eine untergeordnete Rolle spielen (Abrahamsen et al. 2008), werden durch die Deletion von Dicer nicht beeinflusst.

1.4.4 microRNAs bei neuropathischen Schmerzen

Auch bei neuropathischen Schmerzen kommt es zu zahlreichen Veränderungen der Genexpression, die durch microRNAs reguliert werden könnten. In diesem Zusammenhang konnte in einigen Neuropathie-Modellen bereits eine veränderte und differenzielle Expression von microRNAs nachgewiesen werden. Bei einer Rückenmarksverletzung (spinal cord injury, SCI) werden innerhalb einer Woche verschiedene microRNAs (u.a. miR-99a, -124a, -219, -221 und -1) im Rückenmark als unmittelbare Reaktion des Organismus auf die Verletzung unterschiedlich exprimiert, deren Zielgene Prozesse der Inflammation, Oxidation und Apoptose regulieren. microRNAs, die nach SCI induziert werden (miR-221 und -1) regulieren anti-inflammatorische und anti-apoptotische Proteine, wohingegen inhibierte microRNAs (miR-99a, -124a und -219) Einfluss auf pro-inflammatorische und apoptotische Prozesse nehmen (Liu et al. 2009). In einer weiteren Studie konnte neben der Repression von microRNA-124a eine Induktion von microRNA-223 im Rückenmark nach SCI gemessen werden (Nakanishi et al. 2009). Diese microRNA reguliert in myeloiden Zellen die Granulozyten-Produktion und könnte somit als Marker infiltrierender Immunzellen und schließlich der unmittelbaren Immunreaktion dienen (Johnnidis et al. 2008). Eine Induktion von microRNA-223 wurde auch im präfrontalen Cortex nach entzündlicher Stimulation detektiert (Poh et al. 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass microRNAs bei Rückenmarksverletzungen auch in Regionen rostral und caudal zur Läsion differenziell reguliert werden und mit einer gestörten Expression prä-neuronaler Marker korrelieren, was zu einem Verlust neuronaler Identität führt und die funktionale Regeneration durch eine reduzierte spinale Plastizität beeinträchtigt (Strickland et al. 2011a). Interessanterweise werden microRNAs nach chronischer Konstriktion der Ischiasnerven im Rückenmark kaum reguliert und scheinen daher nicht zur spinalen Plastizität als zentralem Bestandteil

chronischer Schmerzen beizutragen (Brandenburger et al. 2012). In einem peripheren, chronischen Neuropathie-Modell induziert die Ligatur der Spinalnerven (SNL) eine Repression des miR-183-Clusters (miR-92, -182 und -183) in DRGs, welches spezifisch für sensorische Organe ist. Die Inhibierung dieses miR-183-Clusters führt zur Ausbildung mechanischer Hyperalgesie (Aldrich et al. 2009), die mit einer Verschiebung von Stress-Granula assoziierten microRNAs in die peripheren Endigungen von DRG-Neuronen einhergeht. Da eine selektive Repression von microRNA-183 auch bei inflammatorischen Muskelschmerzen beschrieben worden ist (Bai et al. 2007), scheint das microRNA-183-Cluster grundsätzlich an der Funktion und Regulation nozizeptiver und mechanosensitiver Primärafferenzen beteiligt zu sein. Dementsprechend zeigten bioinformatische Analysen verschiedene Schmerz-relevante microRNA-183 Targets, u.a. Natriumkanäle, Neurotrophine, Kinasen und Neuropeptide (Aldrich et al. 2009). Im SNL-Modell wurde auch die Regulation des Natriumkanals *Scn11A*, des Calciumkanals *Cacna2d1* und des purinergen Rezeptors *P2rx4* in DRGs durch verschiedene microRNAs beobachtet (von Schack et al. 2011). Eine Transsektion des Ischiasnerven induziert ferner die Expression von microRNA-21, die über die Repression von Sprouty2 das Wachstum von Axonen fördert (Strickland et al. 2011b). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass microRNAs essenzielle Modulatoren der Regeneration und funktionalen Wiederherstellung von Neuronen darstellen (Wu et al. 2012). Die Deletion von Dicer in Schwann-Zellen arretiert deren Differenzierung (Bremer et al. 2010) und löst durch die Modulation Myelin-verwandter Gene eine Hypomyelinisierung aus (Pereira et al. 2010). In diesen Prozess scheinen microRNA-34 und -140 durch die transkriptionelle Repression proliferativer, remyelinisierender Gene essenziell einzugreifen (Viader et al. 2011). Mutationen im Myelin- und ihm verwandten Genen, insbesondere PMP22 und MPZ, sind ursächlich für erblich bedingte, periphere motor-sensorische Neuropathien (De Jonghe et al. 1999). microRNAs tragen daher entscheidend zur koordinierten neuronalen Kontrolle des Bewegungsapparates und dessen Gesundheit bei. Als essenzielle Modulatoren chronischer Neuropathie greifen microRNAs grundlegend in physiologische und pathophysiologische Prozesse sensorischer Neuronen ein und steuern so verschiedene Reaktionen des Organismus auf periphere und zentrale Nervenläsion und deren Dysfunktion.

1.4.5 microRNAs bei schmerzhaften Erkrankungen

Änderungen der microRNA Expression konnten bei chronisch-entzündlichen Krankheiten des rheumatischen Formenkreises, wie z.B. rheumatoider Arthritis (RA), Osteoarthritis (OA), Systemischem Lupus erythematoses (SLE) und Sjögren Syndrom nachgewiesen werden (Alevizos/Illei 2010; Furer et al. 2010). Mit Ausnahme von OA, die durch Verletzung, Verschleiß oder Dysplasie des Gelenkknorpels entsteht (Rössler/Rüther 2007), liegt diesen Krankheiten eine autoimmun bedingte Fehlsteuerung des Immunsystems zugrunde. Diese Dysfunktion kann bei chronischer Inflammation zu irreversiblen Organschäden führen und einen systemischen Verlauf annehmen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass bei rheumatoider Arthritis verschiedene microRNAs in Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten differenziell exprimiert (miR-124a, -346) (Alsaleh et al. 2009; Nakamachi et al. 2009) bzw. durch pro-inflammatorische Zytokine induziert (miR-146) (Nakasa et al. 2008) werden. Des Weiteren konnte im Blut von RA-Patienten eine vermehrte Expression einiger microRNAs (miR-146, -155, -16) gemessen werden (Pauley et al. 2008). Auch bei der degenerativen Arthritis (OA) wird die Expression von microRNA-146 im Knorpel induziert und korreliert invers mit dem Gehalt des destruktiv wirkenden MMP-13 (Yamasaki et al. 2009). Eine differenzielle Regulation von microRNAs konnte außerdem im Blut und in der Niere von SLE-Patienten (Dai et al. 2007 & 2009) sowie im Speichel von Patienten mit Sjögren Syndrom nachgewiesen werden (Alevizos et al. 2011). Auch die chronisch-entzündlichen Hautirritationen Psoriasis und Neurodermitis werden mit Veränderungen der microRNAs (z.B. miR-203) assoziiert, die in die Regulation inflammatorischer Prozesse, bspw. in den Mechanismus der Zytokin-vermittelten Signaltransduktion eingreifen (Sonkoly et al. 2007). Bei Patienten mit interstitieller Zystitis, einer transmuralen chronischen Blasenentzündung unklarer Ätiologie, konnte ferner nachgewiesen werden, dass microRNAs eine pro-nozizeptive Genexpression induzieren (Sanchez Freire et al. 2010). Aufgrund der gezeigten Ergebnisse kann gefolgert werden, dass microRNAs als potenzielle therapeutische Biologicals in Frage kommen könnten, um vor allem anhaltende Schmerzen zu behandeln. Aufgrund der dargestellten Erkenntnisse eignen sich microRNAs vermutlich als Biomarker für die Diagnose und Prognose sowie zur Feststellung der Ausprägung und zur Einstufung des Schweregrades einer Erkrankung.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Obwohl zahlreiche Analgetika auf dem Markt sind, ist insbesondere die Behandlung chronischer Schmerzen bei vielen Patienten häufig unzureichend und mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden. Die Entwicklung neuer, sicherer und effizienter Therapien ist daher nach wie vor von großer Bedeutung. Für die Entdeckung bisher unbekannter, zellulärer und therapeutischer Angriffspunkte ist die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen chronischer Schmerzen, vor allem die differenzielle Genexpression bei Sensibilisierungsvorgängen, unbedingt erforderlich. microRNAs greifen in die Genregulation ein und kontrollieren so nicht nur physiologische, sondern auch pathophysiologische Mechanismen und scheinen auch an der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen beteiligt zu sein. Bislang liegen allerdings nur wenige publizierte Daten über die funktionelle Rolle spezifischer microRNAs vor. In der vorliegenden Arbeit richtet sich der Forschungsschwerpunkt auf die Funktion von microRNAs bei der Perzeption und Verarbeitung entzündlicher und neuropathischer Schmerzreize. Unter Einsatz quantitativer RT-PCR- und Microarray-Analysen sowie mittels *in situ* Hybridisierungen soll die Expression, Regulation und Lokalisation Schmerz-relevanter microRNAs in verschiedenen Tiermodellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach nozizeptiver Stimulation in den Spinalganglien und im Rückenmark von Wildtyp-Mäusen untersucht werden. Aufgrund der hier gewonnen Erkenntnisse werden in einem zweiten Schritt besonders interessante microRNAs hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz im Detail bewertet. Hierzu sollen vor allem microRNA-Inhibitoren und Mimics eingesetzt werden, deren Funktionalität zunächst in Zellkulturexperimenten *in vitro* überprüft werden. Die anschließende *in vivo* Applikation der microRNA-Modulatoren in Mäusen und die nachfolgende Analyse der microRNA-Modulatoren im Entzündungsmodell kann gegebenenfalls wichtige Hinweise auf eine mögliche microRNA-vermittelte Modulation des nozizeptiven Verhaltens liefern. Mit Hilfe von Datenbankanalysen können microRNA-Targets identifiziert werden, die für das microRNA-induzierte Schmerzverhalten verantwortlich sein könnten. In Spinalganglien und Rückenmarksproben der behandelten Tiere sollen schließlich die potenziellen microRNA-Targets hinsichtlich ihrer Expression und Aktivität validiert und ihre Relevanz bewertet werden. Ziel dieser Arbeit ist es zu verdeutlichen, welche microRNAs bei pathophysiologischen oder neuropathischen Schmerzen reguliert werden und ob die

Modulation der microRNA Konzentration Einfluss auf das Schmerzgeschehen nehmen kann. Auf diese Weise können erste Hinweise gesammelt werden, ob diese microRNAs oder ihre Targets bei den unterschiedlichen Schmerzmodalitäten als mögliche therapeutische Zielstrukturen geeignet sind.

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.1.1 Versuchstiere

Für *in vivo* Untersuchungen wurden männliche C57BL/6 Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) im Alter von 6-8 Wochen oder trächtige C57BL/6 Mäuse (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 24 ± 0.5 °C; Hell-/Dunkelzyklus 6/18 Uhr) und erhielten Trockenfutter und Wasser ad libitum. Alle Tierexperimente der vorliegenden Arbeit wurden nach den europäischen Tierschutz-Richtlinien durchgeführt und von der zuständigen Tierethikkommission (Regierungspräsidium Darmstadt, Gen.Nr.F143/52) genehmigt. Verhaltensstudien wurden in einem Raum mit eingeschränktem Geräuschpegel und verringerter Aktivität von einem für die Applikation von microRNA-Testsubstanzen verblindeten Beobachter durchgeführt.

2.1.2 Nozizeptive Tiermodelle

Die IASP definiert „Schmerz“ als ein Gefühlserlebnis, das nicht objektiv beschrieben, sondern lediglich subjektiv erfahren und erlebt werden kann. Auch im Tiermodell können „Schmerzen“ daher nur indirekt anhand definierter Verhaltensänderungen erfasst werden. Die Ausprägung der Verhaltensveränderung (z.B. Lecken, Schütteln, Beißen oder Zurückziehen der Pfote) wird hierbei als Maß für die Nozizeption, also des „Schmerzempfindens“ herangezogen. In dieser Arbeit wurden zwei Modelle zur Untersuchung von entzündlichen Schmerzen (Formalin-Test, Zymosan-induzierte Pfotenentzündung) sowie ein Modell zur Erforschung von neuropathischen Schmerzen (Spared Nerve Injury-Modell; SNI) herangezogen.

2.1.2.1 Formalin-Test

Der von Dubuisson und Dennis (1977) etablierte Formalin-Test dient der Untersuchung von Entzündungsschmerzen. Die subkutane Applikation von Formalin, einer verdünnten Formaldehyd-Lösung, in die Dorsalseite der Hinterpfote löst dabei ein spontanes, biphasisches Schmerzverhalten in Form von Lecken, Beißen oder Schütteln der Pfote aus, das in zwei Phasen unterteilt werden kann (Hunskar et al. 1985). Unmittelbar nach Injektion des Formalins tritt eine Phase des akuten Schmerzes ein (Phase 1). Dieser ist auf eine durch die Formalin-Injektion direkte, u.a. TRPV1-vermittelte, Aktivierung peripherer Nozizeptoren, vor allem der A δ -Fasern, zurückzuführen (Hunskar/Hole 1987). Nach einer kurzen Ruhephase ohne ein erkennbares Schmerzverhalten, folgt die tonische Phase 2. Zusätzlich zur anhaltenden Stimulation peripherer Nozizeptoren, wird die zweite Phase durch eine Entzündung der Pfote ausgelöst, die in der Stimulation der nozizeptiven C-Fasern resultiert. Das Formalin aktiviert dabei die TRPA1-Kanäle der Primärafferenzen, wodurch eine Aktivitäts-abhängige Sensibilisierung der Neurone des Dorsalhorns ausgelöst wird (McNamara et al. 2007). Des Weiteren sind u.a. Prostaglandine für zentrale Sensibilisierungen während der Phase 2 von Bedeutung (Coderre et al. 1990; Tjølsen et al. 1992). Durch eine gezielte Inhibierung der Phase 1 bzw. der Phase 2 mit verschiedenen Analgetika konnten die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen des biphasischen Schmerzverhaltens näher beschrieben werden. Neben den zentral wirksamen Analgetika kann eine Hemmung des Schmerzverhaltens in Phase 2 außerdem mit nicht-steroidalen Antiphlogistika und Steroiden erzielt werden (Hunskar/Hole 1987). Der Formalin-Test als experimentelles Tiermodell, vor allem das Schmerzverhalten in Phase 2, eignet sich daher zur Untersuchung akuter, inflammatorischer und tonischer Schmerzen.

Versuchsdurchführung: Zur Induktion eines Entzündungsschmerzes wurden 20 μ l einer 5%igen Formaldehyd-Lösung (Formalin, Otto Fischer GmbH & Co. KG) in sterilem PBS (Dulbecco's PBS, PAA Laboratories GmbH) subkutan in die Dorsalseite der Hinterpfote von C57BL/6 Mäusen injiziert. Unmittelbar nach der Formalin-Injektion wurde das nozizeptive Verhalten über einen Gesamtzeitraum von 60 Minuten evaluiert. Das Lecken der Hinterpfote wurde hierbei als Maß der Nozizeption angeführt (Dubuisson/Dennis 1977) und in 5-minütigen Intervallen dokumentiert. Zur graphischen Darstellung wurde die Leckzeit pro

Minute aufgetragen und die Gesamtleckzeit der zwei Phasen statistisch ausgewertet. Neben der Versuchsdurchführung zur Beobachtung des Schmerzverhaltens ist eine 5%ige Formalin-Lösung auch dann subkutan appliziert worden, sofern behandelten Mäusen nach 1, 8, 24 oder 48 Stunden das Lumbalmark und die Spinalganglien exzidiert wurden (siehe Kap. 2.1.3).

2.1.2.2 Zymosan-induzierte Pfotenentzündung

Das Kohlenhydrat Zymosan A, das aus der Zellwand der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wird, löst bei intraplantarer Injektion von 20 µl einer 10 mg/ml Zymosan/PBS-Lösung in die Hinterpfote eine lokale Entzündung und inflammatorische Schmerzen aus. Durch die anhaltende periphere Sensibilisierung kommt es zu einer mechanischen und thermischen Hyperalgesie, welche mittels einer Stimulus-spezifischen Reizung der mit Zymosan A behandelten Hinterpfote gemessen werden kann. Das Ausmaß der Nozizeption wird anhand der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Zymosan-injizierten Pfote auf eine definierte Reizung bewertet. Das Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung wurde erstmals von Meller und Gebhart 1997 beschrieben und wird zur Untersuchung inflammatorischer und tonischer Schmerzen herangezogen, die von Hyperalgesie und Pfotenödem begleitet werden. Das Lumbalmark und die Spinalganglien Zymosan-behandelter Mäuse wurden nach 1, 8, 24 und 48 Stunden entnommen (siehe Kap. 2.1.3).

2.1.2.3 SNI-Modell neuropathischer Schmerzen

Zur Untersuchung neuropathischer Schmerzen wurde das „Spared Nerve Injury“-Modell (SNI-Modell) herangezogen. Bei diesem Modell werden in einem Hinterbein der C57BL/6 Maus zwei Äste des Nervus ischiadicus durchtrennt – der Nervus tibialis und Nervus peroneus communis. Lediglich der dritte Ast, der Nervus suralis, der ein definiertes Dermatom der Pfote innerviert, bleibt intakt. Durch die Beschädigung des Ischiasnerven wird eine lang andauernde Allodynie des entsprechenden Hautareals hervorgerufen. Dieses Modell wurde ursprünglich von Decosterd und Woolf im Jahr 2000 für Ratten entwickelt (Decosterd/Woolf 2000) und in der Folge 2006 nach Bourquin (Bourquin et al. 2006) für die Maus modifiziert. Für den operativen Eingriff wurden die Mäuse zunächst mit einem Isofluran-Carbogen-Gemisch (Abbott GmbH & Co KG / Linde Gas) narkotisiert und der

Ischiasnerv frei präpariert. Die zu durchtrennenden Nervenäste wurden zunächst mit einem Faden abgebunden und schließlich distal zur Ligatur durchtrennt. Zudem wurden Sham-Operationen des Nervus ischiadicus durchgeführt. 1 bzw. 7 Tage nach der Sham- oder SNI-OP wurden die Tiere getötet und das Lumbalmark sowie die Spinalganglien für die weitere Verarbeitung entnommen (siehe Kap. 2.1.3 & 2.3.1).

2.1.3 Gewebeentnahme

Vor der Gewebeentnahme wurden C57BL/6 Mäuse mit Kohlenstoffdioxid getötet und durch kardiale Punktion entblutet. Nach Freilegung der Rippenbögen und des Wirbelkanals wurde dieser lateral entlang der Rippenbögen geöffnet und das Rückenmark kaudal frei präpariert. Der letzte Rippenbogen diente zur Orientierung, um die für die Schmerzverarbeitung relevanten lumbalen Rückenmarkssegmente L4-L6 sowie die entsprechenden dorsalen Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRG) zu identifizieren. Das exzidierte Gewebe wurde unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.1.4 Fixierung des Gewebes

Für die Herstellung von histologischen Gewebspräparaten (siehe Kap. 2.1.5) wurden C57BL/6 Mäuse mit Kohlenstoffdioxid tief narkotisiert und das Herz freigelegt. Um eine adäquate Gewebefixierung zu ermöglichen wurde das Herz-Kreislaufsystem zunächst von Blutrückständen gesäubert. Dazu wurde die Herzspitze der Maus punktiert und der Kreislauf mit einer sterilen 0,9%igen NaCl-Lösung (B. Braun) unter Verwendung einer Schlauchpumpe (neoLab®) gespült. Für die anschließende Gewebefixierung wurde eine 4%ige PFA-Lösung in PBS, pH 7,4, durch den Kreislauf geleitet. Eine schnelle Fixierung bedingt eine Vernetzung der endständigen Aminogruppen und verhindert so die autolytische Zerstörung von Proteinen und RNA, die in den späteren Schnittpräparaten als Antigene für spezifische Antikörper und Sonden fungieren (siehe Kap. 2.4). Auch in diesem Fall wurden die lumbalen Rückenmarkssegmente L4-L6 sowie die entsprechenden DRGs entnommen. Zur

Entwässerung der Zellen wurde das exzidierte Gewebe in einem 10%- und 20%igen Saccharose/PBS-Gradienten für jeweils eine Stunde bei 4°C gelagert. Ein vollständiger Wasserentzug wurde durch die Lagerung in 30 % Saccharose/PBS über Nacht bei 4°C erzielt. Anschließend wurde das dehydrierte Gewebe in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura®) eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Gelagert wurden die Gefrierblöcke bei -80°C.

2.1.5 Anfertigung von Kryoschnitten

Für histologische Nachweisverfahren (siehe Kap. 2.4) wurden 10 µm dicke Gewebeschnitte des Rückenmarks und der DRGs mit dem Kryotom CM 3050 (Leica) hergestellt und auf SUPERFROST® PLUS Poly-L-Lysierte Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -80°C.

2.1.6 Applikation von microRNA-Inhibitoren und microRNA-Mimetika

Um die nozizeptive Relevanz spezifischer microRNAs *in vivo* zu testen wurde C57BL/6 Mäusen entweder 1 mg/kg Körpergewicht miRNA-Inhibitor oder miRNA-Mimetikum intravenös in die Schwanzvene appliziert. Dazu wurden die Oligonukleotide in PBS gelöst und nach Angaben des Herstellers mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) in einem Gesamtvolumen von 150 µl angesetzt.

<u>anti-miR (Exiqon A/S)</u>	<u>Sequenz</u>
negative control A (#)	5'-GTGTAACACGTCTATACGCCCA-3'
hsa-miR-124	5'-GCATTCACCGCGTGCCTTA-3'
<u>miR-mimic (Applied Biosystems®)</u>	<u>Sequenz</u>
mirVana™ miRNA mimic Negative Control #1	n.a.
mirVana™ miRNA mimic hsa-miR-124	n.a. / nach Prozessierung reife miRNA-Sequenz

Dreißig Minuten vor der 5%igen Formalin-Injektion in eine Hinterpfote wurden die microRNA-modifizierenden Oligonukleotide intravenös appliziert. Auf die Weise wurden die Verteilung der microRNA-modifizierenden Oligonukleotide mit dem Blutkreislauf und das

Eintreten der microRNA-Liposomkomplexe über die Blut-Hirn-Schranke und über die Plasmamembran von Zellen ermöglicht. Das Schmerzverhalten wurde wie in Abschnitt 2.1.2.1 beschrieben anhand des Formalin-Tests dokumentiert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Für *in vitro* Untersuchungen wurden humane Cervixadenokarzinomzellen (HeLa) von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Kultiviert wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium (Gibco®), das bereits mit verschiedenen Aminosäuren und Vitaminen sowie Glucose, HEPES und L-Glutamin angereichert ist. Supplementiert wurde das RPMI 1640 außerdem mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin.

<u>Kultivierungsmedium</u>	RPMI 1640 (Gibco®, Invitrogen™)
2 g/l	Glucose (high glucose)
25 mM	HEPES
1 %	200 mM L-Glutamin
10 %	fötales Kälberserum (FCS, Gibco®, Invitrogen™)
100 U/ml	Penicillin (PAA Laboratories GmbH)
100 U/ml	Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)

Kryokonservierte HeLa-Zellen wurden im 37°C Wasserbad zügig aufgetaut, unmittelbar in RPMI 1640 Medium (Gibco®, Invitrogen™) aufgenommen und 3 Minuten bei 1.200 rpm (Eppendorf® Zentrifuge 5804 R) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und zum Anwachsen in eine 175 cm² Zellkulturflasche (Greiner Bio-One GmbH) überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (HERAcell240, Heraeus) bei 37°C und 5 % CO₂. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die adhärennten HeLa-Zellen mit PBS gespült und vom Boden der Kulturflasche mit Trypsin (TrypLE™ Express, Gibco®) abgelöst. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Reaktion mit RPMI 1640 abgestoppt und die Zellsuspension pelletiert. Die HeLa-Zellen wurden in einer 175 cm² Zellkulturflasche (Greiner Bio-One GmbH) 1:10 mit

frischem Medium passagiert und für die Transfektion von microRNA-interferierenden Oligonukleotiden (2.3.7.12) in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro 2 ml RPMI 1640 Medium (Gibco®) in 6-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät.

Für die Lagerung wurden 5×10^6 HeLa-Zellen in Cryo.s™ Einfrierröhrchen (Greiner, Bio-One GmbH) überführt und pelletiert (3 min, 1.200 rpm, Eppendorf® Zentrifuge 5417 R). Das Zellpellet wurde in RPMI 1640, supplementiert mit 5 % (v/v) DMSO resuspendiert, schrittweise (-20°C, -80°C, -196°C) eingefroren und im Stickstofftank aufbewahrt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2 Primärkulturen

2.2.2.1 Neuronenkultur

DRGs adulter C57BL/6 Mäuse wurden für die Generierung primärer Neuronenkulturen verwendet. Dazu wurden die Mäuse mit Kohlenstoffdioxid getötet und alle DRGs frei präpariert und entnommen. Die exzidierten DRGs wurden in eiskaltes HBSS, supplementiert mit CaCl₂ und MgCl₂ (Hank`s Balanced Salt Solution, Gibco®), überführt. Anschließend wurde das Nervengewebe 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ mit einem sterilen Mix aus 5 mg/ml Collagenase (Type: CLS IV, Biochrome AG) und 1 mg/ml Dispase® (Gibco®) in HBSS aufgelockert. Um die Enzymreaktion abzustoppen, wurden die DRGs zwei Mal mit DMEM-Medium gewaschen und mit einer 1 ml Pipette mechanisch homogenisiert.

<u>Waschmedium</u>		DMEM 11960 (Gibco®, Invitrogen™)
	10 %	fötale Kälberserum (FCS, Gibco®, Invitrogen™)
	100 U/ml	Penicillin (PAA Laboratories GmbH)
	100 U/ml	Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)

Um eine reine DRG-Neuronenkultur zu erhalten, wurde die Zellsuspension durch einen 15 % fettfreien BSA-Filter (MP Biomedicals, LLC) in PBS zentrifugiert (10 min, RT, 1000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5810R). Die Neuronen wurden in NEUROBASAL™-Medium (Gibco®), supplementiert mit 2 % B-27 (Gibco®), 0,1 % NGF (100 µg/ml, Millipore™) und 1 % 200 mM L-Glutamin (Gibco®), resuspendiert und auf 12-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH), die mit

0,01 % Poly-L-Lysin und 1 % Laminin (Becton Dickinson) beschichtet worden waren, ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Neurone wurden anschließend mit einem Zytokinmix aus TNF- α , IL-1- β und LPS stimuliert.

<u>Kultivierungsmedium</u>		NEUROBASAL™-Medium (Gibco®, Invitrogen™)
	10 %	fötales Kälberserum (FCS, Gibco®, Invitrogen™)
	100 U/ml	Penicillin (PAA Laboratories GmbH)
	100 U/ml	Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)

2.2.2.2 Primäre Gliakulturen

Gehirngewebe 15 Tage alter C57BL/6 Föten (E15) (Janvier) wurden für die Gewinnung primärer, embryonaler Mikroglia- und Astrozytenkulturen verwendet. Dazu wurde die trächtige Maus mit Kohlenstoffdioxid getötet und die Embryonen aus dem Uterus entnommen. Die fötalen Gehirnproben wurden in eiskaltes HBSS, supplementiert mit CaCl₂ und MgCl₂ (Hank`s Balanced Salt Solution, Gibco®), überführt und für zwei Stunden in 10 % TrypLE™ Express (Gibco®) in HBSS bei 37°C, 5 % CO₂ dissoziiert. Um die Enzymreaktion abzustoppen wurde das fötale Gehirngewebe 2 Mal mit DMEM 11960 (Gibco®), 10 % FCS (Gibco®), 1 % PenStrep (PAA Laboratories GmbH) gewaschen und währenddessen mechanisch homogenisiert. Die Kultivierung der primären Gliazellen erfolgte mit DMEM 11960 (Gibco®), supplementiert mit 10 % FCS (Gibco®), 1 % PenStrep (PAA Laboratories GmbH) und 1 % 200 mM L-Glutamin (Gibco®). Nach einer Inkubation von 10–14 Tagen wurde die Mischkultur separiert.

<u>Kultivierungsmedium</u>		DMEM 11960 (Gibco®, Invitrogen™)
	1 %	200 mM L-Glutamin (Gibco®, Invitrogen™)
	10 %	fötales Kälberserum (FCS, Gibco®, Invitrogen™)
	100 U/ml	Penicillin (PAA Laboratories GmbH)
	100 U/ml	Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)

Mikrogliakultur: Nach erfolgter Kultivierung wurden die Mikroglia von den Astrozyten unter Verwendung von frischem Kultivierungsmedium mechanisch abgeschüttelt (2 x 30 min bei

RT, 120 rpm, TITRAMAX 100T, Heidolph). Die gewonnene Mikroglia-Reinkultur wurde pelletiert (3 min, 1.200 rpm, Eppendorf® Zentrifuge 5804 R) und in frischem Medium aufgenommen. Zur Überprüfung der Zellviabilität wurden 25 µl der Mikroglia-Suspension 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich®) angefärbt, mikroskopisch überprüft und die Zellzahl bestimmt. Für die Stimulation mit einem Zytokinmix (siehe Kap. 2.2.3) wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen pro 1 ml DMEM 11960 (Gibco®) in eine 12-Well Platte (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Eine Passagierung der Mikroglia-Reinkultur ist nicht möglich, da sich diese Gliazellen ohne Astrozyten kaum kultivieren lassen.

Astrozytenkultur: Nach Separation der Mikroglia wurden die Astrozyten mit frischem Kultivierungsmedium, DMEM 11960 (Gibco®) zur Regeneration für einen Tag bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Zum Vereinzeln der Zellen wurden die Astrozyten von dem Kulturflaschenboden mit TrypLE™ Express (Gibco®) für 5 Minuten bei 37°C, 5 % CO₂ abgelöst und mit frischem Medium vom Boden der Kulturflasche abgespült. Die Zellsuspension wurde pelletiert und die Astrozyten je nach Bedarf in frischem Kultivierungsmedium ausgesät. Für die Stimulation mit einem Zytokinmix wurden die Astrozyten in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro 2 ml Kultivierungsmedium, DMEM 11960 (Gibco®) in 6-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ für 72 Stunden inkubiert. Die Astrozyten wurden für maximal drei Passagen in einem Verhältnis von 1:10 mit frischem Medium passagiert.

2.2.3 Stimulation der Primärzellen

Die Primärzellen wurden mit einem Zytokinmix (Cytokinemix, CM) bestehend aus 5 ng/ml TNF-α (PeproTech®), 1 ng/ml IL-1-β (PeproTech®) und 1 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich®) für verschiedene Zeitperioden – 30 Minuten, 1 und 24 Stunden – inkubiert. Die auf der Poly-L-Lysin-Laminin-Beschichtung angewachsenen und nach einem Tag ausdifferenzierten Neurone wurden 24 Stunden nach Präparation mit dem Zytokinmix, ohne vorangegangenen Mediumwechsel, stimuliert. Bei den Astrozyten wurde zunächst ein Mediumwechsel durchgeführt. Zwei Stunden danach wurden die Astrozyten schließlich mit dem Zytokinmix für die genannten Zeitspannen stimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurden die adhären-

Neurone und Astrozyten mechanisch vom Plattenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde sofort bei 4°C pelletiert (3 min, 1.200 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5415R), die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei -80°C eingefroren. Dort wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Im Gegensatz zu den Neuronen und Astrozyten bleiben Mikroglia in Suspension und lassen sich außerdem ohne Astrozyten nur sehr schwierig kultivieren. Aufgrund dessen wurden die Mikroglia ohne Mediumwechsel unmittelbar nach dem Aussäen mit Zytokinmix stimuliert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Zellsuspension bei 4°C zentrifugiert (3 min, 1.200 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5415R). Das Zellpellet wurde mit gekühltem PBS gewaschen. Die pelletierten Mikroglia wurden ebenfalls bei -80°C eingefroren und dort bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolation

RNA aus HeLa-Zellen, Rückenmarksgewebe und DRGs wurde mit dem *mirVana*[™] miRNA Isolation Kit (Ambion[®]) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Isolation der RNA basiert auf der klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der ein 3-Phasen-System entsteht welches eine Trennung von Proteinen, DNA und RNA erlaubt (Chomczynski/Sacchi 1987 & 2006). Die RNA reichert sich dabei in der wässrigen Oberphase an und kann nach Trennung von den beiden anderen Phasen mit Ethanol gefällt und säulenchromatographisch isoliert werden. Proteine sind hingegen in der unteren organischen Chloroformphase, DNA in der Interphase zu finden.

Die Gewebeproben wurden mit Guanidinisothiocyanat enthaltendem Lysispuffer versetzt, der Proteine denaturiert, RNasen inaktiviert und die RNA damit stabilisiert, und für 4 Minuten bei einer Frequenz von 25/sek. im Mixer Mill 400 (Retsch[®]) homogenisiert. Für die organische Extraktion wurde das Homogenat mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform gemischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm, RT, Eppendorf Zentrifuge 5415D). Die RNA wurde aus der wässrigen Oberphase mit 100%igem

Ethanol gefällt, auf einem Säulenglasfaser-Filter immobilisiert, mehrmals mit den dafür vorgesehenen Puffern gewaschen und schließlich mit einem Puffer niedriger Ionenstärke eluiert. Die Konzentration der RNA wurde, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, bestimmt und die Probe bei -20°C gelagert.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit dem NanaDrop[®]-Spektrometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific GmbH) erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Quantifizierung von Nukleinsäuren beruht dabei auf dem Lambert-Beerschen Gesetz, das berücksichtigt, dass eine absorbierende Substanz die Strahlungsintensität in Abhängigkeit von Schichtdicke und Konzentration abschwächt. Das NanaDrop[®]-Spektrometer bedient sich dabei einem abgewandeltem Extinktionskoeffizienten mit der Einheit ng-cm/ml (Manual zu NanaDrop[®]-Spektrometer). Unter Verwendung dieses Extinktionskoeffizienten ergibt sich folgende Gleichung zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration:

$$c = (A \times e) / b$$

c = Nukleinsäurekonzentration [ng/ μl]
 A = Absorption
 e = Extinktionskoeffizient [ng-cm/ μl]
 b = Weglänge [cm], für Nukleinsäuren und Protein = 1 cm

Eine Absorption von „1“ entspricht dabei 50 ng/ μl doppelsträngiger DNA und 40 ng/ μl einzelsträngiger RNA. Proteine hingegen haben ein Absorptionsmaximum bei A_{280} , sodass die Reinheit der RNA anhand des Quotient A_{260}/A_{280} bewertet werden kann. Ein Wert von 1.8 – 2.1 wird dabei als „reine, proteinfreie RNA“ angenommen (Sambrook/Russell 2000).

2.3.3 Genexpressionsanalyse und Microarrays

microRNA-Microarray: Für die Identifizierung Entzündungs-relevanter microRNAs im Rückenmark wurde ein ‚Agilent Mouse miRNA Microarray Rel12.0‘ extern von DNAVision

(DNAVision SA, Avenue George Lemaitre 25, B-6041 Charleroi, Belgien) durchgeführt, der auf einem Chip die Expression aller bekannter Maus-microRNAs entsprechend der Sanger miRBase Version 12.0 erfasst. RNA aus unbehandeltem Rückenmark sowie aus Rückenmark Formalin- oder Zymosan-behandelter C57BL/6 Mäuse wurde mit dem miRNeasy® Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Für den Microarray wurden 600 ng der so gewonnenen RNA von DNAVision auf die Expression und Stimulus-abhängige Regulation von microRNAs hin untersucht. Anhand des Arrays konnte eine Auswahl eindeutig regulierter microRNAs (siehe Anhang Tab. 2) getroffen werden, die hinsichtlich ihrer Expression, Regulation und Lokalisation untersucht wurden.

RNA-Microarray: Die Analyse der Genexpression im Rückenmark naiver und mit Formalin nozizeptiv stimulierter C57BL/6 Mäuse auf einem Illumina Mouse Sentrix 6 Expression BeadChip durch das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg sollte Aufschluss darüber liefern, welche microRNA Ziel-mRNAs unter entzündlichen Bedingungen signifikant reguliert werden. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy® Lipid Tissue Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Unter Einsatz von insgesamt 2 µg RNA wurde die Expression und Stimulus-abhängige Regulation der mRNA erfasst.

2.3.4 *In silico* Analyse potenzieller microRNA-Ziel-mRNA-Interaktionen

Für die Aufdeckung der molekularen Mechanismen, die den unter Entzündungsbedingungen auftretenden mRNA- bzw. microRNA-Regulationen zugrunde liegen, wurden verschiedene *in silico* Analysen durchgeführt. Dafür wurden Datenbanken, wie z.B. TargetScan, microRNA.org und miRecords, unter Berücksichtigung der beschriebenen Interaktionscharakteristika, bspw. die Komplementarität der „seed“-Region (siehe Kap. 1.3) herangezogen. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden anschließend unter Verwendung der IPA® Ingenuity® Netzwerkanalyse mit bekannten Schmerz-relevanten Molekülen korreliert. Bei IPA® handelt es sich um eine Internet-basierte Software-Funktion, die dabei hilft Microarray-Daten zu analysieren und zusammenzuführen, die Suche nach Zielgenen und –Proteinen erleichtert und die es ermöglicht eigene Daten in „molekulare Netzwerke“ einzuordnen. Anhand der beiden Microarrays und unter Einsatz der *in silico*-Analysen konnten die in dieser Arbeit

vorgelegten, potenziell Schmerz-relevanten microRNAs und deren Ziel-mRNAs identifiziert und detaillierter untersucht werden.

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert auf dem Prinzip der DNA-Replikation und dient der Amplifikation von Nukleinsäuren. Dabei wird die gewonnene RNA bzw. microRNA zunächst revers in cDNA transkribiert und anschließend in den drei sich wiederholenden Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation exponentiell vervielfältigt.

2.3.5.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von microRNAs erfolgte mit Hilfe von sequenzspezifischen TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems™). Dabei handelt es sich um Stem-loop RT-Primer, die an das 3'-Ende reifer, physiologisch aktiver microRNAs binden. Diese werden daraufhin von einer MultiScribe™ Reverse Transcriptase verlängert, wodurch die eigentliche microRNA-Sequenz in cDNA revers transkribiert wird (Chen et al. 2005). Die dazu notwendigen Reaktionsbedingungen wurden unter Verwendung des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) nach Angaben des Herstellers eingestellt.

<u>Reaktionsansatz</u>	1,5 µl	10 x RT Puffer
	0,15 µl	100 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	1 µl	MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)
	0,19 µl	RNase Inhibitor
	3 µl	5 x TaqMan® MicroRNA RT Primer
	5 µl	10 ng RNA
	Ad 15 µl	RNase freies H ₂ O

<u>Reaktionsbedingungen</u>	30 min	16°C
	30 min	42°C
	5 min	85°C
	∞	4°C

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression wurde die gewonnene RNA mit dem Verso™ cDNA Synthese Kit (Thermo Scientific®) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. 200 ng RNA wurden dabei von der Verso™ RNA-abhängigen DNA-Polymerase mit einem Gemisch aus Anchored-Oligo-dT-Primern, die sich an das 5'-Ende des Poly(A)-Schwanzes der mRNA anlagern, und sechs zufällig aneinander gereihten Random Hexamer-Nukleotiden revers transkribiert. Da bei der RNA-Isolation auf einen DNase-Verdau verzichtet wurde, wurden mögliche DNA-Rückstände mittels eines RT-Enhancers während der Transkription degradiert.

<u>Reaktionsansatz</u>	4 µl	5x Synthesis Buffer
	2 µl	5 nM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	0,7 µl	Random Hexamere (400 ng/µl)
	0,3 µl	Anchored Oligo dT (500 ng/µl)
	1 µl	Verso™ Enzymmix
	1 µl	RT Enhancer
	200 ng	RNA
	ad 20 µl	RNase freies H ₂ O

<u>Reaktionsbedingungen</u>	30 min	42°C	cDNA-Synthese
	2 min	95°C	RT Enhancer-Inaktivierung
	∞	4°C	Hold

2.3.5.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die sich an die reverse Transkription von microRNA und mRNA anschließende quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurde mit dem PCR-Cycler ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System) von Applied Biosystems® durchgeführt.

microRNA-Amplifikation: Für die Quantifizierung der revers transkribierten microRNAs wurden TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems®) eingesetzt. Hierbei binden microRNA-spezifische Forward- und Reverse-Primer an die microRNA-Moleküle, die über eine FAM™- markierte TaqMan®-Hydrolysierungssonde detektiert werden (Chen et al. 2005). Für die qRT-PCR von microRNAs wurde der TaqMan®/Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG von Applied Biosystems® verwendet. Die Reaktionsschritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden in 40 Zyklen wiederholt.

<u>Reaktionsansatz</u>	5 µl	TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix
	3,5 µl	RNase freies H ₂ O
	0,5 µl	TaqMan® MicroRNA Assay
	1 µl	RT-Produkt

<u>Reaktionsbedingungen</u>	10 min	95°C	AmpliTaq Gold® Enzymaktivierung
	15 sek.	95°C	Denaturierung
	60 sek.	60°C	Annealing / Elongation

TaqMan® MicroRNA Assays

<u>Assay Name</u>	<u>miRBase Accessions</u>	<u>5'-3'-Sequenz; Quelle: miRBase Rel.18</u>
snoRNA-55	AF357318	TGACTTATATATCTGTCAATCCCCTGAGAGATCACTGAC GACTCCATGTGTCTGAGCAA
mmu-miR-9	MIMAT0000142	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
mmu-miR-29a	MIMAT0000535	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
mmu-miR-96	MIMAT0000541	UUUGGCACUAGCACAUUUUUUGCU
mmu-miR-99a	MIMAT0000131	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
mmu-miR-124	MIMAT0000134	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
mmu-miR-132	MIMAT0000144	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
mmu-miR-134	MIMAT0000146	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
mmu-miR-451	MIMAT0001632	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU
mmu-miR-494	MIMAT0003182	CUUUGGUUAUCUAG
mmu-let-7f	MIMAT0000525	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU

mRNA-Amplifikation: Für die Quantifizierung von mRNAs wurden TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems®) verwendet, die aus unmarkierten, Sequenz-spezifischen Primerpaaren und einer fluoreszenzmarkierten TaqMan®-Hydrolysierungssonde bestehen. Die TaqMan®-Hydrolysierungssonde trägt am 5'-Ende einen FAM™- oder VIC®-markierten Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) sowie einen „minor groove binder“ (MGB), der die Hybridisierung der TaqMan®-Sonde durch Einlagerung in die kleine Furche der DNA stabilisiert. Bei Anlagerung der intakten TaqMan®-Sonde an die DNA unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs. Bei Elongation der DNA wird die TaqMan®-Sonde gespalten und der Reporter freigesetzt. Die

Emission des Reporters nimmt dabei proportional mit der amplifizierten DNA-Menge zu (Holzapfel/Wickert 2007; Livak et al. 1995).

Für die qRT-PCR wurde der FastStart Universal Probe Master (Rox) Mix von Roche unter Einsatz sequenzspezifischer TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems®) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Fast-Real-Time PCR Programm über 40 Amplifikationszyklen.

<u>Reaktionsansatz</u>	5 µl	FastStart Universal Probe Master (Rox)
	3,5 µl	RNase freies H ₂ O
	0,5 µl	TaqMan® Gene Expression Assay
	1 µl	RT-Produkt

<u>Reaktionsbedingungen</u>	10 min	95°C	Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase
	15 sek.	95°C	Denaturierung
	30 sek.	60°C	Annealing / Elongation

TaqMan® Gene Expression Assay & ID

Bdnf	Mm04230607_s1
Hdac5	Mm01246076_m1
IL-1-β	Mm00434228_m1
Mecp2	Mm01193537_g1
Myst2	Mm00624391_m1
Tnf-α	Mm00443258_m1

TaqMan® endogene Kontrolle

eukaryotische 18S rRNA	RefSeq: X03205.1
------------------------	------------------

Genexpressionsprimer

c-FOS Primer (aus Poggi et al. 2003)

Fw	5'-3'	ACCATGATGTTCTCGGGTTTCAA
Rv	5'-3'	GCTGGTGGAGATGGCTGTCAC

COX-2 Primer

Fw	5'-3'	AGACACTCAGGTAGACATGATCTACCCT
Rv	5'-3'	GGCACCAGACCAAAGACTTCC

2.3.6 Auswertung der quantitativen Real-Time-PCR

Mit Hilfe der Real-Time-PCR lässt sich die Amplifikation einer Zielsequenz in Echtzeit verfolgen. Dabei wird eine bestimmte Menge cDNA in die PCR eingesetzt. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die Menge der Zielsequenz bestenfalls mit jedem Zyklus. Man spricht hier von einer optimalen PCR-Effizienz (Effizienz = 2). Steigt die Anzahl der Zielsequenz unentwegt an, hybridisieren die Amplifikate mehr und mehr miteinander und bedingen letztlich die Hemmung der PCR. Man beobachtet in diesem Fall ein konstantes Fluoreszenzsignal (Plateauphase). Der Beginn der exponentiellen Phase wird zur relativen Quantifizierung der PCR-Amplifikate herangezogen. Dabei wird der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Reporters einer jeden Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt als CT-Wert (Threshold Cycle = Schwellenwertzyklus) bezeichnet. Eine Gerade durch die CT-Werte weist dabei auf die gleiche Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben und damit auf die gleiche Menge gegenwärtiger DNA hin. Die relative Genexpression wurde anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ermittelt. Dabei wurde zunächst der CT-Wert eines Zielgens mit einem nicht regulierten Referenzgen (für miRNA: snoRNA55, für mRNA: 18S RNA) abgeglichen, um Schwankungen in der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen (ΔCT). Eine weitere Optimierung der relativen Quantifizierung wurde anschließend durch die Berücksichtigung der PCR-Effizienz der untersuchten Gruppen (Kontrolle vs. behandelte Probe) erzielt ($\Delta\Delta\text{CT}$).

Mathematisch lässt sich die relative Quantifizierung der Genexpression wie folgt darstellen:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}(\text{Zielgen}) - \text{CT}(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{Probe}) - \Delta\text{CT}(\text{Kontrolle})$$

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

Die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ berücksichtigt dabei den relativen Expressionsunterschied eines Zielgens zwischen der behandelten Probe und der Kontrolle (Ratio) – normalisiert zum Referenzgen.

2.3.7 pMIR-REPORT™ Reporter System

2.3.7.1 pMIR-REPORT™ Reporter Vektoren

Zur Untersuchung der Funktionalität der microRNA-interagierenden Oligonukleotide (siehe Kap. 2.1.6) wurde das pMIR-REPORT™-System von Ambion® (Applied Biosystems®) verwendet. Dabei wurde die Sequenz der ausgereiften microRNA in die ‚multiple cloning site‘ (MCS) eines Luziferase-Reporter-Vektors kloniert. Bei Kotransfektion mit microRNA-regulierenden Oligonukleotiden kommt es zur Interaktion, wodurch die Expression der Luziferase beeinflusst wird. Die Luziferase-Aktivität kann so Aufschluss über die microRNA-Aktivität liefern. Das pMIR-REPORT™-System besteht zusätzlich zu dem Luziferase-Reporter-Vektor aus einem β -Gal-Kontroll-Plasmid zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und Zellviabilität.

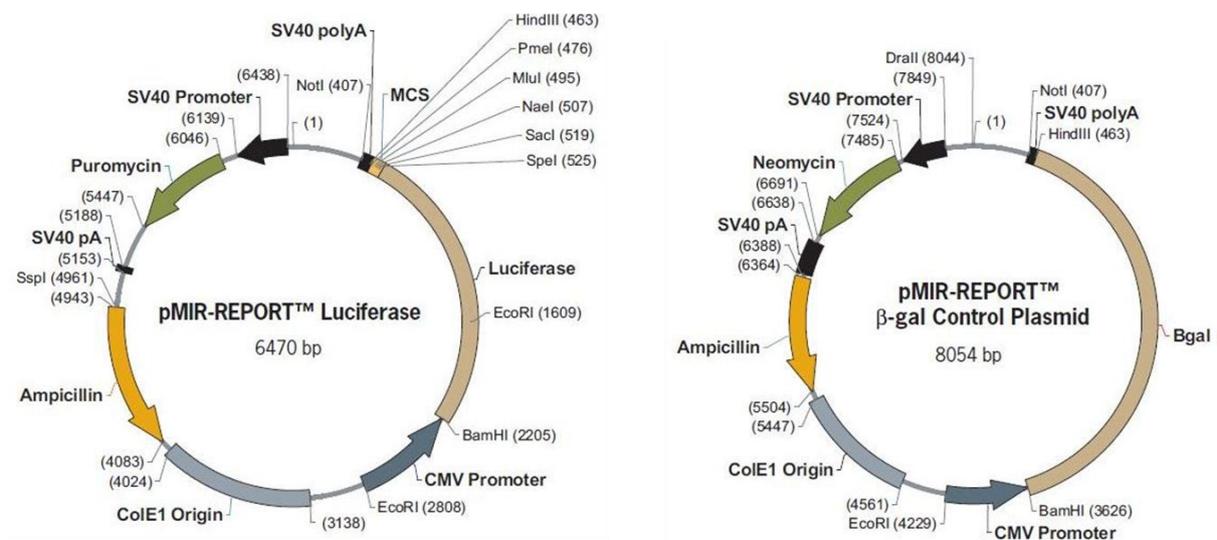


Abbildung 6: pMIR-REPORT™-Luziferase-Vektor und pMIR-REPORT™ β -Gal-Kontroll-Plasmid. Die MCS ist in der 3'-UTR des Luziferasegens lokalisiert. Durch Insertion der microRNA- oder einer Ziel-mRNA-Sequenz in die MCS ist das Luziferasegen einer Regulation durch die jeweilige endogene microRNA, ihrer Inhibitoren oder Vorläufermoleküle unterworfen. Eine Kotransfektion des pMIR-REPORT™ β -Gal-Kontroll-Plasmids dient der Berücksichtigung der Transfektionseffizienz. Abbildung aus: pMIR-REPORT™ System, Manual 5795M Revision D, Revision Date: October 24, 2008, © 2008 Ambion, Inc. All Rights Reserved.

2.3.7.2 Präparative Plasmidisolierung

Aus den pMIR-REPORT™-Luziferase und β -Gal-Kontrollplasmid *E.coli*-Stammkulturen wurden 3 ml LB-Medium (0,1 mg / ml Ampicillin) mit je 50 μ l der Glycerolstocks angeimpft

und für 8 Stunden bei 37°C und 117 rpm (Hilab, GFL-3031) inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann über Nacht in 100 ml LB-Medium bei 37°C und 117 rpm (Hilab, GFL-3031) inkubiert (0,1 mg / ml Ampicillin). Die pMIR-REPORT™-Vektoren wurden aus den pelletierten *E.coli*-Stammkulturen (15 min, 6000 rpm, 4°C, Eppendorf Zentrifuge 5810R) per präparativer Plasmidisolierung mit dem peqGOLD XChange Plasmid Maxi Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH) nach Angaben des Herstellers isoliert. Eine zusätzliche Plasmidaufreinigung wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der in Wasser eluierten DNA wurde wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben bestimmt.

LB-Medium

10 % (w/v) Trypton
5 % (w/v) Hefeextrakt
5 % (w/v) NaCl
pH 7,0
Autoklavieren

2.3.7.3 Annealing der microRNA-124a-Zielsequenz

Je 10 µg/µl der microRNA-124a spezifischen Sense- und Antisense-Sequenz wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl in DNA-Annealingpuffer 5 Minuten bei 90°C erhitzt und anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das microRNA-124a-Konstrukt beinhaltet neben der reifen microRNA-124a-Sequenz eine BlnI-Restriktionsschnittstelle, die der Identifizierung positiver pMIR-REPORT™-Luziferase-Klone dient (siehe Kap. 2.1.6) sowie die zur Insertion in den pMIR-REPORT™-Luziferasevektor notwendigen SpeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen. Das annealte microRNA-124a-Konstrukt wurde bei -20°C gelagert.

miR-124a-Antisense-Konstrukt:

5'-AATGCA^{grau}CTAGT^{grau}GGCATTACCGCGTGCCTTAGC^{grau}TCAGCAAGCT^{grau}TAATGC-3'

miR-124a-Sense-Konstrukt:

5'-GCATTA^{grau}AGCTTGC^{grau}TGAGCTAAGGCACGCGGTGAATGCC^{grau}ACTAG^{grau}TGCATT-3'

grau unterstrichen: SpeI, grau: HindIII, unterstrichen: BlnI; fett: reife miRNA-124a-Sequenz

<u>1x DNA Annealingpuffer</u>	30 mM	HEPES-KOH pH 7,4
	100 mM	Kaliumacetat
	2 mM	Magnesiumacetat x 4 H ₂ O

2.3.7.4 Restriktionsverdau

Für die Ligation in den pMIR-REPORT™-Luziferasevektor wurden sowohl der Vektor selbst als auch das doppelsträngige microRNA-124a-Konstrukt mit den beiden Restriktionsendonukleasen SpeI und HindIII (New England BioLabs™, Inc.) geschnitten. Durch den Doppelverdau sind an den Enden des Konstruktes in ihrer Orientierung eindeutig festgelegte „sticky ends“ entstanden, die denen des geschnittenen Vektors komplementär sind. Die Restriktion des microRNA-124a-Konstrukts wurde mit je 1 U/μg beider Enzyme gleichzeitig über 2 Stunden bei 37°C durchgeführt und in einem Gesamtvolumen von 30 μl angesetzt.

<u>Restriktionsansatz</u> (30 μl)	3 μl	10 x Puffer (Puffer #2)
	3 μl	10 x BSA
	20 μl	Annealte microRNA-124a-Konstrukte
	Je 1 μl	1 U/μg Restriktionsendonuklease
	ad 30 μl	steriles H ₂ O

Vor der Ligation in den pMIR-REPORT™-Luziferasevektor wurde das doppelsträngige, geschnittene microRNA-124a-Konstrukt mit Ethanol gefällt (siehe Kap. 2.3.7.5). Im Gegensatz zu dem annealten microRNA-124a-Konstrukt wurde der pMIR-REPORT™-Luziferasevektor sukzessiv mit den beiden Restriktionsendonukleasen SpeI und HindIII geschnitten. Dafür wurden 1 μg Plasmid-DNA und 1 U/μg Restriktionsenzym eingesetzt. Die Restriktion wurde für 2 Stunden bei 37°C, in einem Gesamtvolumen von 30 μl, inkubiert. Im Anschluss wurde das jeweilige Enzym nach Angaben des Herstellers Hitze-inaktiviert. Zur Überprüfung der Linearisierung des Vektors wurde 1 μl des Restriktionsansatzes mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt, über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mit Roti®-Safe GelStain (Roth®) unter UV-Licht sichtbar gemacht. Um Rückstände der Restriktionsansätze zu beseitigen wurde die Plasmid-DNA aus dem SpeI-Restriktionsverdau mit Ethanol gefällt (siehe Kap. 2.3.7.5) und in den sich anschließenden HindIII-

Restriktionsverdau eingesetzt. Auch hier wurde das Enzym Hitze-inaktiviert und die Plasmid-DNA gefällt.

<u>6 x Ladepuffer</u>	30 %	Glycerol
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol FF in H ₂ O
<u>Restriktionsansatz 1</u> (30 µl)	3 µl	10 x Puffer (Puffer #4)
	1 µg	Plasmid-DNA
	1 µl	1 U/µg SpeI
	ad 30 µl	steriles H ₂ O
		Hitze-Inaktivierung von SpeI: 20 min, 80°C
<u>Restriktionsansatz 2</u> (30 µl)	3 µl	10 x Puffer (Puffer #2)
	1 µg	Plasmid-DNA
	1 µl	1 U/µg HindIII
	ad 30 µl	steriles H ₂ O
		Hitze-Inaktivierung von HindIII: 20 min, 65°C

2.3.7.5 DNA-Fällung

Zur Konzentrierung und Reinigung der DNA wurde eine DNA-Fällung mit Ethanol vorgenommen. Durch die Zugabe von 1/10 Volumen 0,1 M NaCl wurde die DNA aus der wässrigen Phase verdrängt und durch Zugabe von zwei Volumen 100%igem Ethanol präzipitiert. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen wurde die Probe über Nacht bei -80°C gelagert. Die pelletierten DNA-Präzipitate (10 min, 4°C, 14.000 rpm, Eppendorf Zentrifuge 5415R) wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, pelletiert, getrocknet und schließlich in Wasser rückgelöst.

2.3.7.6 Ligation

Die Ligation des microRNA-124a-Konstruktes in den Reportervektor erfolgte durch Inkubation von 200 ng des geschnittenen pMIR-REPORT™-Luziferasevektors mit 2-10 µg des annealten und geschnittenen microRNA-124a-Konstrukts unter Verwendung der T4 DNA

Ligase (Invitrogen™). Die Ligation wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und der Ligationsansatz bis zur anschließenden Transformation bei -20°C gelagert. Außerdem wurden verschiedene Ligationskontrollen sowie eine Negativkontrolle (no-insert-Ligation) durchgeführt.

<u>Ligationsansatz</u> (20 μl)	4 μl 1 μl _ μl _ μl ad 20 μl	5 x Puffer (5x T4 DNA Ligase Buffer) T4 DNA Ligase (1U/ μl) Plasmid-DNA (200 ng) 2 μg microRNA-124a-Oligonukleotide steriles H_2O	
<u>Ligationskontrolle</u>	<u>Religationskontrolle</u>	<u>Positivkontrolle</u>	
4 μl 5x Puffer	4 μl 5x Puffer	4 μl 5x Puffer	
1 μl T4 DNA Ligase	1 μl T4 DNA Ligase	1 μl T4 DNA Ligase	
1 μl „Spel-Vektor“	1 μl „sukzessiv-verdauter Vektor“	1 μl „Originalvektor“	
14 μl steriles H_2O	14 μl steriles H_2O	14 μl steriles H_2O	

2.3.7.7 Transformation

Die Ligationsansätze wurden in ein Vial der chemisch kompetenten „One Shot® TOP10“ *E.coli*-Zellen nach Angaben des Herstellers (Invitrogen™) transformiert. Dieses bietet eine Transformationseffizienz von 1×10^9 cfu pro einem μg superspiralierter DNA. Ein Vial „One Shot® TOP10-Zellen“ wurde dazu mit 4 μl des Reaktionsansatzes versetzt und invertiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis und einem Hitzeschock für dreißig Sekunden bei 42°C wurden je 10 μl und 50 μl des Transformationsansatzes auf vorgewärmte LB-Platten (0,1 mg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Agar
LB-Medium
1,5 % (w/v) Agar
Autoklavieren

2.3.7.8 Selektion

Zur Selektion positiver Klone wurden präparative Plasmidisolierungen (siehe Kap. 2.3.7.2) für ausgewählte Kolonien durchgeführt. Die Klone wurden gepickt und eine Übernachtskultur in 5 ml LB-Ampicillin bei 37°C und 117 rpm (Hilab, GFL®-3031) angesetzt. 350 µl der Übernachtskultur wurden zur Herstellung einer 1:2 Stammkultur mit Glycerol in Cryo™ Einfrierröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) überführt und bei -80°C gelagert. Aus der restlichen Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe Kap. 2.3.7.2). Zur Überprüfung der Insertion des microRNA-124a-Konstrukts wurde 1 µg der isolierten Plasmid-DNA innerhalb der microRNA-124a-Sequenz mit der Restriktionsendonuklease BlnI (New England BioLabs™, Inc.) geschnitten, wodurch der pMIR-REPORT™-Luziferasevektor linearisiert.

<u>Restriktionsansatz</u>	3 µl	10 x Puffer (Puffer #4)
(30 µl)	3 µl	10 x BSA
	1 µg	Plasmid-DNA
	1 µl	1 U/µg BlnI
	ad 30 µl	steriles H ₂ O
		Inkubation 2 h bei 37°C

Die anhand der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.3.7.9) identifizierten, linearen Plasmide wurden von LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert (siehe Kap. 2.3.7.10).

2.3.7.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA ist aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste ihrer Größe entsprechend negativ geladen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der elektrophoretischen Auftrennung von DNA mit Hilfe eines Agarosegels zu Nutze. Für die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente wurden 1%ige Agarosegele (SeaKem®) angesetzt in 1 x TAE-Puffer, mit Roti®-Safe GelStain (Roth®) versetzt und die Elektrophorese unter Verwendung des Agarosegel-Elektrophoresesystems Sub-Cell® GT (Bio-Rad) durchgeführt. Die DNA-Proben wurden 1:5 mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Marker (PEQLAB Biotechnologie GmbH) in das Gel pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten

Spannung von 100 Volt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit der QuantityOne[®]-Software, unter Verwendung der Gel Doc[®]-Funktion (Bio-Rad) sichtbar gemacht und dokumentiert.

<u>TAE-Puffer (50x)</u>	242 g	Tris
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA
		pH 8,0
		in H ₂ O

2.3.7.10 Sequenzierung

Plasmide, die nach Linearisierung mit BlnI (New England BioLabs[™], Inc.) im Agarosegel die richtige Größe zeigten, wurden bei LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert. Hiermit wurde die Plasmid-DNA-Sequenz daraufhin überprüft, ob durch die Klonierung Mutationen oder falsche Nukleotidsequenzen entstanden sind. Die Sequenzierung wurde mit dem pMIR-REPORT[™]-Forward-Primer (5'-AGGCGATTAAGTTGGGTA-3') und dem pMIR-REPORT[™]-Reverse-Primer (5'-ATTGCAACGATTTAGGTG-3') von BioSpring GmbH durchgeführt. Nach einem Alignment der von LGC Genomics GmbH erhaltenen Sequenzdaten und der bekannten, reifen microRNA-124a-Sequenz wurden fehlerfreie Klone einer analytischen Plasmidisolierung (siehe Kap. 2.3.7.11) unterzogen.

2.3.7.11 Analytische Plasmidisolation

Die Sequenz-spezifischen pMIR-REPORT[™]-miR-124a-Luziferase-Plasmide der selektierten *E.coli*-Klone (siehe Kap. 2.3.7.8) wurden über eine analytische Plasmidisolierung mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt. 350 µl der transformierten *E.coli*-Kulturen wurden in einer 1:2 Stammkultur mit Glycerol in Cryo[™] Einfrierröhrchen (Greiner Bio-One GmbH) bei -80°C gelagert. Die restliche Übernachtskultur wurde pelletiert (8 min, 4000 rpm, RT, Eppendorf Zentrifuge 5810R) und einer alkalischen Lyse unterzogen (Birnboim/Doly 1979). Anschließend wurde die Plasmid-DNA neutralisiert und in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration (Vogelstein/Gillespie 1979), auf einer kieselensäurehaltigen Membran adsorbiert. Durch mehrmaliges Waschen wurden Endonukleasen und Salze entfernt. Die

Plasmid-DNA wurde schließlich in geringer Salzkonzentration mit Wasser eluiert. Die genaue Durchführung ist den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA wurde, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, durchgeführt und die Plasmide bei -20°C gelagert. Der isolierte pMIR-REPORT™-miR-124a-Luziferasevektor wurde zur Überprüfung der Funktionalität von anti-miR-124a- und miR-124a-mimic-Oligonukleotiden und ihrer respektiven Kontrolloligonukleotide in HeLa-Zellen kotransfiziert (siehe Kap. 2.3.7.12).

2.3.7.12 Transfektion der HeLa-Zellen

Als *in vitro* Modellsystem für die Untersuchung der Funktionalität von microRNA-interferierenden Oligonukleotiden wurden HeLa-Zellen mit dem spezifischen microRNA-Reporter-Vektor (pMIR-REPORT™-System, Applied Biosystems®) und einzelsträngigem, LNA-angereicherten microRNA-Inhibitor (anti-miR, Exiqon A/S) bzw. microRNA-Vorläufermolekül (pre-miRNA / miR-Mimic, Applied Biosystems®) oder deren Kontrolloligonukleotiden (#) transfiziert. Dazu wurden die unter 2.1.6 aufgelisteten, käuflich erworbenen Nukleotide verwendet. In die ‚multiple cloning site‘ (MCS) des Luziferase-Reporter-Vektors wurde die ausgereifte microRNA-Sequenz kloniert, die mit kotransfizierten microRNA-regulierenden Oligonukleotiden interagieren kann. Basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz kann unter Verwendung spezifischer microRNA-Oligonukleotide die Expression des Luziferasesgens beeinflusst und Einblick über die Funktionalität der microRNA-interagierenden Oligonukleotide gewonnen werden. Zusätzlich zu dem Luziferase-Reporter-Vektor besteht das pMIR-REPORT™-System aus einem β -Gal-Kontroll-Plasmid zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und Zellviabilität.

Für die Transfektion von HeLa-Zellen wurden 50 nM anti-miR-124a (Custom LNA oligonucleotide hsa-miR-124a, product sequence 5'-GCATTCACCGCGTGCCTTA-3', Exiqon A/S) und 30 nM pre-miR-124a (mirVana™ miRNA mimic hsa-miR-124a, Applied Biosystems®) eingesetzt. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit miR-124a-mimic diente somit als Überexpressionsmodell, wohingegen die Transfektion von anti-miR-124a als Knockdown-Modell herangezogen wurde. Als Negativkontrollen wurden anti-miR negative control A (#) (Exiqon A/S) bzw. mirVana™ miRNA mimic Negative Control #1 (Applied Biosystems®)

eingesetzt. Diese Oligonukleotide zeigen keine Sequenzhomologien zu zellinhärenten microRNAs.

Für eine effiziente Kotransfektion der pMIR-REPORT™-Vektoren und der microRNA-Oligonukleotide wurde TransPass™ HeLa Transfection Reagent (New England BioLabs™, Inc.), ein Lipid / kationisches Polymer, verwendet.

Für jeden Transfektionsansatz wurden 100 µl Opti-MEM®I (Gibco®) und 7,5 µl TransPass™ HeLa zu einem Mastermix zusammen pipettiert, gemischt und kurz abzentrifugiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 500 ng der pMIR-REPORT™-Vektoren, 50 nM miRNA-Inhibitor und 30 nM miR-Mimic direkt in den Opti-MEM®I / TransPass™ HeLa-Mix pipettiert. Dieser Mastermix wurde gemischt, kurz abzentrifugiert und erneut 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die anstehende Transfektion wurden HeLa-Zellen am Vortag in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen pro 2 ml RPMI 1640 Medium (Gibco®) in 6-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Nach der erfolgten Inkubation wurden die jeweiligen Transfektionsansätze auf die HeLa-Zellen pipettiert und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Für eine adäquate Beurteilung der spezifischen funktionellen Interaktion der microRNA-Oligonukleotide und des pMIR-REPORT™-Vektors wurden die HeLa-Zellen nach 24 Stunden lysiert und einem Luziferase-Assay (siehe Kap. 2.3.7.14) unterzogen. Die Transfektionseffizienz wurde anhand eines β-Gal ELISAs (siehe Kap. 2.3.7.13) bestimmt.

Tabelle 3: Pipettierschema der HeLa-Transfektion mit den pMIR-REPORT™-Vektoren und den microRNA-interagierenden Oligonukleotiden.

Ansatz	1	2	3	4	5	6
Opti-MEM®I	100 µl					
TransPass™ HeLa	7,5 µl					
pMIR-REPORT™-Vektoren	+	+	+	+	+	+
je 500 ng des Luziferase- und des β-Gal-Kontrollplasmid						
anti-miR-124a	-	50 nM	50 nM	-	-	-
miR-124a-mimic	-	-	30 nM	-	30 nM	30 nM
#-miR-Kontrolle	-	-	-	50 nM	50 nM	-

2.3.7.13 β -Gal ELISA

Die Transfektionseffizienz der HeLa-Zellen, die mit dem pMIR-REPORT™-Vektor und anti-miR-124a bzw. miR-124a-mimic ko-transfiziert worden sind, wurde mit dem β -Gal ELISA (Roche) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die β -Gal-Konzentration wurde anhand der photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Dabei ist die Substratumsetzung durch die β -Galaktosidase der Menge des transfizierten pMIR-REPORT™ β -Gal-Kontrollplasmids und damit der β -Gal-Expression in den transfizierten Zellen proportional. Der verwendete β -Gal ELISA basiert auf dem Prinzip des „Sandwich ELISA“. Dabei bindet das β -Gal Enzym aus dem HeLa-Zelllysate an die mit Anti- β -Gal beschichteten Mikrotiterplatten und wird über einen Antikörperkomplex aus Digoxigenin-konjugiertem Anti- β -Gal und einem mit Peroxidase gekoppeltem Anti-Digoxigenin, der das Peroxidasesubstrat ABTS (Roche) unter einem gelben Farbumschlag umsetzt, quantifiziert.

2.3.7.14 Luziferase-Assay

Um den Einfluss der microRNA-regulierenden anti-miR- und miR-mimic-Oligonukleotide auf die Expression der in dem pMIR-REPORT™-miR-124a-Vektor kodierten Luziferase zu untersuchen, wurden die HeLa-Zellen 24 Stunden nach Transfektion lysiert (Lysispuffer des β -Gal ELISAs von Roche) und einem Luziferase-Assay unterzogen. Bei diesem Verfahren bedient man sich der Luziferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*), ein 61 kDa Monomer, das ohne posttranslationale Modifikationen eine Enzymaktivität besitzt (de Wet et al. 1985; Wood et al. 1984) und sich somit als Reporterprotein anbietet. Dabei wird das Substrat Luziferin in Gegenwart von ATP, Mg^{2+} und O_2 durch die Luziferase oxidiert (Wood 1990), wodurch Photonen emittiert werden. Diese können quantifiziert werden und sind der Menge der exprimierten Luziferase proportional. Zur Quantifizierung der Luziferaseaktivität der transfizierten HeLa-Zellen wurden 200 μ l Zelllysate in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 20 μ l Luziferase-Substrat-Puffer versetzt. Die Photonenmessung wurde mit dem Mithras LB 940 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG), einem Multilabel-Reader für Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen und der automatischen Photonenzählung und Auswertung durch die MikroWin 2000 Software, Version 4, durchgeführt. Die gemessene

Substratumsetzung wurde nach Durchführung des β -Gal ELISAs anhand der Transfektionseffizienz (siehe Kap. 2.3.7.13) normalisiert.

<u>Luziferase-Substrat-Puffer</u>	20 mM	Tricine
	2,67 mM	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O
	1,07 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	100 μ M	0,5 M EDTA
	33,3 mM	DTT
	530 μ M	ATP
	0,213 mg/ml	Coenzym A
	470 mM	D-Luziferin

2.4 *In situ* Hybridisierung von Digoxigenin-markierten microRNA-Sonden

Die histologische Detektion von microRNAs soll Aufschluss über deren Lokalisation im Gewebe und die Zelltyp-spezifische Expression liefern. Dafür wurde die *in situ* Hybridisierung (ISH) mit spezifischen LNA-Sonden durchgeführt, die aufgrund ihrer bi-zyklischen RNA-Analoga (LNA, locked nucleic acid) eine höhere Hybridisierungstringenz und –sensitivität besitzen und somit die Detektion der microRNAs trotz ihrer geringen Größe ermöglichen. LNA-haltige, 3'-Digoxigenin-markierte Sonden gegen reife microRNA-124a und -134 sowie eine #-Negativkontrollsonde wurden von Exiqon A/S käuflich erworben.

miRCURY LNA Detection probe

hsa-miR-124	GGCATTACCCGCGTGCCTTA/3Dig_N/
hsa-miR-134	CCCCTCTGGTCAACCAGTCACA/3Dig_N/
Scrambled-miR (#)	GTGTAACACGTCTATACGCCCA/3Dig_N/

Die ISH wurde mit Rückenmarks- und DRG-Schnitten perfundierter C57BL/6 Mäuse durchgeführt (siehe Kap. 2.1.4). Das 10 μ m dick geschnittene Lumbalmark und die DRGs (siehe Kap. 2.1.5) wurden dazu mit einem Fettstift (Dako) umrandet und die Inkubationskammern zur Verhinderung von RNase-Kontaminationen mit RNaseZap® (Ambion®) ausgewischt. Die Gewebeschnitte wurden 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und auf dem Objektträger für 5 Minuten mit 4%igem Paraformaldehyd/PBS nachfixiert, das anschließend in 3 Waschschrinen mit PBS entfernt wurde. Durch eine 10-minütige

Inkubation des Gewebes mit Acetylierungspuffer wurden die Aminogruppen der Proteine positiv geladen, was unspezifische Hybridisierungen der negativ geladenen Sonden minimiert und so Hintergrundfärbungen reduziert. Die Acetylierung wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit PBS abgestoppt.

Die Schnitte wurden zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Hybridisierungslösung (HB-Puffer) vorhybridisiert. Pro Gewebeschnitt wurden 2 pM der LNA-anti-Digoxigenin-markierten hsa-miR-124-Sonde, hsa-miR-134-Sonde oder der #-Negativkontrollsonde in Denaturierungshybridisierungslösung (DHB-Puffer) für 5 Minuten bei 80°C denaturiert. Die Schnitte wurden dann mit der denaturierten Sonde über Nacht bei 50°C inkubiert. Die PFA-bedingte Proteinvernetzung wurde unter Erwärmen und durch das im Hybridisierungspuffer befindliche SSC, in dem calciumpräzipitierendes Trinatrium-Citrat gelöst ist, aufgelockert. Die Sonde konnte so leichter durch das Gewebe diffundieren und an die komplementäre microRNA binden (Ausubel et al. 1995; Sambrook/Russell 2000). Die ungebundene Sonde wurde durch mehrere stringente SSC-Waschschritte entfernt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte in vorgewärmten 0,2 x SSC bei 60°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach einer Stunde wurde die 0,2 x SSC-Lösung aufgefrischt und die Gewebeschnitte erneut für 30 Minuten bei 60°C gewaschen. Um die Schnitte auf Raumtemperatur zu äquilibrieren, wurde das Gewebe nochmals mit 0,2 x SSC und anschließend mit PBS für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt.

Unspezifische Antikörperbindestellen im Gewebe wurden mit 1%iger Blockinglösung (Roche) 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert, bevor der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) 1:500 in 1%iger Blockinglösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf den Schnitten inkubiert wurde. Ungebundener Antikörper wurde schließlich durch dreifaches Waschen für je 10 Minuten mit PBS und einmal für 15 Minuten mit PBST (1x PBS + 0,1 % Tween®-20) entfernt. Für die Detektion der Digoxigenin-markierten microRNA-Sonden wurde das Gewebe 2 x 10 Minuten mit AP-Puffer (Alkalischer-Phosphatase-Puffer) äquilibriert. Durch die Zugabe von Levamisole (Sigma-Aldrich®) zum AP-Puffer ist die endogene alkalische Phosphatase inhibiert und mittels des Detergenz Tween®-20 sind unspezifische Substratbindungen und damit Hintergrundfärbungen effizient reduziert worden. Für die Detektion der microRNA-Sonden wurde der Digoxigenin-Antikörper anschließend entweder fluoreszenzmarkiert (siehe Kap. 2.4.1) oder unter einer chromogenen Reaktion (siehe Kap. 2.4.2) sichtbar angefärbt.

Die verwendeten ISH-Puffer wurden nach der unten stehenden Auflistung hergestellt. Für ein RNase-freies Milieu wurde jeweils Millipore™-Wasser verwendet.

<u>Paraformaldehyd</u>	4 % PFA	pH 7,4
<u>Acetylierungspuffer</u>	590 ml	DEPC-H ₂ O
	8 ml	Triethanolamin
	1050 µl	HCl (mind. 37 %)
	1,5 ml	Essigsäureanhydrid
<u>20 x SSC</u>	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatrium-Citrat 2H ₂ O
		pH 7,0
		Autoklavieren
<u>Maleinsäurepuffer</u>	0,12 M	Maleinsäure
	0,15 M	NaCl
		pH 7,5
		Sterilfiltrieren
<u>Hybridisierungspuffer</u> (HB-Puffer)	50 %	Formamid
	5 x SSC	SSC (20x)
	5 x	Denhardts-Solution (50 x, Sigma)
	500 µg/ml	herring sperm DNA (10 mg/ml)
	200 µg/ml	yeast tRNA (20 mg/ml)

Die herring sperm DNA und die yeast tRNA wurden bei 95°C 10 min gekocht und sofort auf Eis gestellt. Schließlich wurden auf Eis alle Substanzen gemischt.

<u>Denaturierungs-Hybridisierungspuffer</u> (DHB-Puffer)	10 %	HB-Puffer
	0,5 %	CHAPS
	5 %	20 % Tween®-20
		DEPC-H ₂ O
<u>Blocklösung</u>	1 %	Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer

<u>AP-Puffer</u>	100 mM	1 M Tris HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
		Sterilfiltrieren
	1,2 mg / ml	Levamisole
	0,2 %	Tween®-20
		pH 8,0

2.4.1 Fluoreszenzmarkierung der microRNA-Sonden

10 mg/ml HNPP (2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate) und 25 mg/ml Fast Red TR (4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemi-zinc chloride salt) wurden in 1 ml AP-Puffer gemischt und durch eine 0,22 µm Nylonmembran (Millex®-GV) filtriert, um unspezifische Präzipitate zu vermeiden. Bei HNPP handelt es sich um ein fluoreszierendes AP-Substrat mit einem Emissionsmaximum bei 562 nm. Durch die Zugabe des Diazoniumsalzes Fast Red TR wird die Affinität des dephosphorylierten Präzipitats HNP zur Sonde erhöht. Zunächst wurde das Gemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Farbreaktion wurde schließlich durch dreimaliges Waschen der Schnitte für 10 Minuten mit PBS abgestoppt und das Gewebe anschließend mit Fluoromount-G (Southern Biotech) eingedeckt.

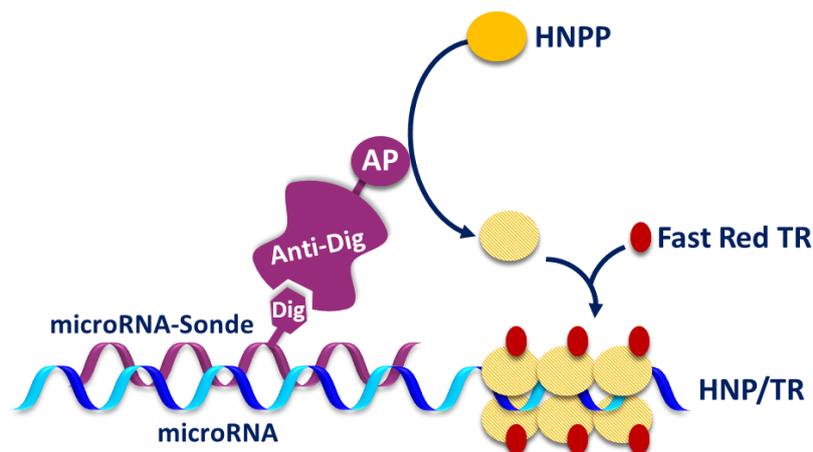


Abbildung 7: Fluoreszenzmarkierung der microRNA-Sonden. Schematische Darstellung der HNPP-Umsetzung unter Verwendung von Fast Red TR durch die Anti-Digoxigenin gekoppelte Alkalische Phosphatase. Abbildung modifiziert nach Datasheet zu „HNPP Fluorescent Detection Set“, Roche, Cat.No. 11758888001, Content Version: October 2011, Version 07.

2.4.2 Chromogene Farbreaktion durch die Alkalische Phosphatase

Für die Farbreaktion wurde eine Mischung aus 50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) und 100 mg/ml NBT (Nitroblautetrazolium) in AP-Puffer angesetzt. Durch die Dephosphorylierung und gleichzeitige Oxidation des AP-Substrates BCIP mit dem Elektronendonator NBT entstehen dunkelblaue Präzipitate. Auch hier wurde das Gemisch zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch 3 x 10-minütiges Waschen mit PBS wurde die Farbreaktion beendet und das Gewebe mit Flouromount-G (Southern Biotech) eingedeckt.

2.4.3 Immunfluoreszenz an *in situ* hybridisierten Gewebe

Für den Nachweis der Kolo-kalisation von microRNA-124a- und -134-positiven, fluoreszenzmarkierten Zellen mit neuronalen Zellmarkern oder potenziellen Zielproteinen wurden die nachzuweisenden Proteine vor Entwicklung des HNPP-Signals detektiert. Nach erfolgter Hybridisierung der Digoxigenin-markierten microRNA-Sonde an PFA-fixierten Gewebeschnitten naiver C57BL/6 Mäuse und der Inkubation des AP-konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers wurde ungebundener Anti-Digoxigenin-Antikörper 3 x 10 Minuten mit PBS von den Schnitten gewaschen. Um unspezifische Bindungen der neu eingesetzten Antikörper an das Gewebe zu reduzieren, wurden die Antigenbindestellen nochmals für eine Stunde mit 3 % BSA / 10 % NGS (Invitrogen™) in PBST (1 x PBS + 0,1 % Tween®-20) blockiert. Die Primärantikörper wurden in ihrer entsprechenden Konzentration in 3 % BSA / PBSTx (1 x PBS + 0,1 % Triton®-X 100) bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit PBS wurde der noch ungebundene Primärantikörper entfernt. Die Fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden in einer Konzentration von 1:800 in 3 % BSA / PBST für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zur Entwicklung der Digoxigenin-markierten-microRNA-Sonden 2 x 10 Minuten mit AP-Puffer äquilibriert und das HNPP-Signal entwickelt (siehe Kap. 2.4.1). Schließlich wurden die Gewebeschnitte mit Flouromount-G (Southern Biotech) eingedeckt.

	<u>Hersteller</u>	<u>Wirt</u>	<u>Verdünnung</u>
<u>Primärantikörper</u>			
GFAP	Chemicon®	Maus	1 : 1000
HDAC5	Cell Signaling Technology®	Kaninchen	1 : 100
IB4-AF488	Invitrogen™	-	1 : 50
Iba1	Wako Chemicals GmbH	Kaninchen	1 : 200
MeCP2	Cell Signaling Technology®	Kaninchen	1 : 5000
MYST2	Sigma-Aldrich®	Kaninchen	1 : 100
NeuN	Millipore™	Maus	1 : 200
NF200	Sigma-Aldrich®	Maus	1 : 1000
STMN2	Proteintech	Kaninchen	1 : 500
<u>Sekundärantikörper</u>			
Alexa Fluor® 488 Goat	Invitrogen™	Ziege	1 : 800
Anti-Mouse IgG (H+L)			
Alexa Fluor® 488 Goat	Invitrogen™	Ziege	1 : 800
Anti-Rabbit IgG (H+L)			

2.4.4 Mikroskopische Aufnahmen

Analysiert und visualisiert wurden die *in situ*- und Immunfärbungen am Axio Observer.Z1-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit einer monochromen CCD-Kamera (AxioCam Mrm, Zeiss). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden anschließend mit der AxioVision Rel.4.7.2 Software (Zeiss) mit Falschfarben belegt und überlagert.

2.5 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA), wobei der einfaktorielle ANOVA Test nach Bonferroni-Korrektur (*) oder ein ungepaarter t-Test (#) angewandt wurde. Diese beiden Testverfahren wurden unter Annahme der auf Wahrscheinlichkeit basierenden gaussischen Normalverteilung der Datensätze durchgeführt und gelten beim Vergleich voneinander unabhängiger, ungepaarter Stichproben. Wurden genau zwei Gruppen einander gegenübergestellt, so ist der ungepaarte t-Test eingesetzt worden. Bei Messung einer

Variablen in drei oder mehr Gruppen wurde dagegen der einfaktorielle ANOVA Test verwendet um herauszufinden, ob sich die Mittelwerte zwischen den Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Der anschließende Bonferroni-Test korrigierte den definierten p-Wert von 5%, indem die Anzahl der durchgeführten Tests durch den 5% p-Wert dividiert wurde. Dadurch wird das Erreichen einer statistischen Signifikanz zwar erschwert, ihre Aussagekraft dagegen bekräftigt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Indem sowohl die Gruppenanzahl als auch die Standardabweichung berücksichtigt werden, berechnet der SEM die Varianz der einzelnen Werte. Ein Konfidenzintervall von 95% wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Werte sind mit einem Stern (*) für den ANOVA-Test nach Bonferroni-Korrektur oder mit einer Raute (#) für den t-Test gekennzeichnet; $p < 0,05$ (*/#), $p < 0,01$ (**/##) und $p < 0,001$ (***/###).

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Anti-Digoxigenin-Antikörper	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
anti-miR-Oligonukleotide	Exiqon A/S, Vedbaek, Dänemark
ATP	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
B-27® Supplement (50x)	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
BCIP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bromphenolblau	JT Baker, Deventer, Niederlande
BSA (fettfrei)	MP Biomedicals GmbH, Eschwege
BSA, Fraktion V, pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
CHAPS	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Coenzym A	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Collagenase (Type: CLS IV)	Biochrome AG, Berlin
DEPC	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Denhardt's Solution	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Dispase®	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
D-Luziferin	AppliChem GmbH, Darmstadt
DNA Ladder Mix / 100-10.000 bp	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
DTT	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (1x), [-]Ca ²⁺ & Mg ²⁺	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Dinatrium-EDTA	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Essigsäure 99% (v/v)	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Ethanol 70% (v/v)	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FCS	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Fettstift	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Formaldehyd-Lösung 10,0%	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Formamid	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Gel Loading Buffer	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
GIBCO® DMEM 11960	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
GIBCO® RPMI 1640	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HBSS 1x	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
HEPES-KOH	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Herring Sperm DNA Solution	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt

NGS	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Human-IL-1-β	PreproTech®, Rocky Hill, NJ, USA
Human-TNF-α	PreproTech®, Rocky Hill, NJ, USA
Isofluran-Carbogen-Gemisch	Abott GmbH & Co. KG, Wiesbaden / Linde Gas, Pullach
Kaliumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kohlenstoffdioxid	Linde Gas, Pullach
Laminin	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
LB-Agar	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Levamisol	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
L-Glutamin 200mM	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
LPS (Lipopolysaccharid <i>E.coli</i>)	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumdihydrocarbonat-Pentahydrat	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
miRCURY LNA Detection probes	Exiqon A/S, Vedbaek, Dänemark
miR-mimic Oligonukleotide	Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
NBT	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NEUROBASAL™ Medium [-] L-Glut.	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
NGF	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Nuklease-Free Water	QIAGEN GmbH, Hilden
One Shot® TOP10 Zellen	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
1x OPTI-MEM®I	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
pMIR-REPORT™-Vektoren	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Poly-L-Lysin 0,01% Solution	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
RNaseZap®	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Roti®-Safe GelStain ready-to-use	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Salzsäure, 37% (v/v)	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
SeaKem® LE Agarose	Lonza Cologne GmbH, Köln
T4 DNA Ligase (1U/μl)	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

TransPass™ Hela Transfection Reagent	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Tricine	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Triethanolamin	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-hydrochlorid	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton®-X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
TrypLE™ Express (-Phenol Red)	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween®-20	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Yeast Ribonucleic acid tRNA	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
Zyosan A (<i>S. cerevisiae</i>)	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen

3. Ergebnisse

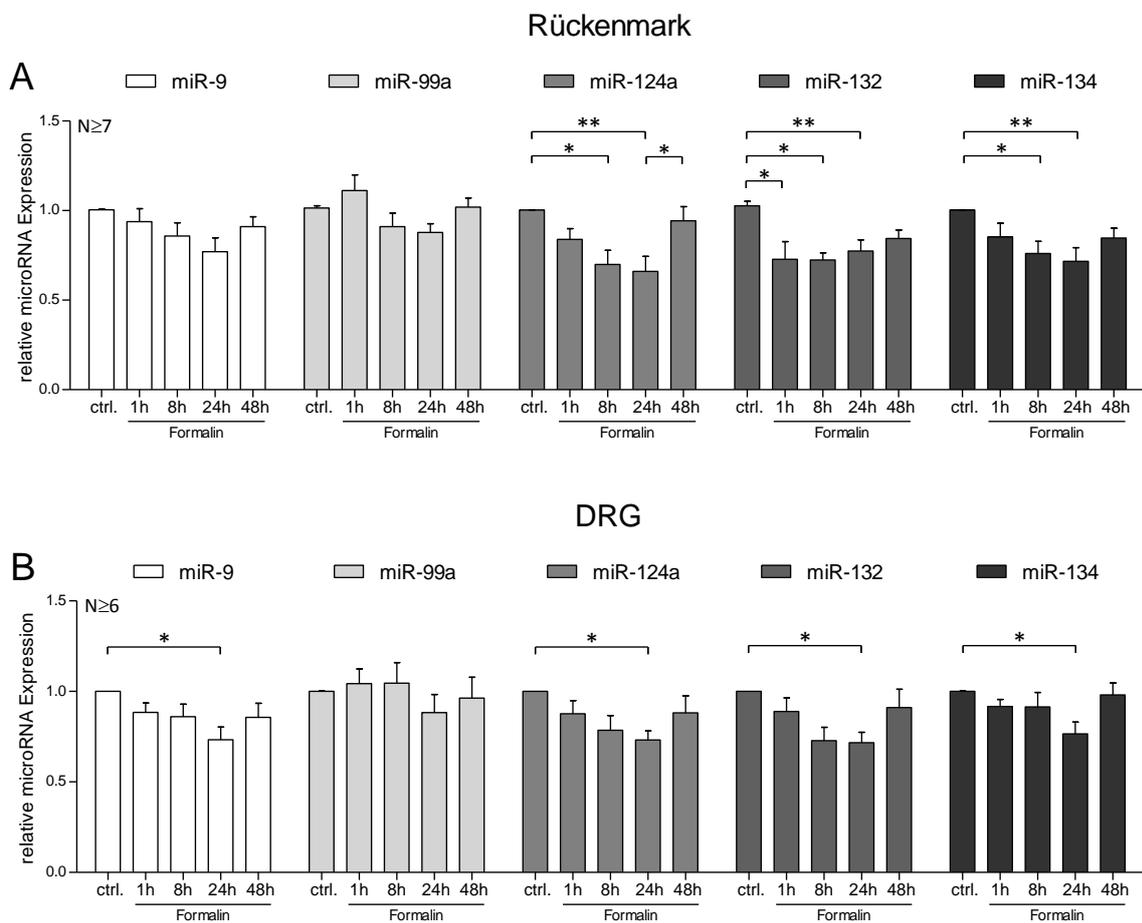
3.1 Expression von microRNAs in nozizeptiven Geweben

Ausgehend von Literaturrecherchen und einem zu Beginn der Promotion durchgeführten miRNA Microarray (siehe Anhang Tab. 2) wurden zunächst 10 microRNAs ausgewählt, deren Expression und Regulation mittels quantitativer Real-Time-PCR in verschiedenen Schmerzmodellen analysiert wurden. Aufgrund ihrer bereits beschriebenen Funktionen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen innerhalb des Nervensystem wurden die ZNS-spezifischen microRNAs-9, -99a, -124a, -132, -134 im Rückenmark und in den Spinalganglien (DRGs) nach subkutaner, peripher entzündlich-nozizeptiver Stimulation mit Formalin oder Zymosan in die Hinterpfoten, oder nach SNI-induzierter Neuropathie untersucht. Basierend auf den Agilent Mouse miRNA Microarray Daten wurde außerdem die Expression der stark exprimierten und regulierten microRNAs let-7f, -29a, -96, -451, -494 (siehe Anhang Tab. 2) nach peripherer Injektion von Formalin im Rückenmark validiert.

3.1.1 microRNA Expression nach entzündlicher Stimulation mit Formalin

Die Expression der ZNS-spezifischen microRNAs wurde nach subkutaner Injektion von Formalin in die Dorsalseite der Hinterpfoten nach 1, 8, 24 und 48 Stunden im Rückenmark (siehe Abb. 8 A) sowie in den DRGs (siehe Abb. 8 B) bestimmt und in Relation zur naiven, unbehandelten Kontrolle gesetzt. Anhand der qRT-PCR wurde ersichtlich, dass alle untersuchten microRNAs basal exprimiert werden. Bei entzündlich-nozizeptiver Stimulation werden einzelne microRNAs zum Teil signifikant und differenziell reguliert. Im Rückenmark wird die Expression von microRNA-124a, -132 und -134 signifikant und zeitabhängig reprimiert, während microRNA-9 und 99a durch die Injektion von Formalin nicht eindeutig reguliert werden. In den DRGs zeigte sich ein identisches Expressionsmuster für microRNA-124a, -132 und -134, mit einer zusätzlichen signifikanten Repression von microRNA-9. Dabei ist insbesondere 24 Stunden nach der Formalin-Injektion eine signifikante Hemmung der genannten microRNAs im Rückenmark und in den DRGs zu beobachten. microRNA-99a wird

durch die Injektion von Formalin weder im Rückenmark noch in den DRGs unterschiedlich reguliert. Die im miRNA Microarray gezeigte, starke Expression und Regulation der microRNAs let-7f, -29a, -96, -451, -494 konnte im Rückenmark nach nozizeptiver Stimulation mit Formalin mittels qRT-PCR zumindest tendenziell bestätigt werden (siehe Abb. 8 C). Vor allem die Expression von microRNA-451 und -494 wird durch Formalin dabei zunächst hoch reguliert und später zeitabhängig gehemmt. Da jedoch mit drei voneinander unabhängigen Proben keine signifikanten Expressionsunterschiede der einzelnen microRNAs quantifiziert werden konnten und die Expression der ausgewählten microRNAs bei einzelnen Zeitwerten zum Teil stark schwankte, wurde im Folgenden nur die Regulation der ZNS-spezifischen microRNAs in einem weiteren Entzündungsmodell untersucht.



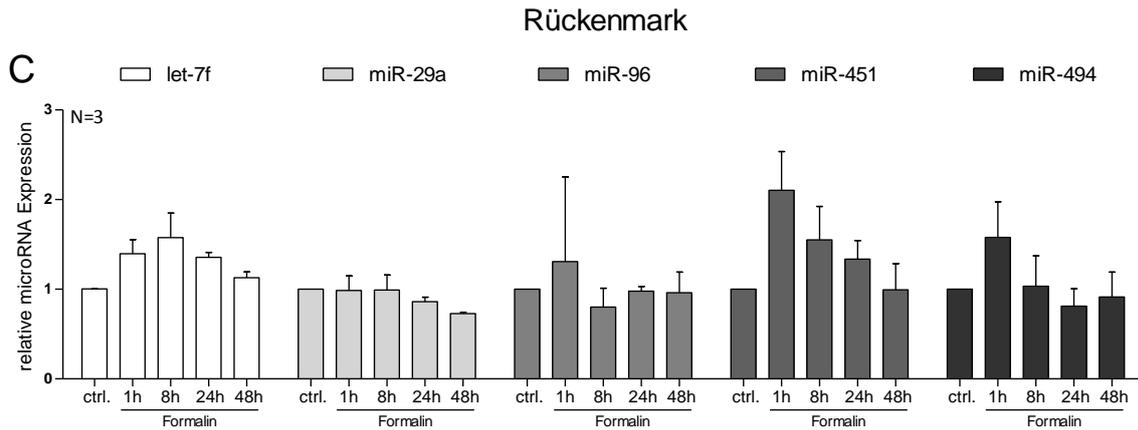


Abbildung 8: microRNA Regulation im Rückenmark (A, C) bzw. in DRGs (B) nach peripherer Injektion von Formalin. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM mindestens drei voneinander unabhängiger Proben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einfaktoriellen ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur: $p < 0,05$ (*) bzw. $p < 0,01$ (**).

3.1.2 microRNA Expression nach entzündlicher Stimulation mit Zymosan

Um zu überprüfen, ob die Regulation der einzelnen microRNAs spezifisch für die Formalin-induzierte Entzündung ist, oder generell bei Entzündungsreaktionen auftritt, ist die Expression der microRNAs in einem zweiten Entzündungsmodell untersucht worden. In dem Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung wird durch die Injektion von Zymosan in die Plantarseite der Hinterpfote eine lokale, anhaltende Entzündungsreaktion ausgelöst. 1, 8, 24 und 48 Stunden nach der Zymosan-Injektion wurden die microRNAs in den Schmerzrezeptiven Geweben quantifiziert (siehe Abb. 9). Im Rückenmark zeigt die Expression von microRNA-9, -99a und -124a zunächst einen tendenziellen Anstieg. Zu späteren Zeitpunkten sind jedoch hemmende Effekte zu beobachten. Im Vergleich zur Stimulation mit Formalin werden microRNA-9, -99a und -124a auch noch nach 48 Stunden signifikant herunterreguliert. Die spinale Expression von microRNA-132 und -134 wird durch Zymosan nicht beeinflusst (siehe Abb. 9 A). In den DRGs induziert Zymosan nach 24 und 48 Stunden eine eindeutige Repression von microRNA-9 und 99a, microRNA-134 liegt nach 8 und 24 Stunden reduziert vor. microRNA-124a und -132 werden durch Zymosan in den DRGs nicht reguliert (siehe Abb. 9 B).

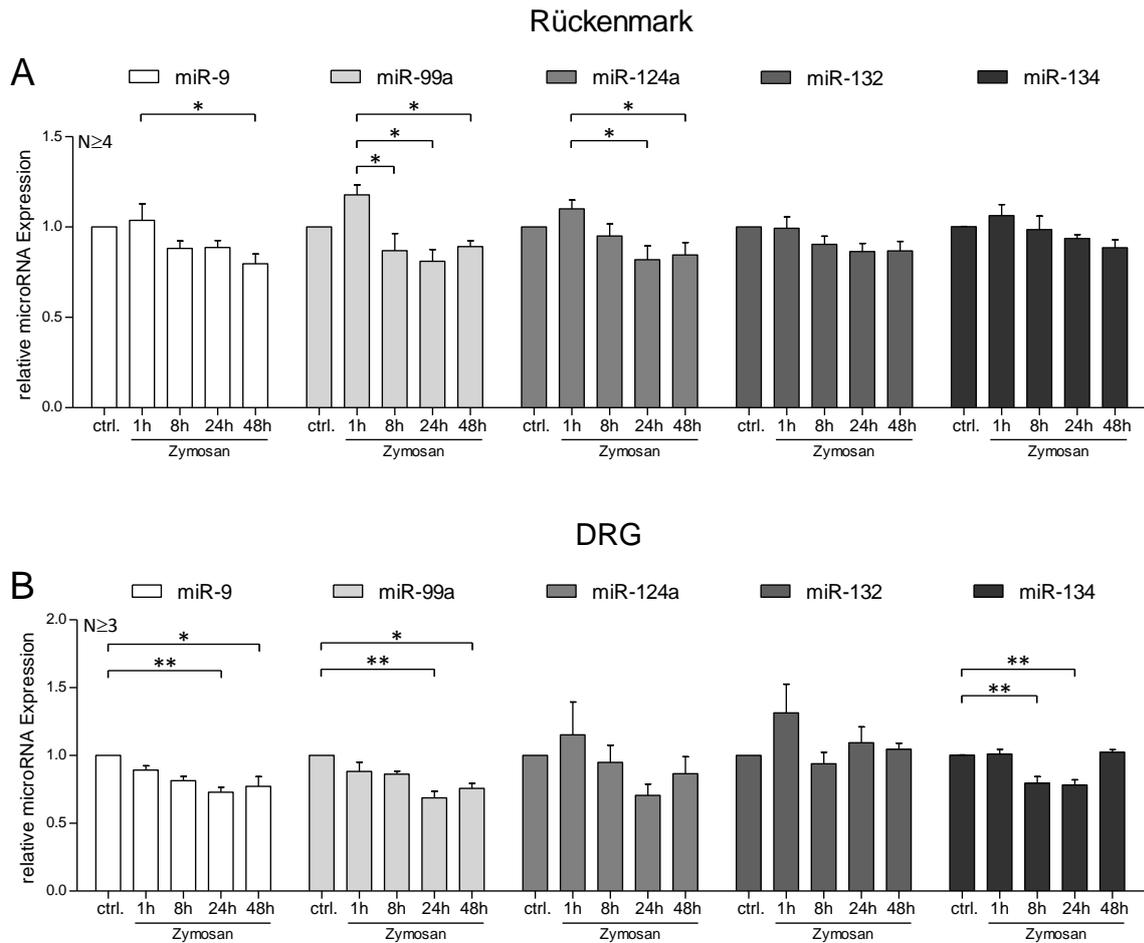


Abbildung 9: Regulation ZNS-spezifischer microRNAs im Rückenmark (A) bzw. in DRGs (B) nach peripherer Injektion von Zyosan. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM mindestens drei voneinander unabhängiger Proben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einfaktoriellem ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur; $p < 0,05$ (*) und $p < 0,01$ (**).

3.1.3 microRNA Expression bei SNI-induzierter Neuropathie

Neuropathische Schmerzen entstehen durch Nervenschädigungen oder neuronale Dysfunktionen, die zu grundlegenden, strukturellen und funktionalen Umbildungen im somatosensorischen Nervensystem führen und zumeist über Veränderungen in der Genexpression reguliert werden. Vor allem das Rückenmark ist diesbezüglich besonders anfällig für neuroplastische Modifikationen (Latremoliere/Woolf 2009). Daher wurde die Expression der ZNS-spezifischen microRNAs im Rückenmark am Tag 1 bzw. Tag 7 in naiven Kontrollen sowie nach Sham- und SNI-Operation analysiert (siehe Abb. 10). Im Vergleich zur naiven Kontrolle wurde microRNA-132 bei SNI signifikant reprimiert, während bei den microRNAs-9, -99a, -124a und -134 keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden

konnten. SNI- und Sham-operierte Kontrolltiere zeigten hinsichtlich der spinalen microRNA Expression jedoch weder nach einem Tag, noch nach einer Woche signifikante Unterschiede.

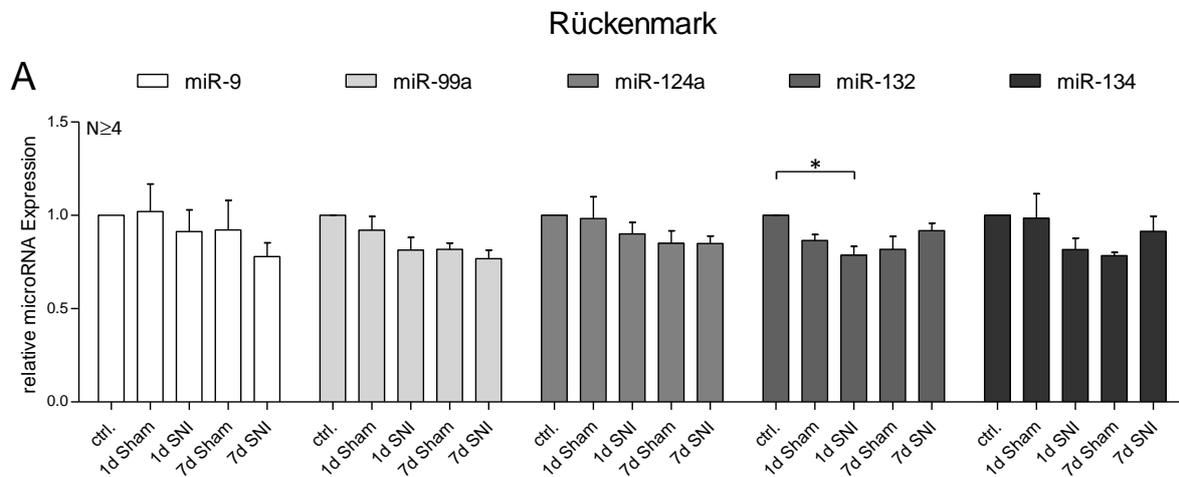


Abbildung 10: Regulation ZNS-spezifischer microRNAs im Rückenmark (A) bzw. in DRGs (B) bei SNI-induzierter Neuropathie. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM mindestens drei voneinander unabhängiger Proben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einfaktoriellen ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur; $p < 0,05$ (*).

Zusammenfassend konnte anhand der durchgeführten Expressionsanalysen gezeigt werden, dass unterschiedliche microRNAs insbesondere durch die entzündlich-nozizeptive Stimulation differenziell und zeitabhängig reguliert werden. Vor allem microRNA-124a und -134 weisen eine hohe ZNS-Spezifität auf und werden in den untersuchten Entzündungsmodellen sowohl im Rückenmark als auch in den DRGs signifikant reguliert. Darüber hinaus wurde die Hemmung dieser beiden microRNAs bereits in einem CFA-induzierten, inflammatorischen Schmerzmodell in trigeminalen Ganglien gezeigt (Bai et al. 2007). Aus diesen Gründen wurde im weiteren Verlauf der Dissertationsarbeit der Fokus auf eine Analyse der beiden microRNAs-124a und -134 gelegt.

3.2 *In situ* Hybridisierung zur Lokalisation von microRNAs in Schmerzrelevanten Geweben

Zur Lokalisation der microRNAs wurden Rückenmarks- und DRG-Gewebeschnitte naiver C57BL/6 Mäuse mit spezifischen LNA-Sonden gegen microRNA-124a und -134 *in situ* hybridisiert und mit dem chromogenen AP-Substrat NBT/BCIP angefärbt (siehe Abb. 11). Die

Spezifität der microRNA-Sonden wurde mit einer unspezifischen #-Negativkontrollsonde überprüft, die weder im Rückenmark (siehe Abb. 11, obere Reihe), noch in den DRGs (siehe Abb. 11, untere Reihe) ein Signal generierte. Die Intensität und Verteilung microRNA-positiver Zellen kann Hinweise über die potenzielle Relevanz von microRNA-124a und -134 bei der nozizeptiven Genregulation liefern. Wie in Abbildung 11 ersichtlich, wird microRNA-124a in der gesamten grauen Substanz des Rückenmarks exprimiert, wobei vor allem im Dorsalhorn eine verstärkte Färbung microRNA-124a positiver Zellen vorliegt. In Laminae I und II des Dorsalhorns enden die peripheren Schmerzafferenzen und der Schmerzreiz wird synaptisch auf das Rückenmark und von dort auf höhere Zentren übertragen. Die an dieser Stelle verstärkte microRNA-124a Expression könnte somit auf eine potenzielle Beteiligung von microRNA-124a an der nozizeptiven Transmission hindeuten. Auch microRNA-134 ist in der gesamten grauen Substanz nachweisbar, allerdings mit einer intensiveren Expression im ventralen Teil des Rückenmarks, in dem die Somata der α - und γ -Motoneurone lokalisiert sind. Die ventrale Expression lässt daher auf eine mögliche Beteiligung von microRNA-134 an der Regulation der Motorik schließen. In den DRGs liegen sowohl microRNA-124a als auch microRNA-134 in allen Somata der primären Afferenzen vor, wobei microRNA-134 in den DRGs im Vergleich zu microRNA-124a stärker exprimiert wird.

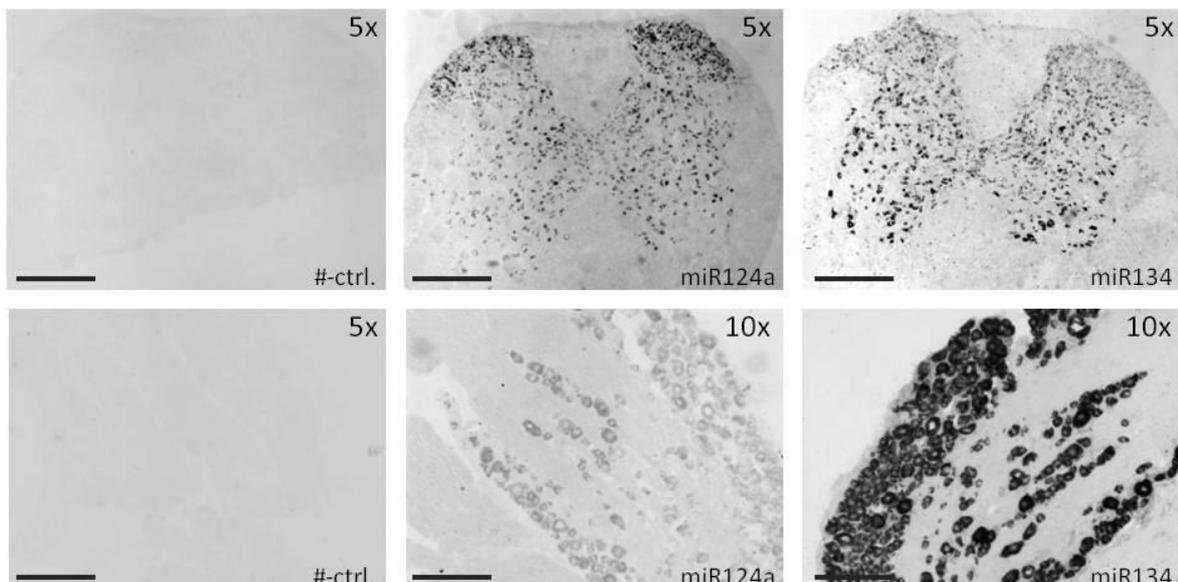


Abbildung 11: Chromogene *in situ* Hybridisierung spezifischer microRNA-Sonden (miR-124a: Mitte, miR-134: rechts) bzw. einer Negativkontrolle (#-Neg.kontrolle: links) im Rückenmark (obere Reihe) und in DRGs (untere Reihe) naiver C57BL/6 Mäuse. Skalierung; 5x: 250 μ m, 10x: 125 μ m.

3.2.1 Zelluläre Lokalisation von microRNAs im Rückenmark

Zur Identifizierung der microRNA-exprimierenden Zellen im Rückenmark naiver C57BL/6 Mäuse wurden die *in situ* hybridisierten spezifischen LNA-Sonden gegen microRNA-124a und -134 mit dem rot-fluoreszierenden AP-Substrat HNPP angefärbt und mit verschiedenen neuronalen AF-markierten, grün-fluoreszierenden Zellmarkern kolokalisiert.

Abbildung 12 zeigt Ko-Immunfluoreszenz-Aufnahmen microRNA-124a exprimierender Zellen im Dorsalhorn des Rückenmarks mit den beiden neuronalen Zellmarkern NF200 und IB4. Aufgrund der Bindung an neuronale Intermediärfilamente werden mit dem NF200-Antikörper große, myelinisierte, nicht-schmerzrelevante Neurone angefärbt, die in Laminae I und II des Dorsalhorns nicht nachweisbar sind. IB4 (Isolektin B4) markiert hingegen kleine, Schmerz-relevante, nicht-peptiderge Neurone in Laminae I und II des Rückenmarks. Die Doppelfärbungen verdeutlichen, dass microRNA-124a in den gleichen Regionen des Dorsalhorns detektierbar ist, die von der NF200-Färbung ausgespart bleiben und mit IB4 markiert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Abbildung 11 und die Annahme, dass microRNA-124a eine Rolle bei der Nozizeption spielen könnte. microRNA-124a liegt zudem auch in NF200-positiven Zellen vor, sodass von einer prinzipiellen microRNA-124a Expression in allen Neuronen auszugehen ist.

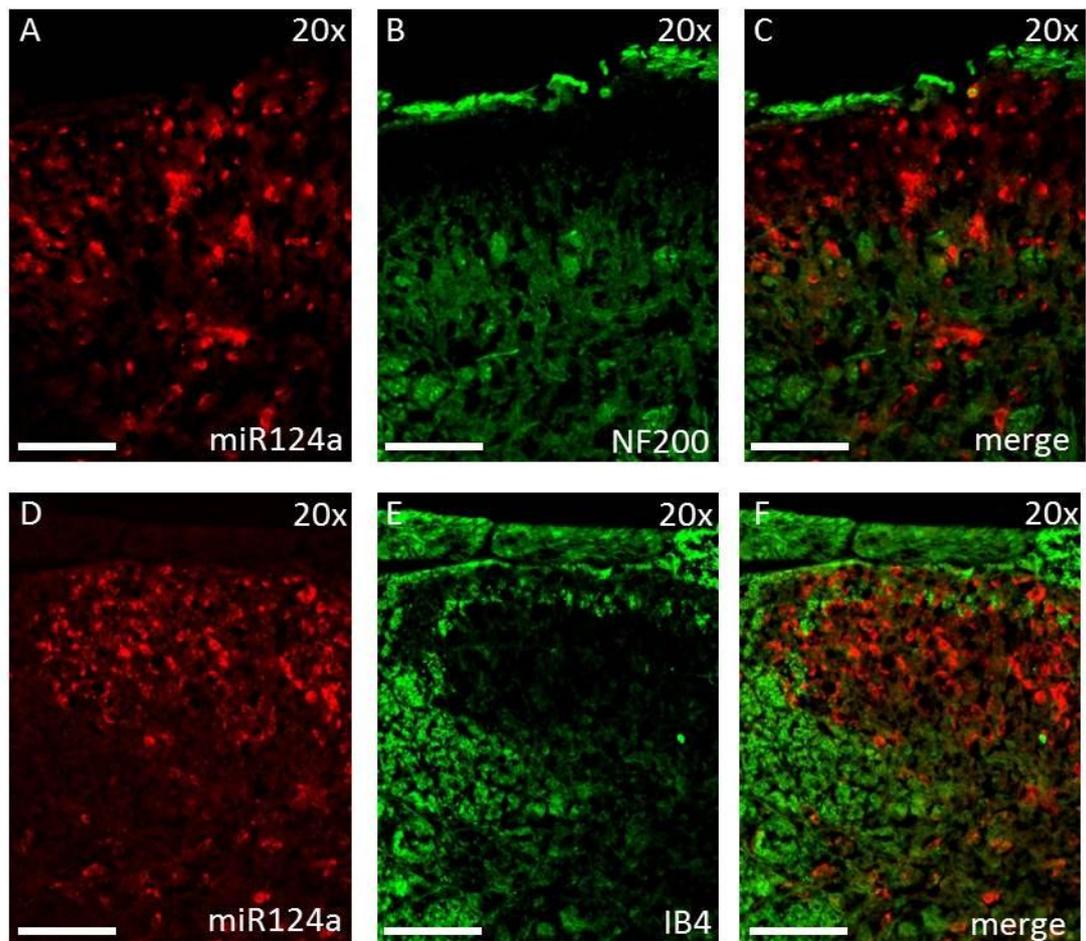


Abbildung 12: Kolokalisation von microRNA-124a mit neuronalen Zellmarkern im Dorsalhorn naiver C57BL/6 Mäuse. A, D: microRNA-124a ISH. B, E: Immunfluoreszenzfärbung von NF200 und IB4. C, F: Kolokalisierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Skalierung: 100 μ m.

Weitere Fluoreszenzfärbungen sollten schließlich Aufschluss über die Lokalisation von microRNA-124a in verschiedenen neuronalen Zelltypen liefern. Dafür wurden microRNA-124a *in situ* hybridisierte Rückenmarksschnitte mit Antikörpern gegen Neurone (NeuN), Astrozyten (GFAP) und Mikroglia (Iba1) inkubiert (siehe Abb. 13). Die Kolokalisation mit dem neuronalen Marker NeuN zeigt eine deutliche Expression von microRNA-124a in Rückenmarksneuronen, wohingegen microRNA-124a weder in Astrozyten noch in Mikroglia kolokalisiert werden konnte.

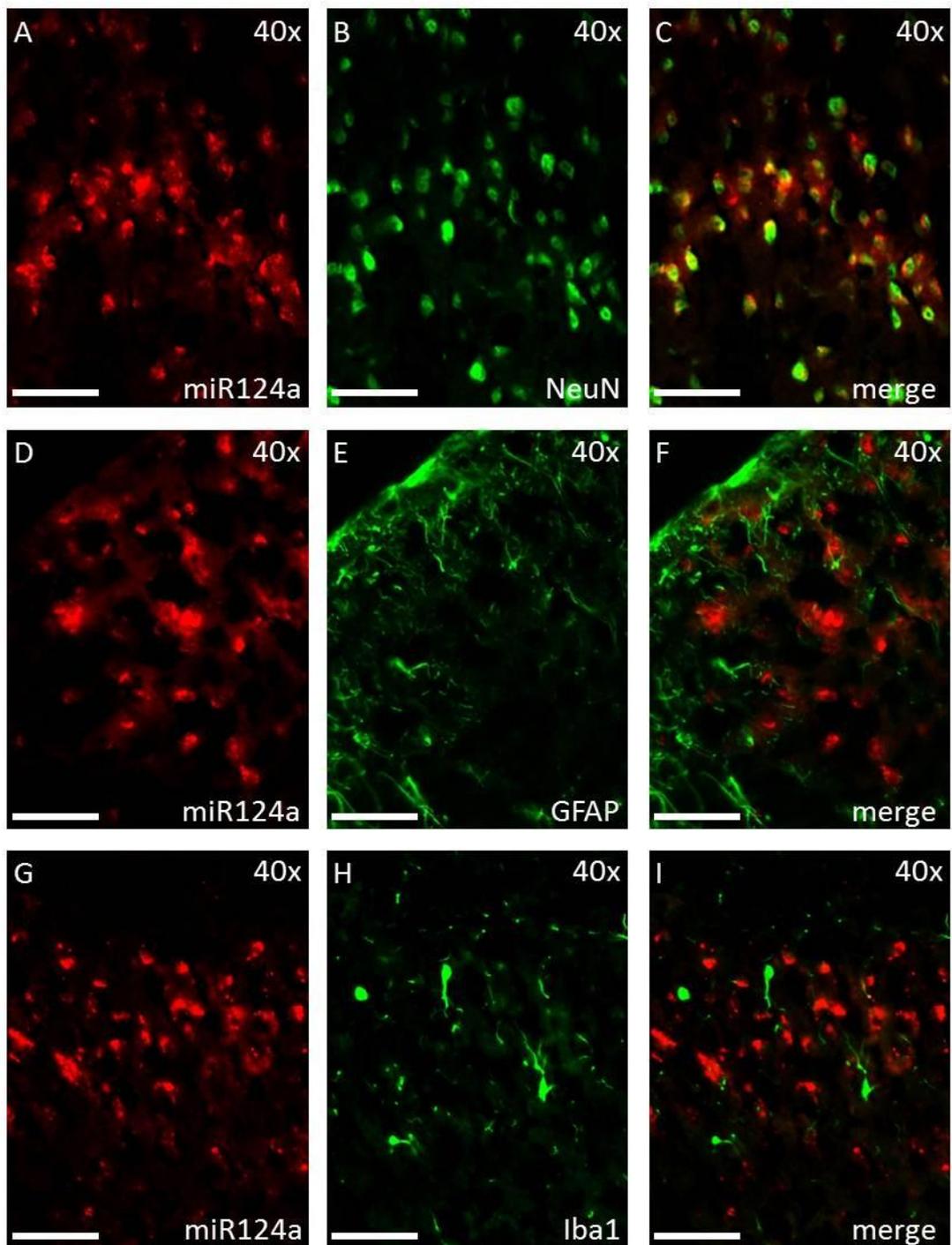


Abbildung 13: Kolokalisation von microRNA-124a mit weiteren neuronalen Zellmarkern im Dorsalhorn naiver C57BL/6 Mäuse. A, D, G: microRNA-124a ISH. B, E, H: Immunfluoreszenzfärbung von B, NeuN; E, GFAP und H, Iba1. C, F, I: Kolokalisierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Skalierung: 50 μ m.

Die Abbildung 14 zeigt die entsprechenden Kolokalisationen für microRNA-134 im Rückenmark naiver C57BL/6 Mäuse. Im Gegensatz zur chromogenen microRNA-134-Detektion (siehe Abb. 11) konnte mit der sensitiveren HNPP-Färbung eine Expression von microRNA-134 in Laminae I und II des Dorsalhorns nachgewiesen werden, was anhand der Kofärbung mit IB4 deutlich wird. Die Kolokalisationen mit Zellmarkern zeigen deutlich, dass

microRNA-134 in Neuronen des Rückenmarks (NeuN) exprimiert wird, nicht aber in Astrozyten (GFAP) und Mikroglia (Iba1) detektiert werden kann.

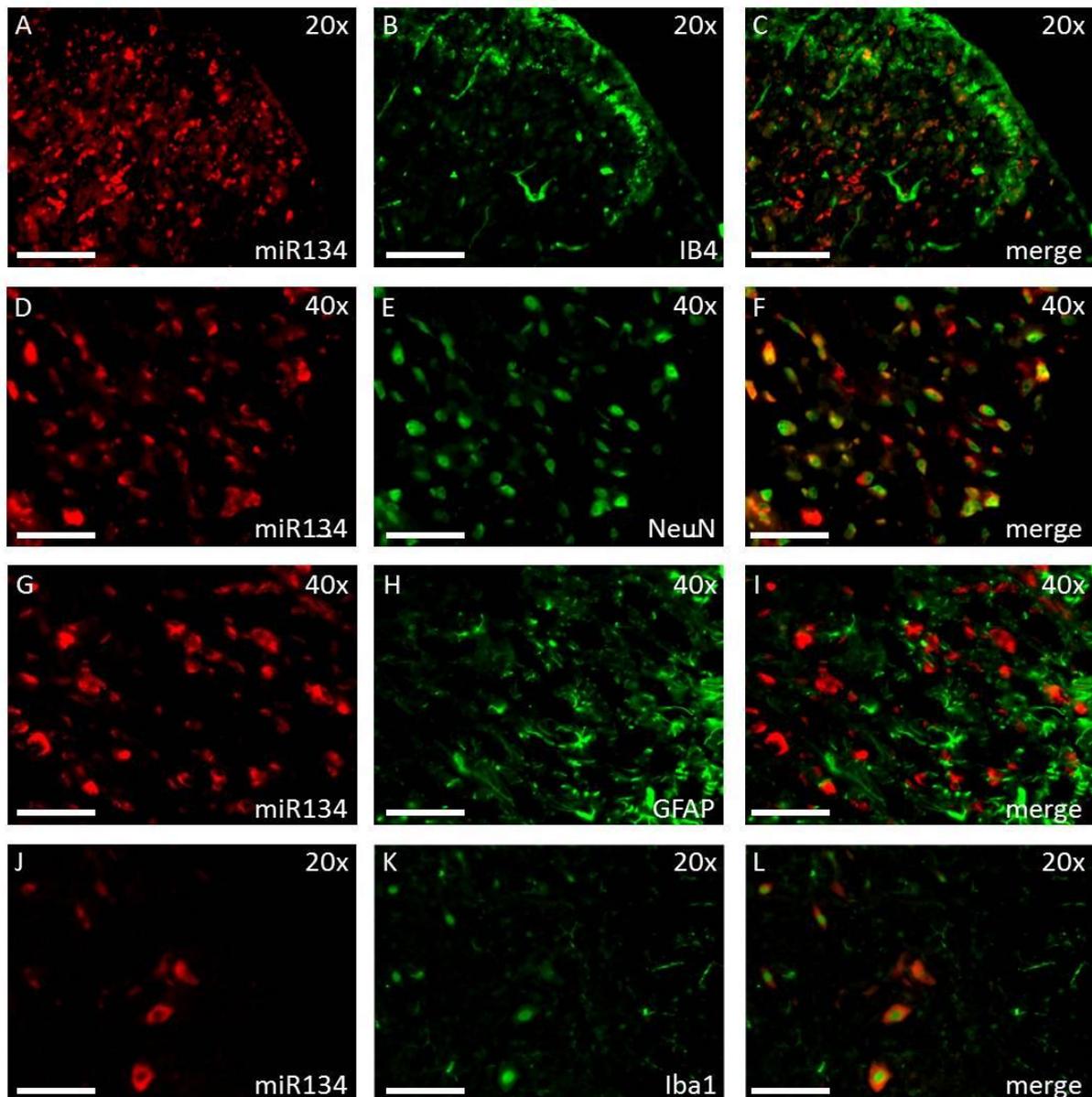


Abbildung 14: Kolokalisation von microRNA-134 mit neuronalen Zellmarkern im Dorsalhorn naiver C57BL/6 Mäuse. A, D, G, J: microRNA-134 ISH. B, E, H, K: Immunfluoreszenzfärbung von B, IB4; E, NeuN; H, GFAP und K, Iba1. C, F, I und L: Kolokalisierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Skalierung: A-C und J-L, 100 μ m; D-I, 50 μ m.

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte eindeutig gezeigt werden, dass microRNA-124a und -134 im Rückenmark neuronal exprimiert werden. Da insbesondere microRNA-124a in Neuronen der Schmerz-verarbeitenden Laminae I und II des Dorsalorns exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass diese microRNA Gen-regulierend an der synaptischen Transmission nozizeptiver Reize beteiligt ist. Aufgrund der zellulären Expression von microRNA-134

vorwiegend in großen, nicht-nozizeptiven Neuronen des Ventralhorns scheint diese für die Prozessierung von Schmerzen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

3.2.2 Kolokalisation von microRNAs mit neuronalen Zellen der Spinalganglien

Auch in den DRG-Gewebeschnitten naiver C57BL/6 Mäuse wurde microRNA-124a mit dem rot-fluoreszierenden AP-Substrat HNPP detektiert und mit grün-fluoreszierenden Zellmarkern kolokalisiert. Zur Identifizierung der microRNA-124a exprimierenden Zellen wurde das Gewebe mit den neuronalen Zellmarkern Stathmin-like 2 (STMN2), IB4 und NF200 inkubiert. Mit dem STMN2-Antikörper werden dabei sowohl die kleinen, nozizeptiven IB4-positiven als auch die großen, nicht-nozizeptiven NF200-positiven Neurone immunologisch angefärbt.

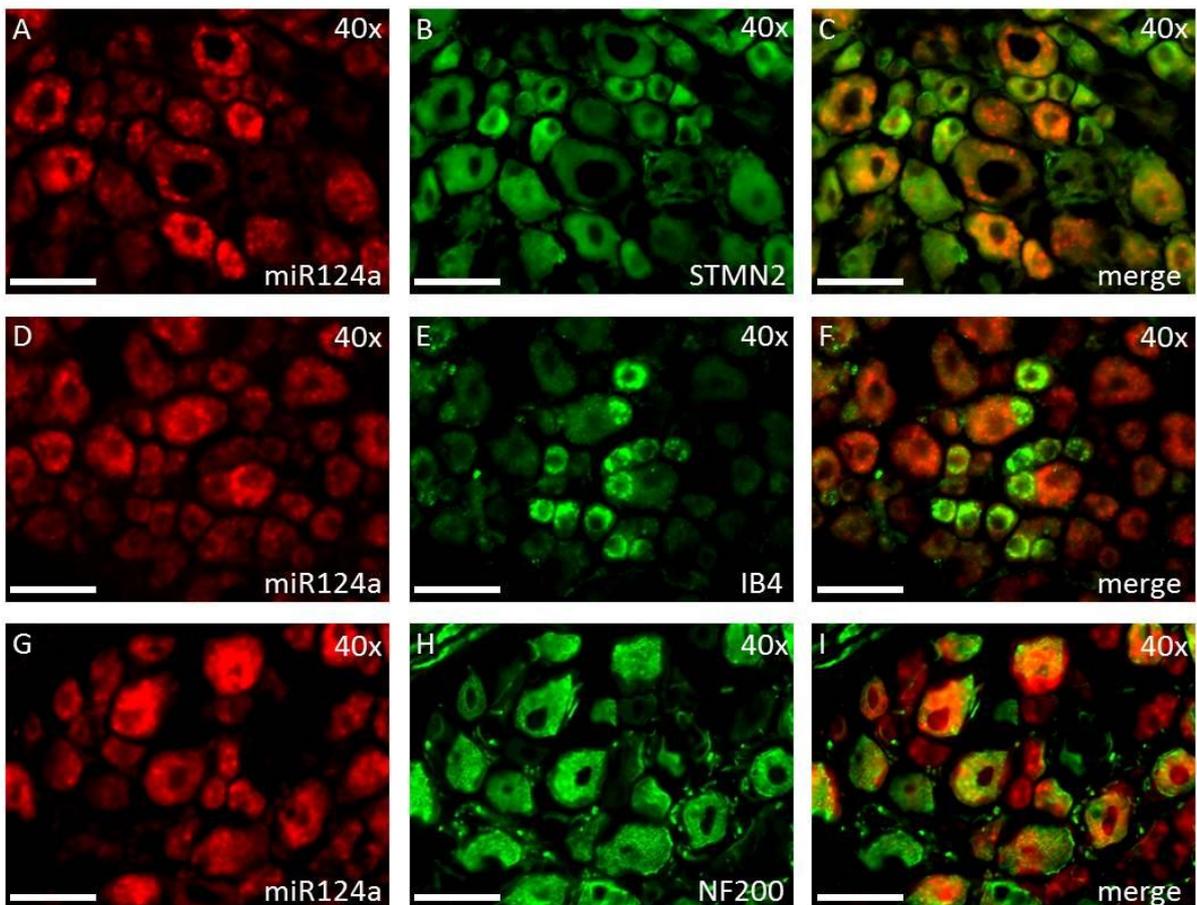


Abbildung 15: Kolokalisation von microRNA-124a mit neuronalen Zellmarkern in Spinalganglien naiver C57BL/6 Mäuse. A, D, G: microRNA-124a ISH. B, E, H: Immunfluoreszenzfärbung von B, STMN2; E, IB4 und H, NF200. C, F, I: Kolokalisierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Skalierung: 50 μ m.

Aus der Abbildung 15 wird ersichtlich, dass microRNA-124a in allen neuronalen Somata - allerdings in unterschiedlicher Intensität - exprimiert wird. Anhand der Kolokalisation mit den Zellmarkern STMN2 und NF200 ist zu erkennen, dass microRNA-124a vermehrt in den Zellkörpern nicht-nozizeptiver NF200-positiver Neurone und weniger in den Schmerzverarbeitenden IB4-positiven Afferenzen vorhanden ist.

Auch microRNA-134 wird in den Neuronen der Spinalganglien in unterschiedlicher Intensität exprimiert (siehe Abb. 16, Bild C). Eine vergleichende Betrachtung der Kolokalisation von microRNA-134 mit den Zellmarkern IB4 oder NF200 weist ebenfalls darauf hin, dass microRNA-134 vermehrt in den nicht-nozizeptiven NF200-positiven Neuronen der DRGs vorliegt.

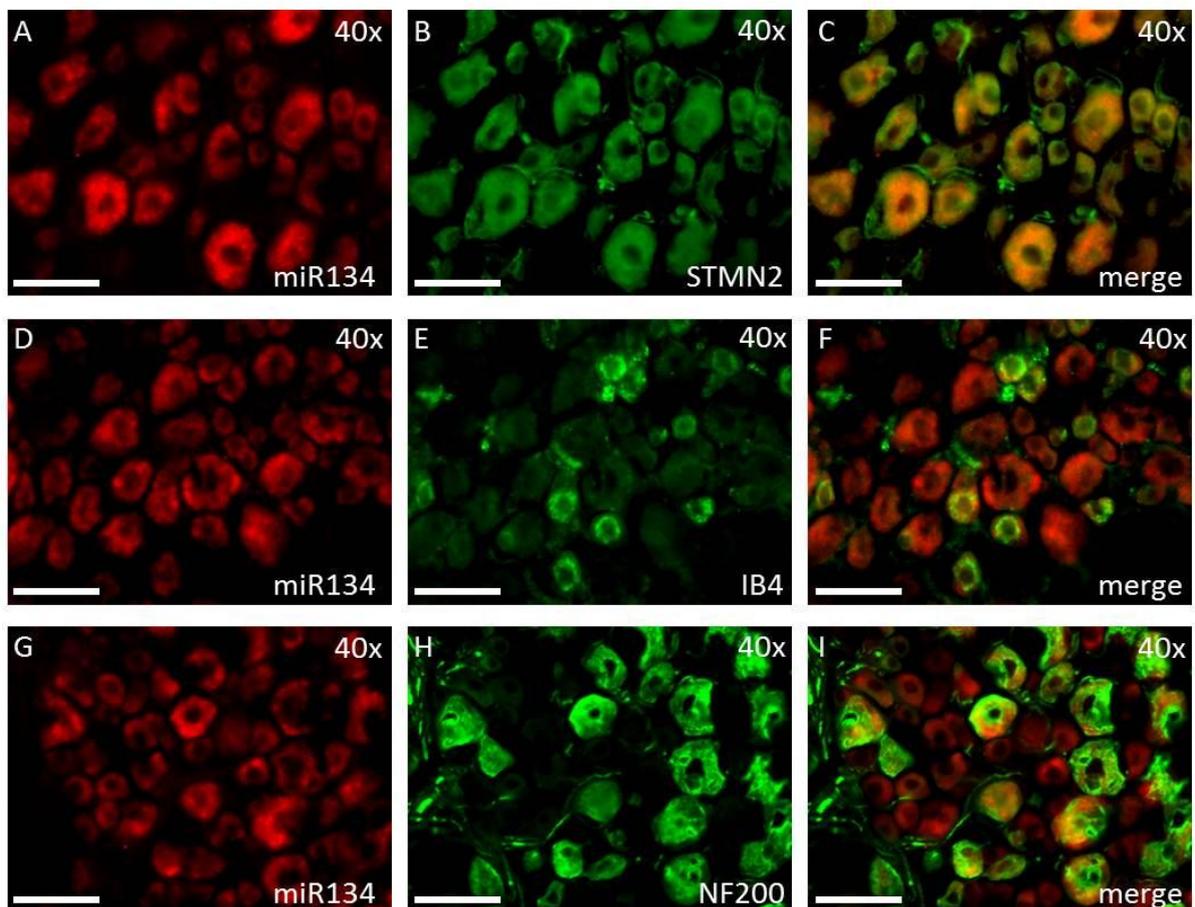


Abbildung 16: Kolokalisation von microRNA-134 mit neuronalen Zellmarkern in Spinalganglien naiver C57BL/6 Mäuse. A, D, G: microRNA-134 ISH. B, E, H: Immunfluoreszenzfärbung von B, STMN2; E, IB4 und H, NF200. C, F, I: Kolokalisierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Skalierung: 50 μ m.

Sowohl microRNA-124a als auch microRNA-134 werden demnach in nozizeptiven und nicht-nozizeptiven Neuronen der Spinalganglien exprimiert. Die Detektion der beiden microRNAs

in den IB4-positiven, kleinen, Schmerz-relevanten und nicht-peptidergen Neuronen, die in Laminae I und II des Rückenmarks enden, weist darauf hin, dass microRNA-124a und -134 Gen-regulierend in die periphere Schmerz-Transmission eingreifen könnten. Zudem scheinen beide microRNAs neben der peripheren Nozizeption weitere regulative Funktionen in den Spinalganglien zu übernehmen, was ihre Expression in den NF200-positiven, großen, myelinisierten, nicht-nozizeptiven Neuronen vermuten lässt.

3.3 Expression von microRNAs in neuronalen Primärzellen

3.3.1 Basale Expression von microRNA-124a und -134 in Primärzellen

Anhand der *in situ* Hybridisierung wurde ersichtlich, dass die beiden microRNAs-124a und -134 in Neuronen des Rückenmarks und der DRGs exprimiert werden. Ergänzend zu den Gewebeanalysen wurden Expressionsanalysen in primären Neuronen-, Astrozyten- und Mikrogliaulturen durchgeführt. In den Primärzellen wurde zunächst die basale Expression der beiden microRNAs quantifiziert und in Abbildung 17 unter Verwendung des Δ CT-Werts dargestellt. Hierbei ist beachten, dass ein kleiner Δ CT-Wert auf eine vergleichsweise hohe Genexpression hindeutet. Große CT-Werte hingegen spiegeln eine geringere Menge vorhandener cDNA des zu untersuchenden Zielgens wider. Unter Zuhilfenahme der qRT-PCR konnte die in der ISH bereits detektierte neuronale Expression der beiden microRNAs bestätigt werden. Zudem konnte auf diesem Weg eine basale Expression von microRNA-124a und -134 in unstimulierten Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Dabei wird microRNA-124a am stärksten in Mikroglia, weniger in Neuronen und kaum in Astrozyten exprimiert. microRNA-134 hingegen ist in allen drei Primärzellen ähnlich intensiv vorhanden, mit einer leicht vermehrten Expression in Astrozyten. Die immunhistochemisch nicht nachzuweisenden Kollokalisierungen der beiden microRNAs mit Astrozyten und Mikroglia ist wahrscheinlich methodischen Schwierigkeiten, bspw. in Form von hinderlichen, sterischen Antigen-Antikörper-Bindungen, oder einer unzureichenden mikroskopischen Auflösung geschuldet.

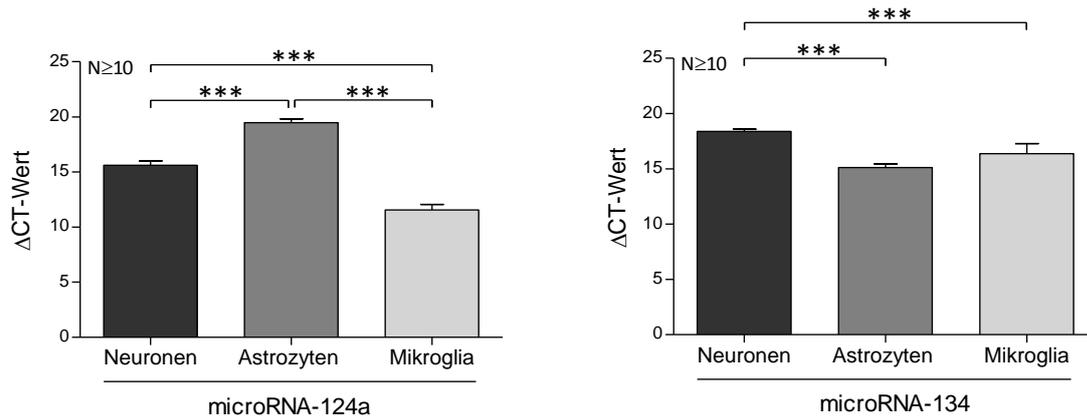


Abbildung 17: Expression von microRNA-124a (links) und microRNA-134 (rechts) in unstimulierten Primärzellen. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM der ΔCt -Werte mindestens zehn voneinander unabhängiger Proben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einfaktoriellen ANOVA-Test nach Bonferroni-Korrektur; $p < 0,001$ (***)

3.3.2 Stimulation neuronaler Primärzellen mit inflammatorischen Mediatoren

Neben der basalen Expression von microRNA-124a und -134 wurde zudem deren Regulation in primären Neuronen-, Astrozyten- und Mikrogliaulturen nach Stimulation mit einem Zytokinmix untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 5 ng/ml TNF- α , 1 ng/ml IL-1- β und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS für 30 Minuten, 1 und 24 Stunden inkubiert. Nach den entsprechenden Zeitperioden wurde die RNA isoliert und die microRNAs per qRT-PCR quantifiziert. Dabei konnte in Neuronen die Repression von microRNA-124a 24 Stunden nach der Stimulation mit den inflammatorischen Mediatoren detektiert werden (siehe Abb. 18 A). In stimulierten Mikroglia wird microRNA-124a ebenfalls gehemmt. In diesen ZNS-spezifischen Immunzellen setzt die Regulation von microRNA-124a bereits nach 30 Minuten ein und bleibt bis zu 24 Stunden nach Stimulation mit Zytokinen stabil. Die unter inflammatorischen Bedingungen ausgeprägte Regulation von microRNA-124a in Mikroglia deutet darauf hin, dass microRNA-124a maßgeblich an der Regulation entzündlicher Prozesse durch Mikroglia beteiligt ist. In Astrozyten wird microRNA-124a trotz der Stimulation mit Entzündungsmediatoren nicht reguliert. Auch microRNA-134 wird 30 Minuten und 24 Stunden nach der Stimulation mit Zytokinen in Mikroglia signifikant gehemmt. Allerdings ist diese Regulation nicht so ausgeprägt, wie die Repression von microRNA-124a (siehe Abb. 18 B). In Neuronen und Astrozyten dagegen wird microRNA-134

durch die Stimulation mit dem Zytokinmix nicht signifikant, bzw. in Astrozyten lediglich tendenziell nach 1 und 24 Stunden gehemmt.

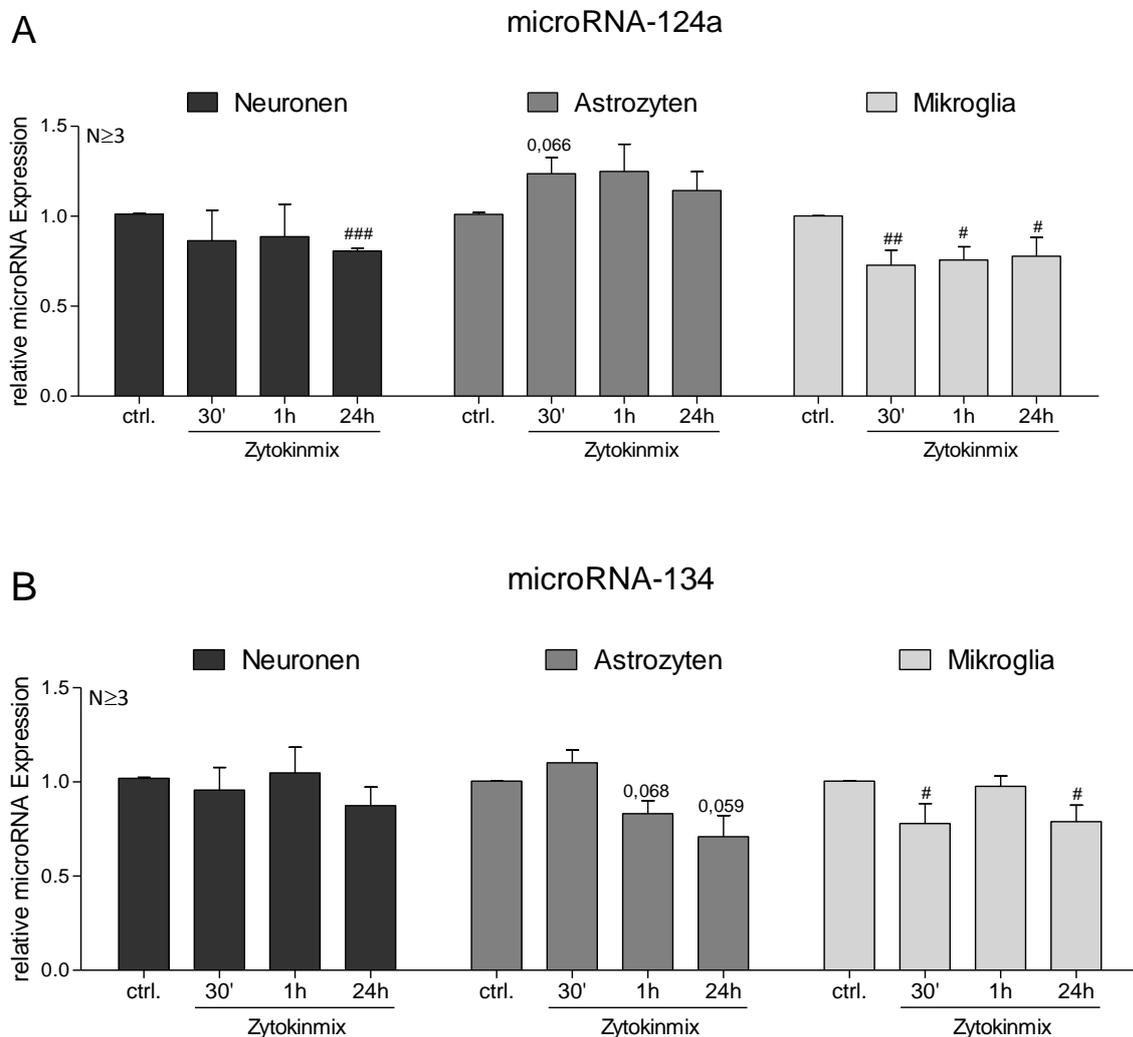


Abbildung 18: Expression von microRNA-124a (A) und microRNA-134 (B) in Primärzellen nach der Stimulation mit Zytokinmix. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM mindestens drei voneinander unabhängiger Proben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test: $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###).

Ausgehend von den quantitativen Expressionsanalysen beider microRNAs in den Primärzellen und in den Mausgeweben, sowie hinsichtlich ihrer Lokalisierung scheint vor allem eine Beteiligung von microRNA-124a an der Schmerzverarbeitung nahe liegend. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Rolle der microRNA-124a näher untersucht.

3.4 *In vitro* microRNA-124a-Expressionskontrolle mittels microRNA-Modulatoren

Um die Funktion von microRNA-124a im Schmerzmodell zu untersuchen, wurden zunächst microRNA-124a-Modulatoren hinsichtlich ihrer Spezifität und Funktionalität *in vitro* getestet. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit einem pMIR-REPORT™-Luziferase-Vektor, in den die microRNA-124a-Zielsequenz kloniert wurde, führt zur Expression von microRNA-124a. Durch die Kotransfektion mit spezifischem microRNA-124a-Inhibitor oder –Mimic kann zudem der microRNA-124a-Gehalt und dementsprechend die Expression der Luziferase beeinflusst werden. Bei den Inhibitoren handelt es sich um spezifische einzelsträngige Oligonukleotid-Sequenzen, die an die entsprechende prozessierte und funktionsreife microRNA komplementär binden. Die Repression der jeweiligen Ziel-mRNA wird dadurch unterbunden und die microRNA bedingte Translationsinhibierung aufgehoben. LNA-Moleküle stabilisieren dabei das Rückgrat der einzelsträngigen microRNA-Inhibitoren, um so deren endogenen Abbau zu verhindern. Pre-miRNAs, die Vorstufen der reifen microRNAs, werden indes als „Mimetika“/Mimics eingesetzt. Im Gegenteil zu den microRNA-Inhibitoren werden microRNA-Mimics endogen in funktionsfähige microRNAs prozessiert, erhöhen damit den Gehalt an physiologisch aktiver microRNA und verstärken so die Translationsinhibierung von Ziel-mRNAs. Um diese theoretisch beschriebene microRNA-Ziel-mRNA-Expressionskontrolle zu validieren, wurden Kotransfektionen des pMIR-REPORT™-Luziferase-Vektors (pMIR-Luc), der microRNA-124a kodiert, mit pre-miRNA-124a oder miRNA-124a-Inhibitor bzw. den entsprechenden unspezifischen Kontroll-Oligonukleotiden (#) durchgeführt und anschließend die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Luziferase-Aktivität unterliegt dabei einer Translationskontrolle durch microRNA-124a, die bei der Bindung an ihre Zielsequenz die Expression des Luziferase-Gens unterbindet. Die Transfektionseffizienz wurde durch die zusätzliche Transfektion des pMIR-β-Galaktosidase-Kontrollplasmids berücksichtigt. Die Kotransfektion des spezifischen microRNA-124a-Inhibitors führt demgemäß zur Derepression des Luziferase-Gens und resultiert in einer vermehrten Luziferase-Aktivität, wohingegen die Kotransfektion der spezifischen pre-miRNA-124a die Repression des Luziferase-Gens verstärkt und demnach eine verringerte Luziferase-Aktivität zur Folge hat. Die unspezifischen Kontroll-Oligonukleotide sollten die Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Vektor-Kontroll-Transfektion nicht beeinflussen, da es hier zu keiner spezifischen Interaktion

zwischen Oligonukleotid und Vektor kommt. In der Abbildung 19 ist die Luziferase-Aktivität verschiedener Kontransfektionen unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz dargestellt. Die durchgeführten *in vitro* Transfektionen bestätigen das hypothetische Modell der microRNA-Ziel-mRNA-Interaktion und belegen, dass beide microRNA-124a-Modulatoren zum einen funktionsfähig sind und zum anderen die endogene microRNA-124a spezifisch regulieren. Basierend auf dieser Erkenntnis war ein *in vivo* Einsatz gerechtfertigt.

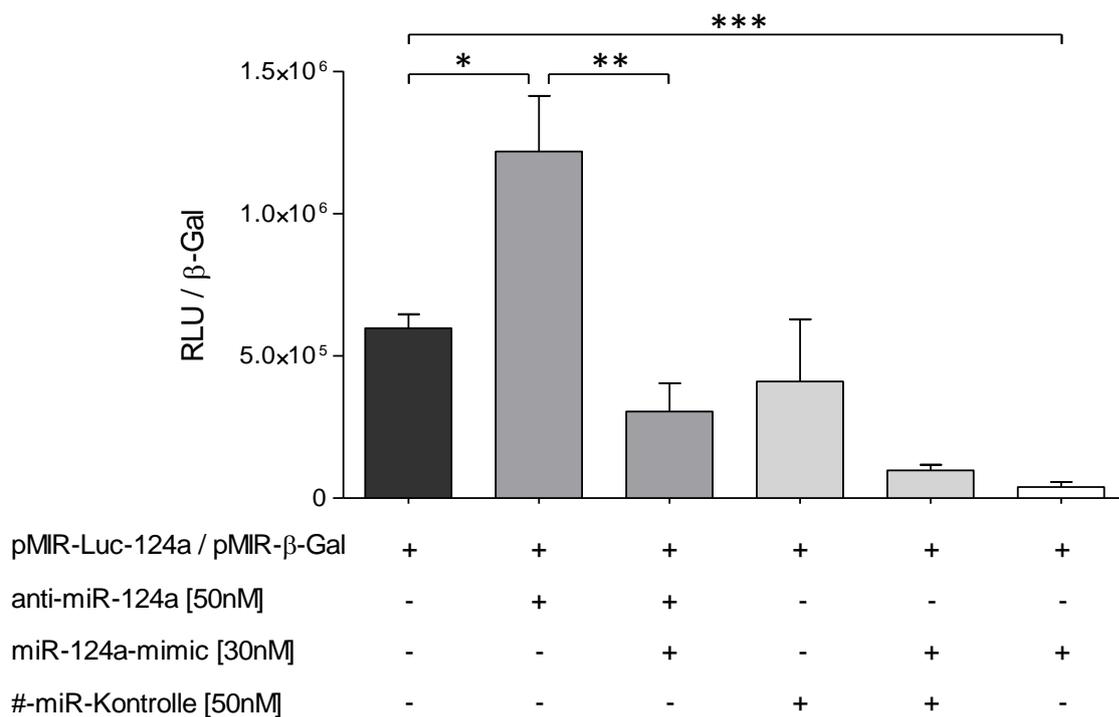


Abbildung 19: Luziferase-Assay, HeLa-Zellen wurden mit einem pMIR-REPORT™-Luziferase-Vektor transfiziert und zusätzlich mit miR-124a-Inhibitor oder –Mimic bzw. deren Kontrolloligonukleotiden (#) behandelt. Die Luziferase-Aktivität wurde nach 24 Stunden gemessen und unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz anhand eines β -Galaktosidase-ELISA (Kotransfektion des pMIR-REPORT™- β -Gal-Kontrollvektors) analysiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM mindestens drei voneinander unabhängiger Proben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einfaktoriellem ANOVA-Test nach Bonferroni-Korrektur: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

3.5 *In vivo* Effekte der microRNA-124a-Modulatoren

Basierend auf der validierten Funktionalität und Spezifität der microRNA-124a-Modulatoren wurde der *in vivo* Effekt dieser beiden Moleküle auf die entzündliche Nozizeption im Formalin-Test näher untersucht. Durch die subkutane Injektion von Formalin in die Dorsalseite der Hinterpfote wird ein biphasisches Schmerzverhalten ausgelöst (Hunskar et

al. 1985), das sich in die Phase des akuten Schmerzes (Phase 1, 0-10 Minuten) und die entzündungsbedingte tonische Phase (Phase 2, 11-45 Minuten) unterteilen lässt. Die akute Phase wird durch die direkte Aktivierung von A δ -Fasern ausgelöst, wohingegen die tonische Phase u.a. auf erste zentrale Sensibilisierungsmechanismen im Rückenmark zurückzuführen ist (Coderre et al. 1990; Tjølsen et al. 1992). Um die Formalin-induzierte Regulation von microRNA-124a im Kontext inflammatorischer Schmerzen besser zu verstehen, wurden 1 mg/kg Körpergewicht des microRNA-124a-Inhibitors oder des –Mimics 30 Minuten vor der subkutanen Formalin-Injektion intravenös appliziert und das Schmerzverhalten anhand des Formalin-Tests eine Stunde lang beobachtet (siehe Kap. 2.1.6 & 2.1.2.1). Zum Vergleich wurde außerdem das Schmerzverhalten nach Injektion von Vehikel (PBS) bzw. #-Kontroll-Oligonukleotid im Formalin-Test analysiert. Nach Beendigung des Verhaltenstests wurde das Rückenmark exzidiert und die endogene Konzentration von microRNA-124a via qRT-PCR quantifiziert. Die Analyse der im Rückenmark exprimierten microRNA-29a (siehe Abb. 20 C & 21 C) diene dabei als Kontrolle zur Validierung der spezifischen microRNA-124a-Modulation. Auf eine intrathekale Applikation der microRNA-Modulatoren wurde in dieser Arbeit verzichtet, da in Vorarbeiten beobachtet werden konnte, dass bereits das bloße Einführen der Injektionsnadel in den Spinalkanal die Expression entzündlicher Mediatoren im Rückenmark hervorruft.

Die Abbildung 20 A zeigt den Zeitverlauf des Formalin-induzierten, nozizeptiven Verhaltens über 60 Minuten. Bei beiden Kontrollen war der für den Formalin-Test typische, biphasische Verlauf zu beobachten. Durch die Applikation von microRNA-124a-Inhibitor wurde indes das Schmerzverhalten in der tonischen Phase 2 ab Minute 11-45 deutlich verstärkt. Die Gesamt-Leckzeit in Phase 2 war nach statistischer Auswertung bei microRNA-124a-Inhibitor-behandelten Tieren signifikant erhöht (siehe Abb. 20 A, Einschub). Die Quantifizierung der endogenen microRNA-124a Konzentration im Rückenmark dieser Mäuse zeigte eine signifikante Verringerung der microRNA-124a Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abb. 20 B). Die Konzentration von microRNA-29a bleibt dagegen bei Applikation des microRNA-124a-Inhibitors unbeeinflusst, wodurch die Spezifität des microRNA-124a-Modulators auch *in vivo* bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Applikation des microRNA-124a-Inhibitors ein verstärktes Schmerzverhalten hervorruft, bzw., dass die Inhibierung von microRNA-124a eine pro-nozizeptive Wirkung erzeugt.

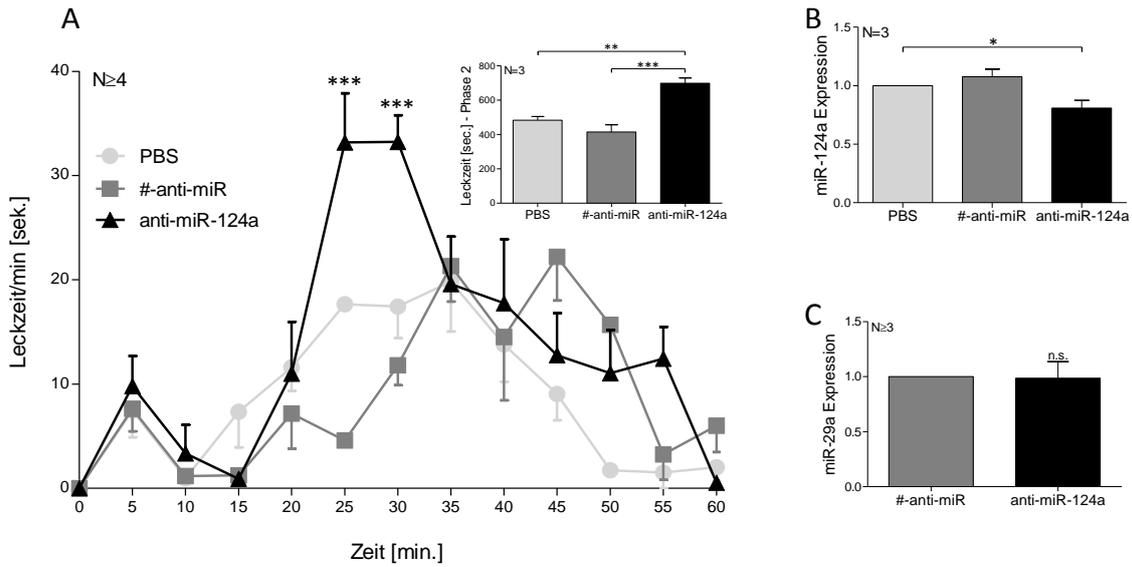


Abbildung 20: Formalin-Test nach i.v.-Applikation des microRNA-124a-Inhibitors (1 mg/kg KG), des Kontrolloligonukleotids (#) und des Vehikels (PBS). A: Zeitverlauf des Schmerzverhaltens nach Formalin-Injektion, Insert: Statistische Auswertung der Phase 2, B und C: microRNA-124a (B) und microRNA-29a (C) Expression im Rückenmark. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem einfaktoriellen ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) bzw. anhand des ungepaarten t-Tests für die einzelnen Zeitpunkte des Formalin-Tests (Minute 25 und 30), $p < 0,001$ (***)).

Die intravenöse Injektion des microRNA-124a Mimics induziert indes ein verringertes Schmerzverhalten im Vergleich zu den respektiven Kontrollen. Die Hemmung des nozizeptiven Verhaltens ist in Phase 2 (Minute 11-45) des Formalin-Tests statistisch signifikant (siehe Abb. 21 A). Anhand der qRT-PCR-Analysen konnte ferner eine signifikant erhöhte microRNA-124a Konzentration, aber kein Einfluss auf die microRNA-29a Konzentration im Rückenmark nachgewiesen werden (siehe Abb. 21 B & C). Die spezifische Erhöhung von microRNA-124a im Rückenmark führt demnach zu einer Hemmung der inflammatorischen Nozizeption.

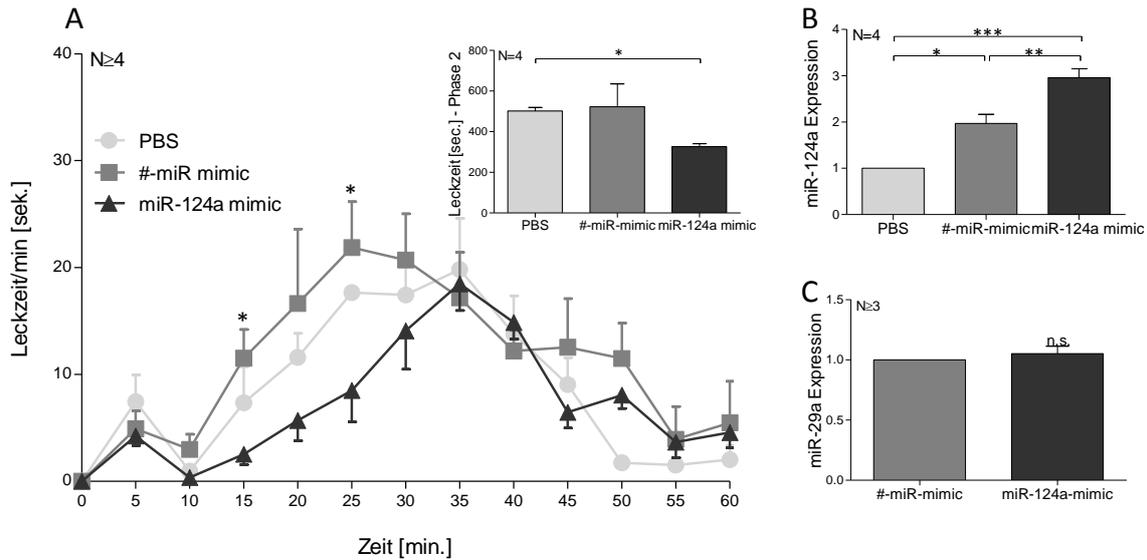


Abbildung 21: Formalin-Test nach i.v.-Applikation des microRNA-124a Mimics (1 mg/kg KG), des Kontrolloligonukleotids (#) und des Vehikels (PBS). A: Zeitverlauf des Schmerzverhaltens nach Formalin-Injektion, Insert: Statistische Auswertung der Phase 2, B und C: microRNA-124a (B) und microRNA-29a (C) Expression im Rückenmark. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung des Formalin-Tests erfolgte anhand des ungepaarten t-Tests (Minute 15 und 25, sowie Phase 2), $p < 0,05$ (*), die der Expressionsanalysen mit dem einfaktoriellen ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Die *in vivo* Modulation der microRNA-124a Konzentration zeigt, dass die Repression von microRNA-124a das Schmerzverhalten im Formalin-Test steigert, wohingegen die Erhöhung endogener microRNA-124a zu einer Hemmung der Nozizeption führt. Dies deutet darauf hin, dass microRNA-124a entscheidend an der Regulation von entzündlichen Schmerzen beteiligt ist. Um dieser Annahme nachzugehen, wurde die Regulation mehrerer inflammatorischer Mediatoren im Rückenmark von Formalin-behandelten Tieren, die zusätzlich entweder microRNA-124a-Inhibitor bzw. microRNA-124a Mimic erhielten, mittels qRT-PCR quantifiziert. In der Abbildung 22 ist die relative Expression der Entzündungsmarker c-Fos, COX-2, IL-1- β und TNF- α im Rückenmark nach der Applikation der spezifischen microRNA-124a-Modulatoren im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (#) dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Formalin-induzierte Hochregulation der Markergene im Rückenmark der mit Inhibitor behandelten Tiere verstärkt war, während nach Applikation des Mimics die Induktion der inflammatorischen Mediatoren, mit Ausnahme von TNF- α , ausblieb. Die Modulation der endogenen microRNA-124a Konzentration führt folglich zu einer veränderten Expression anerkannter Entzündungsmarker im Rückenmark und unterstützt die Hypothese, dass die Repression von microRNA-124a das Schmerzverhalten, u.a. durch die vermehrte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren verstärkt, während eine erhöhte microRNA-124a Konzentration die Induktion der Entzündungsproteine verhindert

und auf diese Weise antinozeptive Effekte zur Folge hat. Allerdings handelt es sich hierbei wahrscheinlich lediglich um einen indirekten Einfluss auf die nozeptive Reaktion, da keiner der Entzündungsmarker in seiner mRNA eine Bindestelle für microRNA-124a besitzt und diese somit keine direkten Ziel-mRNAs von microRNA-124a darstellen können. Die Frage, welche direkten Target-mRNAs für die veränderte Nozeption verantwortlich sind, konnte mit diesem Versuchsansatz noch nicht geklärt werden.

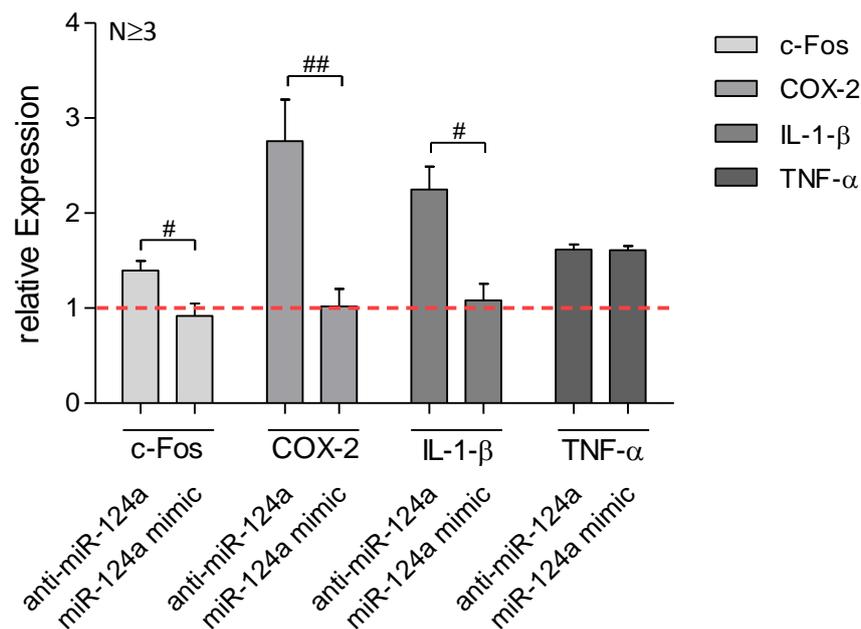


Abbildung 22: Regulation anerkannter Schmerz- und Entzündungsmediatoren im Rückenmark nach peripherer Injektion von Formalin und i.v.-Applikation des microRNA-124a-Inhibitors oder des –Mimics. Dargestellt ist die mRNA-Expression nach Applikation der spezifischen microRNA-124a-Modulatoren im Vergleich zu den respektiven Kontrolloligonukleotiden (#). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kontrollen mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode gleich 1 gesetzt (rote Linie). Die statistische Auswertung erfolgte anhand des ungepaarten t-Tests: $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##).

3.6 microRNA-124a im peripheren Nervensystem

Obwohl microRNA-124a durch entzündliche Stimulation in Spinalganglien differenziell und nach 24 Stunden signifikant reguliert wird (siehe Abb. 8 B), konnte zwei Stunden nach der Formalin-Injektion keine veränderte microRNA-124a Expression in ipsilateralen versus contralateralen Spinalganglien festgestellt werden. Darüber hinaus zeigten Expressionsanalysen ipsi- versus contralateraler Spinalganglien der behandelten Tiere, dass die Applikation der spezifischen Modulatoren die endogene microRNA-124a Konzentration

in den DRGs nicht signifikant veränderte. Da microRNA-124a in den DRGs zudem vermehrt in nicht-nozizeptiven, NF200-positiven Neuronen exprimiert wird (siehe Abb. 15) scheint microRNA-124a bei der peripheren Formalin-induzierten, entzündlichen Schmerzprozessierung keine Rolle zu spielen. Diese Beobachtungen unterstützen daher die in dieser Arbeit vorliegenden Hinweise, dass microRNA-124a eine potenzielle Funktion bei der spinalen Schmerztransmission besitzt.

3.7 microRNA-124a-Ziel-mRNA Identifizierung

Da microRNA-124a entscheidenden Einfluss auf das entzündliche Schmerzverhalten hat, war es von Interesse die zugrunde liegenden Mechanismen der microRNA-124a bedingten Regulation zu eruieren und Ziel-Transkripte zu identifizieren. Es ist bereits bekannt, dass microRNA-124a als ZNS-spezifische microRNA sehr viele nicht-neuronale Transkripte reprimiert, um eine neuronale Integrität zu bewahren (Lim et al. 2005). Im adulten Gehirn stellt microRNA-124a gar 25-48 % aller microRNAs dar (Lagos-Quintana et al. 2002) und mehr als 1100 Gene besitzen eine konservierte „seed“-Bindestelle für microRNA-124a (Lewis et al. 2005). Zudem ist microRNA-124a von den Invertebraten bis zu den Vertebraten so stark konserviert wie kaum eine andere microRNA (Ambros 2004). Um die Fülle an potenziellen Ziel-mRNAs einzudämmen und Schmerz-relevante Targets zu finden, wurden *in silico* Recherchen unter Verwendung bekannter Datenbanken, z.B. TargetScan, miRecords, microRNA.org und Netzwerkanalysen mit Hilfe der Ingenuity®-Software durchgeführt. Durch Abgleich dieser Analysen mit mRNA-Microarray-Daten von Rückenmarksproben naiver und nozizeptiv stimulierter C57BL/6 Mäuse (siehe Kap. 2.1.2.1) konnten drei microRNA-124a-Targets identifiziert werden, die die Genexpression über epigenetische Modifikationen der DNA oder der Histone regulieren. Da auch microRNAs über den Mechanismus der RNA-Interferenz in die Regulation der Gentranskription eingreifen, ist ein Zusammenspiel zwischen microRNA-124a und den vorhergesagten Targets MeCP2 (Methyl-CpG-Binding Protein 2), HDAC5 (Histon-Deacetylase 5) und MYST2 (MYST Histon-Acetyltransferase 2) bei der entzündlichen Nozizeption denkbar. Diese Annahme wird zudem durch mehrere, kürzlich erschienene Studien gestützt, in denen microRNA-124a bzw. MeCP2, DNA-Methyltransferasen und Histondeacetylasen mit chronischen Schmerzen assoziiert werden

konnten (Bai et al. 2010; Tochiki et al. 2012; Willemsen et al. 2012). Prozesse der Epigenetik konnten oftmals schon mit chronischen Schmerzen und Mechanismen der Analgesie in Verbindung gebracht werden (Denk/McMahon 2012; Döhning et al. 2011). Um eine mögliche Interaktion der genannten Targets mit microRNA-124a bei der entzündlichen Nozizeption zu untersuchen, wurden zunächst microRNA-124a sowie MeCP2, HDAC5 und MYST2 im dorsalen Rückenmark naiver C57BL/6 Mäuse mittels ISH bzw. immunhistochemisch nachgewiesen (siehe Abb. 23). Dabei konnte eine Kolokalisation von microRNA-124a mit MeCP2 und MYST2 in Neuronen des Dorsalhorns (siehe Abb. 23 C & I) bzw. von microRNA-124a und HDAC5 in Neuronen des Ventralhorn des Rückenmarks gezeigt werden (siehe Abb. 23 F). Die Kolokalisation von microRNA-124a mit MeCP2 bzw. MYST2 im Dorsalhorn deutet darauf hin, dass eine mögliche Interaktion dieser Targets mit microRNA-124a die Schmerztransmission beeinflusst. Die ventrale Expression von HDAC5 lässt dagegen vermuten, dass durch eine theoretische Interaktion mit microRNA-124a, die im Ventralhorn nur sehr schwach exprimiert wird, Prozesse der Motorik reguliert werden könnten.

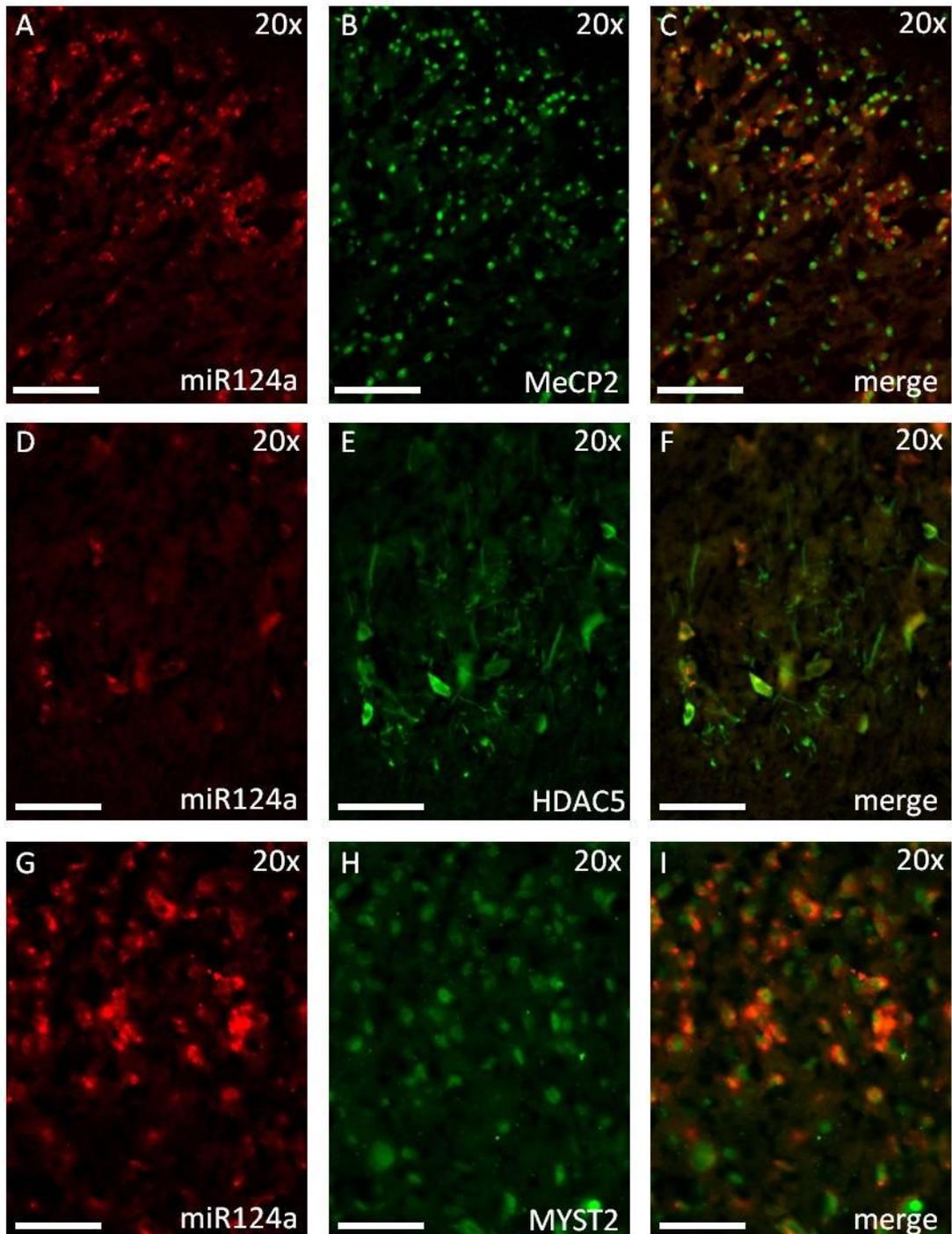


Abbildung 23: Kolokalisation von microRNA-124a mit Zielproteinen im Rückenmark naiver C57BL/6 Mäuse. A, D, G: microRNA-124a ISH. B, E, H: Immunfluoreszenzfärbung von B, MeCP2; E, HDAC5 und H, MYST2. C, F, I: Kolokalisierung der Immunfluoreszenzfärbungen. Skalierung: 100 μ m.

Anhand von qRT-PCR-Analysen konnte außerdem zwei Stunden nach peripher nozizeptiver Stimulation mit Formalin in eine Hinterpfote eine gegensätzliche Regulation von microRNA-124a und MeCP2 im Rückenmark festgestellt werden. Durch beidseitiges Injizieren von Formalin konnte diese Regulation noch einmal verstärkt werden (siehe Abb. 24). Neben der

Repression von microRNA-124a und der Hochregulation von MeCP2 wurde die Transkription von BDNF, einem pro-inflammatorischen Neuropeptid und direkten Zielgen von MeCP2 (Chen et al. 2003; Zhao et al. 2006), bei der entzündlichen Stimulation mit Formalin ebenfalls verstärkt. Auch HDAC5 und MYST2 werden durch die Stimulation mit Formalin im Rückenmark tendenziell vermehrt exprimiert. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Hinsichtlich einer möglichen Funktion bei der Schmerzregulation erscheint MeCP2 folglich als das wahrscheinlichste der drei untersuchten microRNA-124a Targets.

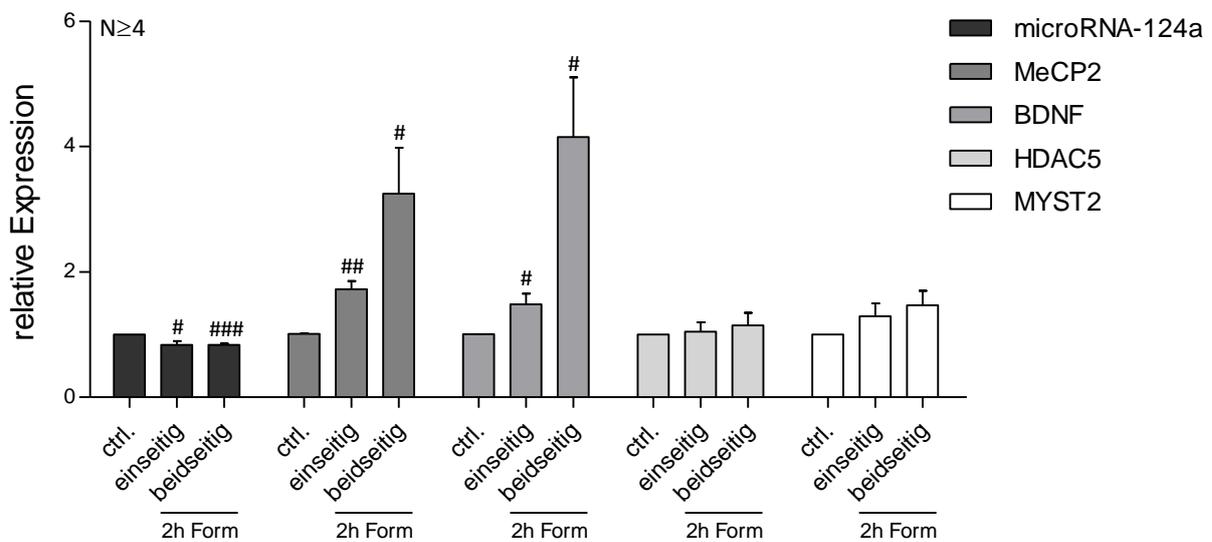


Abbildung 24: qRT-PCR-Expressionsanalyse der ZNS-spezifischen microRNA-124a, der Ziel-mRNAs MeCP2, sowie dessen Targetgen BDNF, HDAC5 und MYST2 im Rückenmark 2 Stunden nach peripherer Injektion von Formalin in eine oder beide Hinterpfoten. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des ungepaarten t-Tests: $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###).

3.8 Validierung der Target-mRNAs von microRNA-124a

Zur Überprüfung der Annahme, dass es sich bei MeCP2, HDAC5 und MYST2 um direkte Ziel-mRNAs von microRNA-124a handelt, wurde die Regulation der microRNA-Targets und BDNF in Rückenmarksproben von Mäusen nach Behandlung mit microRNA-124a-Inhibitor bzw. Mimic oder unspezifischem Kontroll-Oligonukleotid (#) via qRT-PCR analysiert (siehe Abb. 25). Wie bereits in Abbildung 20 und Abbildung 21 gezeigt werden konnte, führte die Applikation des spezifischen Inhibitors zu einer signifikanten Repression, die des Mimics zu einer Erhöhung der Formalin-abhängigen microRNA-124a Konzentration. Die Hemmung von

microRNA-124a ging mit einer vermehrten Expression von MeCP2 einher, während die Überexpression von microRNA-124a den MeCP2-Gehalt reduzierte. Diese gegensätzliche Regulation von microRNA-124a und MeCP2 im Rückenmark der behandelten Tiere unterstützt wiederum die Hypothese einer direkten Interaktion dieser beiden Moleküle. Die vermehrte Expression von MeCP2 nach entzündlicher Stimulation und anschließender Applikation des microRNA-124a-Inhibitors konnte zudem mit einer Erhöhung der BDNF-Konzentration assoziiert werden. Während nach Verabreichung des Mimics sowohl die MeCP2- als auch BDNF-mRNA-Level vermindert waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass microRNA-124a über die Regulation von MeCP2 einen direkten Einfluss auf die Expression des pro-inflammatorischen BDNF bei der entzündlichen Nozizeption hat. Die im Formalin-Test beschriebene antinozizeptive Wirkung des microRNA-124a Mimics kann somit u.a. auf eine Inhibierung von BDNF zurückgeführt werden. Betrachtet man zudem die Regulation von HDAC5 und MYST2 sowohl nach Applikation des microRNA-124a-Inhibitors als auch nach Gabe des microRNA-124a Mimics, so wird die jeweils gegenläufige Regulation von microRNA-124a offenbar. Die *in silico* und anhand des mRNA-Arrays identifizierten microRNA-124a Targets MeCP2, HDAC5 und MYST2 konnten demnach durch die Modulation von microRNA-124a *in vivo* im Rückenmark entzündlich-stimulierter Mäuse validiert werden. Die Validierung von MeCP2, HDAC5 und MYST2 als direkte Ziel-mRNAs der neuronal exprimierten, ZNS-spezifischen, microRNA-124a und die damit einhergehende Regulation von BDNF bestärken die Hypothese, dass microRNA-124a möglicherweise über die Regulation epigenetischer Mechanismen, eine bedeutende Funktion bei der Schmerztransmission im Dorsalhorn des Rückenmarks zukommt.

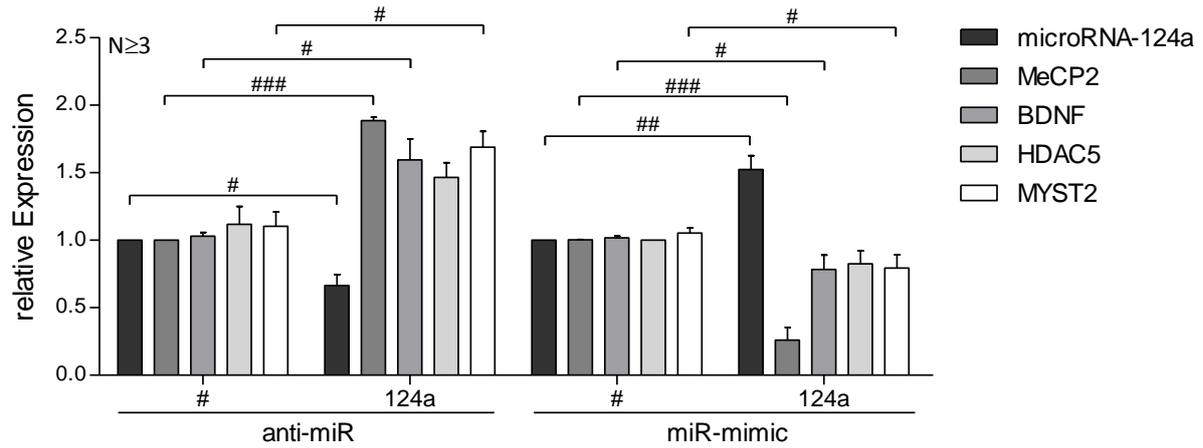


Abbildung 25: qRT-PCR-Analysen im Rückenmark nach Applikation des microRNA-124a-Inhibitors (links) bzw. des -Mimics (rechts) in Relation zu den respektiven Kontrolloligonukleotiden (#) nach Beendigung des Formalin-Tests. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des ungepaarten t-Tests: $p < 0,05$ (#), $p < 0,01$ (##), $p < 0,001$ (###).

4. Diskussion

Seitdem 1993 die erste microRNA lin-4 (Lee et al. 1993) und schließlich im Jahr 2000 die stark konservierte microRNA let-7 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurden (Pasquinelli et al. 2000; Reinhart et al. 2000), nahm das Forschungsinteresse an den kleinen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen deutlich zu. Daraus resultierend konnten bis zum heutigen Zeitpunkt eine große Anzahl von microRNAs identifiziert und entschlüsselt werden. Neben der zeitlichen Regulation Entwicklungs-spezifischer Prozesse steuern microRNAs als Feinregulatoren der Genexpression die zelluläre Proteinausstattung und gewährleisten auf diese Weise Zellstabilität und –Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Faktoren (Herranz/Cohen 2010; Hobert 2008). Aufgrund dessen haben microRNAs nicht nur eine wichtige Bedeutung als mögliche diagnostische und prognostische Biomarker, sondern verfügen zusätzlich als molekulare Zielstrukturen über ein erhebliches therapeutisches Potenzial. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die genaue Funktion von microRNAs bei Schmerzen und Entzündungen noch nicht umfassend entschlüsselt worden. Jedoch konnte in mehreren Studien eine veränderte microRNA Expression in Schmerz-verarbeitenden Geweben nach entzündlicher Stimulation (Bai et al. 2007; Kusuda et al. 2011) und in verschiedenen Neuropathie-Modellen (Liu et al. 2009; Strickland et al. 2011a) sowie im Synovium von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass microRNAs in Zusammenhang mit chronischen Entzündungsschmerzen stehen (Alevizos/Illei 2010; Furer et al. 2010). Die Anzahl funktionaler Studien zur Rolle von microRNAs im Nervensystem ist allerdings nach wie vor begrenzt und microRNA-Targets häufig nicht bekannt. Ausgehend von der Hypothese, dass die Modulation von microRNAs zu einer Schmerzlinderung führen kann, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression, Regulation und Funktion von microRNAs beim pathophysiologischen Nozizeptorschmerz und bei neuropathischen Schmerzen im Rückenmark und in den Spinalganglien von Mäusen näher untersucht. Die so gewonnenen Ergebnisse sollten Aufschluss darüber geben, ob sich microRNAs bzw. deren Target-Strukturen als potenzielle Zielmoleküle zur Behandlung von Schmerzen eignen.

4.1 Untersuchung der Expression und Regulation verschiedener microRNAs

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen zunächst die neuronalen microRNAs-9, -99a, -124a, -132 und -134, die zum einen die Differenzierung und Entwicklung embryonaler und adulter Nerven- und Gliazellen kontrollieren (Krichevsky et al. 2003 & 2006; Lau et al. 2008; Smirnova et al. 2005) und in post-mitotischen Neuronen zudem Mechanismen der Synaptogenese und Plastizität steuern (Schratt 2009). Während der neuronalen Differenzierung werden ZNS-spezifische microRNAs (miR-9, -124a, -132) zunehmend exprimiert, degradieren nicht-neuronale Transkripte und etablieren so schließlich den Erhalt einer neuronalen Genexpression (Conaco et al. 2006; Visvanathan et al. 2007). Die Metabolisierungsrate von microRNAs steht zudem in einem direkten Zusammenhang mit der neuronalen Aktivität. So konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Blockade der AMPA- und NMDA-Rezeptoren oder die Hemmung von Aktionspotentialen mit Tetrodotoxin in hippocampalen und ES-abgeleiteten Neuronen den Abbau von microRNAs (miR-124a-, -134) verhindert. Die Zugabe von Glutamat dagegen beschleunigt den Umsatz der microRNAs (Krol et al. 2010). Auch die beiden „immediate-early-gene“-Proteine BDNF und CREB regulieren u.a. microRNA-9, -124a, -132, -134 bei neuronaler Stimulation (Schratt et al. 2006; Wu/Xie 2006). Die BDNF- und CREB-vermittelte Regulation der neuronalen microRNAs koordiniert, z.B. über die Steuerung des Zytoskeletts, die Ausbildung von Dendriten und Axonen (Han et al. 2011; Vo et al. 2005; Wayman et al. 2008; Yu 2008) sowie Prozesse der synaptischen Entwicklung, Reifung und Plastizität (Nudelman et al. 2010; Schratt et al. 2006) und der Gedächtnisbildung (Gao et al. 2010a; Kim et al. 2007). Die Regulation Plastizitäts-abhängiger Gene, wie bspw. BDNF und CREB (Latremoliere/Woolf 2009; Wu/Xie 2006), und insbesondere die differenzielle Expression ZNS-spezifischer microRNAs (miR-9, -29a, -124a, -132 und -134), die bei den verschiedensten neuronalen Prozessen unterschiedlich exprimiert werden, bieten ein erhebliches Potenzial für die Behandlung entzündlicher, chronischer und neurodegenerativer Erkrankungen, da sie unmittelbar mit Prozessen des Lernens, der LTP und Chronifizierung assoziiert werden (Gao 2010b; Impey et al. 1996 & 1998) und folglich für die Entstehung chronischer Schmerzen von Bedeutung sein könnten. Eine microRNA-vermittelte Regulation chronisch-entzündlicher und neuropathischer Prozesse ist zwar allgemein anerkannt, ihre genaue Funktion bei der Schmerzentstehung und Verarbeitung konnte bis dato allerdings kaum geklärt werden. Erste Untersuchungen im

Rahmen von Schmerz und Entzündung konnten allerdings eine differenzielle Regulation verschiedener microRNAs in unterschiedlichen Tiermodellen nachweisen. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte anhand quantitativer RT-PCR-Analysen eine konstitutive Expression der neuronalen microRNAs (miR-9, -99a, -124a, -132 und -134) und der mittels Microarray identifizierten, stark exprimierten microRNAs (let-7f, miR-29a, -96, -451, -494) im Rückenmark und z.T. in den Spinalganglien von Mäusen detektiert werden. Um schließlich die Regulation der genannten microRNAs bei der Schmerzentstehung und -verarbeitung zu untersuchen, wurde deren Expression, Lokalisation und Funktion in Schmerz-relevanten Geweben in unterschiedlichen nozizeptiven Tiermodellen analysiert.

Ursächlich für die Entstehung neuropathischer Schmerzen sind Schädigungen oder Dysfunktionen neuronaler Zellen, die zu strukturellen und funktionalen Veränderungen der Genexpression führen. In unterschiedlichen Modellen neuropathischer Schmerzen konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine veränderte microRNA Expression diesen Mechanismen zugrunde liegt (Liu et al. 2009, Strickland et al. 2011a). In der vorliegenden Arbeit ist die Regulation der neuronalen microRNAs im Modell der „Spared Nerve Injury“ (SNI) induzierten Neuropathie untersucht worden. Die vergleichende microRNA Expressionsanalyse im Rückenmark Sham- und SNI-operierter Mäuse zeigte, dass microRNA-9, -99a, -124a, -132 und -134 nach 1 bzw. nach 7 Tagen in diesem Modell nicht signifikant reguliert werden. In einer weiteren Studie konnte nach chronischer Konstriktion des Ischiasnerven ebenfalls nur eine geringfügige, allerdings zur Sham-Kontrolle signifikante Regulation von microRNAs im Rückenmark detektiert werden (Brandenburger et al. 2012). Bei einem Neuropathie-Modell induzierter Rückenmarksverletzung (SCI) wurde dagegen eine spinale Repression von microRNA-99a und -124a gemessen und über bioinformatische Analysen mit der Regulation pro-inflammatorischer und apoptotischer Gene in Verbindung gebracht (Liu et al. 2009; Nakanishi et al. 2009). Nach Verletzung des Ischiasnervs konnte zudem eine Repression von u.a. microRNA-9, -99a und -124a im Nerv selbst beobachtet werden. Als Reaktion auf die Läsion des Ischiasnervs wird zusätzlich eine veränderte Proteinexpression von RISC-Komponenten induziert, wodurch eine mögliche Funktion von microRNAs bei der peripheren Nervenregeneration ersichtlich wird (Wu et al. 2011).

Anhand von Expressionsanalysen nach entzündlich-nozizeptiver Stimulation mit Formalin oder Zymosan konnte in dieser Arbeit eine differenzielle und zeitabhängige Expression der untersuchten microRNAs sowohl im Rückenmark als auch in den Spinalganglien

nachgewiesen werden. microRNA-9, -124a, -132 und -134 wurden sowohl im Formalin- als auch im Zymosan-Entzündungsmodell z.T. in beiden Schmerz-rezeptiven Geweben herunter reguliert. Ähnliche microRNAs (u.a. miR-29a, -99a, -124a, -134) werden auch im Kontext inflammatorischer Muskelschmerzen durch die unilaterale Injektion von CFA in den Kaumuskel von Ratten in trigeminalen Ganglien zeitabhängig reprimiert (Bai et al. 2007). Eine tendenzielle Hemmung von microRNA-29a konnte auch in dieser Arbeit 24 und 48 Stunden nach Stimulation mit Formalin im Rückenmark gezeigt werden. Im Gegensatz zur Repression von microRNA-99a in trigeminalen Ganglien bei persistierenden, CFA-induzierten Schmerzen (Bai et al. 2007), konnte im Formalin-Modell keine Regulation von microRNA-99a, jedoch eine signifikante Hemmung von microRNA-99a nach Stimulation mit Zymosan im Rückenmark und in den Spinalganglien detektiert werden. microRNA-99a scheint demzufolge Stimulus-spezifisch reguliert zu werden. Während im Formalin-Modell überwiegend microRNA-124a, -132 und -134 gehemmt werden, sind bei Stimulation mit Zymosan vorzugsweise microRNA-9 und -99a von der Regulation betroffen. In beiden Geweben sind die Expressionsunterschiede von microRNA-9, -99a, -124a, -132, -134 sowohl im Formalin- als auch im Zymosan-Modell vergleichsweise gering, wohingegen bei let-7f, miR-96, -451, -494 eine stärkere, jedoch stark schwankende Regulation bei den einzelnen Tieren durch Formalin induziert worden ist. Außer microRNA-29a, werden let-7f, miR-96, -451, -494 in den ersten Stunden nach der Formalin-Injektion im Rückenmark tendenziell induziert und erreichen nach 48 Stunden wieder das Basallevel. Die Repression vieler microRNAs nach entzündlicher Stimulation deutet darauf hin, dass durch die Hemmung dieser microRNAs eine vermehrte Expression Schmerz-relevanter Proteine ermöglicht und die Entwicklung entzündlicher Prozesse gefördert wird. Die signifikante Hemmung von microRNA-9 konnte ebenfalls in einem genetischen Modell spinaler Muskelatrophie (Haramati et al. 2010) sowie bei Patienten, die an Chorea Huntington leiden (Packer et al. 2008), gezeigt werden. Darüber hinaus konnte die Hemmung von microRNA-9 und -132 mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang gebracht werden (Cogswell et al. 2008), was darauf hindeutet, dass diese beiden microRNAs an der Entstehung entzündlich hervorgerufener, neurodegenerativer Prozesse beteiligt sein könnten. In Neuronen verschiedener Gehirnregionen fördert die Expression von microRNA-132 die morphologische Anpassungen in einer Aktivitäts- und Stimulus-abhängigen Weise (Nudelman et al. 2010; Vo et al. 2005; Wayman et al. 2008). Eine Vorbehandlung von zerebralen Neuronen mit dem

Glucocorticoid Dexamethason reduziert dagegen über die Inhibierung von microRNA-132 die BDNF-abhängige Hochregulation von Glutamatrezeptoren (Kawashima et al. 2010). Darüber hinaus konnte bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Furer et al. 2010) und nach entzündlicher Stimulation mit LPS und PMA in peripheren mononuklearen Zellen, die die Immunabwehr gegen bakterielle Pathogene steuern, eine Induktion von microRNA-132 beobachtet werden (Taganov et al. 2006 & 2007). Über die Regulation Interferon-stimulierter Gene greift microRNA-132 zudem in die antivirale Immunantwort ein (Lagos et al. 2010). Durch die entzündliche Stimulation mit Formalin und Zymosan hingegen wird microRNA-132 im Rückenmark und in den Spinalganglien reprimiert, was im Vergleich mit der Induktion von microRNA-132 in der Peripherie und in verschiedenen Regionen des Gehirns auf den ersten Blick widersprüchlich erscheint. Allerdings könnte diese Beobachtung darauf hindeuten, dass ein und dieselbe microRNA in verschiedenen Regionen des Körpers und innerhalb des Zentralen Nervensystems differenziell reguliert wird, um unterschiedliche, entzündungs-relevante Mechanismen zu kontrollieren.

Die Repression von microRNA-124a konnte auch im RA Synovium bei Patienten mit rheumatoider Arthritis beobachtet werden. Dieser Effekt trägt zur Proliferation Synoviozyten-ähnlicher Fibroblasten bei und induziert die Expression von Chemokinen, wodurch die Infiltration von Leukozyten und Prozesse der Inflammation verstärkt werden (Furer et al. 2010; Nakamachi et al. 2009). Zudem wird microRNA-124a in inaktiven Mikroglia des ZNS, jedoch nicht in peripheren Monozyten oder Makrophagen, konstitutiv exprimiert. Über die Inhibierung des Transkriptionsfaktors C/EBP- α hält microRNA-124a Mikroglia in einem inaktiven Zustand und unterdrückt auf diesem Weg entzündliche Prozesse im ZNS. Bei Ausbruch der experimentell-induzierten, autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem murinen Modell Multipler Sklerose, wird microRNA-124a dagegen reprimiert. Dadurch werden Mikroglia aktiviert und tragen so zur Neuroinflammation bei (Ponomarev et al. 2011). Diese Erkenntnisse unterstreichen den in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhang zwischen der ZNS-spezifischen und neuronalen microRNA-124a mit pathophysiologischen Prozessen der peripheren und zentralen Inflammation. Zudem konnte durch die intrathekale Administration von microRNA-124a eine bereits bestehende, Carrageenan-induzierte Hyperalgesie gemildert und die Entwicklung mechanischer Allodynie im SNI-Modell chronischer Schmerzen in Wildtyp-Mäusen verhindert werden (Willemsen et al. 2012). Aufgrund dieser Zusammenhänge ist es wahrscheinlich, dass die Hemmung von microRNA-

124a auch bei entzündlichen Schmerzen einen pro-inflammatorischen und pro-nozizeptiven Einfluss hat.

Die Funktion von microRNA-134 bei der Regulation der synaptischen Aktivität und bei Prozessen der LTP wurde bereits eingehend untersucht (z.B. Han et al. 2011; Schratt et al. 2006; Siegel et al. 2009). Im Hinblick auf die Schmerzregulation ist über die Funktion von microRNA-134 bislang jedoch wenig bekannt. Allerdings konnte die Hemmung von microRNA-134 kürzlich in einem Epilepsie-Modell mit neuroprotektiven Effekten und mit einer geringeren Anfallsrate *in vivo* assoziiert werden. Diese Befunde sind mit einer verringerten Ausbildung dendritischer Fortsätze von pyramidalen Neuronen, einem reduzierten neuronalen Zelltod und mit zurückgehenden pathologischen Merkmalen der Epilepsie begründet worden (Jimenez-Mateos et al. 2012).

Anhand vergleichender microRNA Expressionsanalysen nach entzündlicher Stimulation mit Formalin oder Zymosan konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass u.a. die beiden microRNAs-124a und -134 im Rückenmark und in den Spinalganglien nach entzündlich-nozizeptiver Reizung in beiden Geweben differenziell und signifikant reguliert werden. Da diese beiden microRNAs bereits in adulten neuronalen Zellen nachgewiesen und mit der Regulation inflammatorischer Prozesse und Mechanismen neuronaler Verknüpfung assoziiert werden konnten, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Lokalisation dieser beiden microRNAs im Rückenmark und in den Spinalganglien sowie deren Expression und Regulation in neuronalen und glialen Primärkulturen schwerpunktmäßig untersucht.

4.2 Zelluläre Expression und Lokalisation von microRNA-124a und -134

In vielen Studien wurde bereits das zelluläre Expressionsprofil einzelner microRNAs (z.B. miR-9, -124a, -132) analysiert, mit der Entwicklung von Nervenzellen in Verbindung gebracht (Krichevsky et al. 2003 & 2006; Smirnova et al. 2005) und microRNA-9, -99a, -124a, -132 und -134 im ZNS von Mäusen nachgewiesen (Lagos-Quintana et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde der basale Gehalt von microRNA-124a und -134 in Primärzellen mittels RT-PCR gemessen. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass microRNA-124a hauptsächlich in Mikroglia und Neuronen und zu einem geringeren Anteil in Astrozyten

exprimiert wird. Demgegenüber liegt microRNA-134 vorwiegend in Astrozyten und weniger in Mikroglia und Neuronen vor. Aufgrund der hohen konstitutiven Expression in Mikroglia und Neuronen erscheint microRNA-124a im Vergleich zu microRNA-134 für die Verarbeitung entzündlicher Schmerzen im Nervensystem interessanter zu sein. Diese Annahme wird anhand zweier Studien bekräftigt, in denen microRNA-124a-Regulationen in ZNS-residenten Mikroglia im EAE-Modell mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (Ponomarev et al. 2011) und mit der Entwicklung mechanischer Allodynie im SNI-Modell in Verbindung gebracht werden konnten (Willemen et al. 2012). Bei der Stimulation mit einem Zytokinmix werden beide microRNAs vorzugsweise in Mikroglia, microRNA-124a zusätzlich in Neuronen und microRNA-134 tendenziell in Astrozyten gehemmt. Auffällig ist, dass microRNA-124a und -134 in Mikroglia bereits 30 Minuten aber auch noch 24 Stunden nach entzündlicher Stimulation signifikant inhibiert werden. Die beobachtete Hemmung der beiden microRNAs im Rückenmark und in den Spinalganglien nach der Stimulation mit Formalin oder Zymosan könnte demnach möglicherweise auf eine Regulation in Mikroglia zurückgeführt werden. Eine starke konstitutive Expression sowie die Hemmung von microRNA-124a nach entzündlicher Stimulation in spinalen Mikroglia wurde in einem MS-Modell bereits nachgewiesen und mit einer pro-inflammatorischen Wirkung assoziiert (Ponomarev et al. 2011; Willemen et al. 2012). Mittlerweile ist erwiesen, dass im Rahmen der zentralen Sensibilisierung nicht nur Adaptationen an prä- und postsynaptischen Membranen, bspw. durch die Rekrutierung von NMDA-Rezeptoren, vorgenommen werden (Kuner et al. 2010), sondern dass bei anhaltender nozizeptiver Stimulation auch pro-inflammatorische Moleküle aus aktivierten Immunzellen des Rückenmarks sekretiert werden (Clark et al. 2012). Die Aktivierung von Mikroglia erfolgt u.a. über deren eigens exprimierte Toll-like Rezeptoren, deren Funktion bei der Regulation chronischer Schmerzen anerkannt ist (Guo/Schluesener 2007; Marchand et al. 2005). Eine microRNA-124a-kontrollierte Steuerung von Mikroglia könnte demzufolge die spinale Schmerzprozessierung modulieren und an der Regulation chronisch-entzündlicher Sensibilisierungsmechanismen teilhaben. Die beobachtete Hemmung von microRNA-124a und -134 in Mikroglia nach entzündlicher Stimulation könnte zudem die Expression pro-inflammatorischer Gene ermöglichen und so die Schmerztransmission im dorsalen Rückenmark beeinflussen. Um dieser Annahme weiter nachzugehen wurde die microRNA Expression in spinalen Gewebeschnitten lokal analysiert.

Anhand von *in situ* Hybridisierungen in den Schmerz-rezeptiven Geweben von naiven Mäusen konnte eine konstitutive Expression von microRNA-124a und -134 im Rückenmark und in den Spinalganglien bestätigt werden. Im Rückenmark wurde microRNA-124a in Neuronen der gesamten grauen Substanz detektiert, jedoch im Bereich der Laminae I und II des Dorsalhorns stark konzentriert. In dieser Region enden die nozizeptiven Primärafferenzen und übertragen den Schmerzreiz synaptisch auf das Rückenmark und von dort aus in übergeordnete Zentren. Die Akkumulation von microRNA-124a-positiven Zellen in diesem Schmerz-verarbeitenden Bereich könnte demnach auf eine Funktion von microRNA-124a bei der Transmission nozizeptiver Reize hindeuten. Doppelfärbungen mit Zellmarkern zeigten eine konstitutive Expression von microRNA-124a in adulten Neuronen, was mit den Ergebnissen in primären Neuronenkulturen übereinstimmte. Auch in anderen Studien, die bspw. die adulte Neurogenese in der subventrikulären Zone (Cheng et al. 2009) und die Axogenese von Hippocampus-Neuronen untersucht haben (Sanuki et al. 2011), konnte eine neuronale microRNA-124a Expression gezeigt werden. Eine Lokalisation von microRNA-124a in Mikroglia des naiven Rückenmarks konnte in dieser Arbeit mittels *in situ* Hybridisierung jedoch nicht dargestellt werden, was mit der Sensitivität der Methode in Zusammenhang stehen dürfte, da eine hohe Expression von microRNA-124a in Mikroglia-Kulturen detektiert und bereits in weiteren Studien nachgewiesen werden konnte (Ponomarev et al. 2011; Willemsen et al. 2012).

Eine konstitutive Expression von microRNA-134 ist ebenfalls in Neuronen der gesamten grauen Substanz des Rückenmarks nachgewiesen worden. Im Gegensatz zu microRNA-124a wird microRNA-134 allerdings stärker im ventralen Bereich exprimiert. Im Ventralhorn sind die Zellkörper der α - und γ -Motoneurone lokalisiert, deren Axone aus dem Ventralhorn des Rückenmarks austreten und die Skelettmuskulatur innervieren. Deszendierende, vorwiegend motorische Bahnen höherer, zentraler Zentren können so eher motorische Reflexe steuern und vermutlich keinen direkten Einfluss auf die nozizeptive Verarbeitung nehmen (Schmidt/Lang 2007). Während in inaktiven Neuronen des Hippocampus die konstitutive Expression von microRNA-134 den Aufbau des Zytoskeletts stabilisiert, wird microRNA-134 bei neuronaler Stimulation gehemmt, sodass dynamische Prozesse des Zytoskeletts und im weiteren Sinne adaptive, morphologische Strukturänderungen, bspw. das Wachstum von Dendriten sowie die Ausbildung von Synapsen, stattfinden können (Schratt et al. 2006). Über

die Kontrolle der synaptischen Plastizität und Langzeit-Potenzierung (LTP) könnte microRNA-134 daher auch an der Entstehung chronischer Schmerzen beteiligt sein.

Auch in den Somata der primären Afferenzen, die in den peripheren Spinalganglien gebündelt vorliegen, werden microRNA-124a und -134 konstitutiv exprimiert. Kollokalisierungen zeigen allerdings, dass beide microRNAs vermehrt in nicht-nozizeptiven Neuronen der Spinalganglien vorhanden sind. Dies erscheint insbesondere hinsichtlich der stärkeren Expression von microRNA-124a in Laminae I und II des Dorsalorns, in der die Nozizeptoren die Schmerzreize synaptisch verschalten, überraschend. Da microRNA-124a allerdings vermehrt in Mikroglia exprimiert wird und bei entzündlicher Stimulation in den zentralen Immunzellen einer starken Hemmung unterliegt, ist anzunehmen, dass ein Zusammenspiel der microRNA-124a Regulationen in Neuronen und Mikroglia des Dorsalorns zur entzündlichen Nozizeption beitragen. Eine weitere mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass microRNA-124a und -134 hauptsächlich als pre-miRs und nicht als reife microRNAs in den Somata der Nozizeptoren vorliegen und erst lokal in den synaptischen Endigungen der Nozizeptoren in reife microRNAs prozessiert werden. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen werden Vorläufermoleküle aufgrund der ausgebildeten Sekundärstruktur jedoch nicht erkannt. Die vergleichsweise schwache Grundexpression von microRNA-124a in den Spinalganglien stimmt zudem mit der Tatsache überein, dass microRNA-124a als ZNS-spezifische microRNA diskutiert wird (Lagos-Quintana et al. 2002). Um eine differenzielle und koordinierte Expression verschiedener Targets und der entsprechenden microRNAs zu gewährleisten, die unter Umständen ein und denselben Signalweg regulieren, kann eine lokale, microRNA-kontrollierte Genexpression für komplexe biologische Prozesse notwendig sein. Der Bedarf einer abgegrenzten Expressionskontrolle wird vor allem dann offensichtlich, wenn man bedenkt, dass jede microRNA mit vielen mRNAs interagieren und umgekehrt eine einzelne mRNA von diversen microRNAs reguliert werden kann (Friedman et al. 2009; Krek et al. 2005). Eine Translokation von microRNA-124a aus den Somata der Nozizeptoren in die synaptischen Endigungen innerhalb des Dorsalorns könnte ebenfalls in Erwägung gezogen werden und so möglicherweise die Schmerztransmission lokal regulieren. Diese Vermutung wird anhand einer Studie bekräftigt in der microRNA prozessierende Enzyme nach Läsion im verletzten Ischiasnerven detektiert werden konnten (Wu et al. 2011). Bei SNL-induzierter Neuropathie konnte eine Verschiebung von Stress-Granula assoziierten microRNAs in die peripheren Endigungen von

Neuronen der Spinalganglien bereits für das miR-183-Cluster, das für sensorische Organe spezifisch ist, beobachtet und mit der Ausbildung mechanischer Hyperalgesie in Verbindung gebracht werden (Aldrich et al. 2009).

Da microRNA-124a im Gegensatz zu microRNA-134 in Mikroglia vermehrt vorliegt, bei entzündlicher Stimulation intensiv reguliert und in den Schmerz-verarbeitenden Neuronen der Laminae I und II des Rückenmarks exprimiert wird, könnte microRNA-124a möglicherweise die spinale Schmerztransmission modulieren. Aufgrund dessen wurde im folgenden Verlauf der Arbeit die funktionale Rolle von microRNA-124a bei entzündlichen Schmerzen *in vivo* untersucht.

4.3 *In vivo* Modulation von microRNA-124a als Therapieoption zur Behandlung inflammatorischer Schmerzen

Die *in vivo* Modulation von microRNA-124a sollte Aufschluss über deren Funktion bei der Regulation inflammatorischer Schmerzen liefern. Dabei ermöglichte die intravenöse Injektion eines microRNA-124a Inhibitors bzw. eines -Mimics in die Schwanzvene von Mäusen eine minimal-invasive Verabreichung der „Biologicals“. Diese Applikationsform wurde bereits in anderen Studien erfolgreich angewendet (Ponomarev et al. 2011), wobei die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke kein Problem darstellte. Trotz der systemischen Verteilung der microRNA-Modulatoren ist aufgrund der ZNS-Spezifität von microRNA-124a nur von wenigen Nebenwirkungen in der Peripherie auszugehen. Nach peripherer, entzündlicher Stimulation mit Formalin oder Zymosan kommt es zu einer Repression von microRNA-124a im Rückenmark und in den Spinalganglien, die nach intravenöser Applikation von microRNA-124a Inhibitor noch einmal verstärkt werden konnte. Eine Inhibierung von microRNA-124a wurde auch schon im Synovium von Patienten mit rheumatoider Arthritis gezeigt, was zu einer Verstärkung inflammatorischer Prozesse führte (Furer et al. 2010; Nakamachi et al. 2009). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde durch die vermehrte Repression spinaler microRNA-124a das Schmerzverhalten nach nozizeptiver Stimulation in der zweiten Phase des Formalin-Tests zusätzlich verstärkt. Demgegenüber wurde bei Applikation des microRNA-124a Mimics die Expression von microRNA-124a erhöht

und das Schmerzverhalten reduziert. Zur Bewertung des Entzündungsstatus wurde die Expression anerkannter Entzündungsmarker (*c-Fos*, *COX-2*, *IL-1-β*, *TNF-α*) im Rückenmark nach Applikation der *microRNA-124a*-Modulatoren und im Anschluss an den Formalin-Test untersucht. Das gesteigerte Schmerzverhalten bei der Hemmung von *microRNA-124a* spiegelte sich auch in der verstärkten Expression der pro-inflammatorischen Mediatoren wider. Eine Regulation pro-inflammatorischer und apoptotischer Gene nach Repression von *microRNA-124a* konnte auch in einem Modell der Rückenmarksverletzung (SCI) gezeigt werden (Liu et al. 2009; Nakanishi et al. 2009). Bei Applikation des Mimics blieb eine zusätzliche Erhöhung der Formalin-induzierten, pro-nozizeptiven Entzündungsmarker aus, womit das geringere Schmerzverhalten z.T. erklärt werden kann. Diese Daten deuten darauf hin, dass *microRNA-124a* bei entzündlichen Prozessen eine Schmerz-hemmende Wirkung ausübt, indem die Expression pro-inflammatorischer Gene inhibiert wird. Allerdings besitzt keines der Gene *c-Fos*, *COX-2*, *IL-1-β*, *TNF-α* innerhalb der Promotorregion eine Bindestelle für *microRNA-124a*, sodass die Regulation der Entzündungsmediatoren über einen indirekten Weg kontrolliert werden muss. Die Induktion der Entzündungsmarker könnte allerdings zumindest teilweise auf die Regulation des Transkriptionsfaktors CREB zurückgeführt werden, der ein direktes Target von *microRNA-124a* darstellt und bei neuronaler Aktivität über eine Phosphorylierung aktiviert wird (Latremoliere/Woolf 2009; Wu/Xie 2006). Die Expression von CREB selbst wird zwei Stunden nach entzündlicher Stimulation mit Formalin im Rückenmark zwar verstärkt, jedoch durch die Applikation von 1 mg/kg Körpergewicht der *microRNA-124a*-Modulatoren nicht beeinflusst (Ergebnisse nicht gezeigt). In der zweiten Phase des Formalin-Tests war die Veränderung des Schmerzverhaltens durch die *microRNA-124a*-Modulation am stärksten ausgeprägt. Da in diesem Zeitfenster Sensibilisierungsprozesse stattfinden, die u.a. zu einem anhaltenden und ausgedehnten Schmerzverhalten sowie einem chronischen Verlauf führen können (Coderre et al. 1994), scheint *microRNA-124a* eher für die Regulation persistenter Entzündungsschmerzen von Bedeutung zu sein. Ein anti-inflammatorischer Effekt von *microRNA-124a* konnte auch im EAE-Modell für Multiple Sklerose an Mäusen beobachtet werden. Bei diesem Modell wird der endogene Gehalt von *microRNA-124a* in Mikroglia reprimiert (Ponomarev et al. 2011). Die *in vivo* Applikation von *microRNA-124a* unterdrückt zudem Symptome der Multiplen Sklerose und der ZNS-Inflammation in EAE-Mäusen und reduziert die Anzahl der Immunzellen im ZNS. *microRNA-124a* überexprimierende

Makrophagen zeigen eine verringerte Expression der entzündlichen Mediatoren TNF- α und iNOS, wodurch Makrophagen deaktiviert werden (Ponomarev et al. 2011). Insbesondere die microRNA-124a gesteuerte Regulation spinaler Immunzellen könnte dazu beitragen, dass microRNA-124a die Resolution entzündlicher Prozesse fördern und auf diese Weise unter Umständen zu einer Schmerzlinderung beitragen kann. Mit dieser Hypothese übereinstimmend konnte in einer kürzlich erschienenen Publikation gezeigt werden, dass durch die intrathekale Applikation von microRNA-124a eine persistente, Carrageenan-induzierte Hyperlagesie reversiert und die Ausbildung mechanischer Allodynie im SNI-Modell unterbunden werden kann (Willemen et al. 2012).

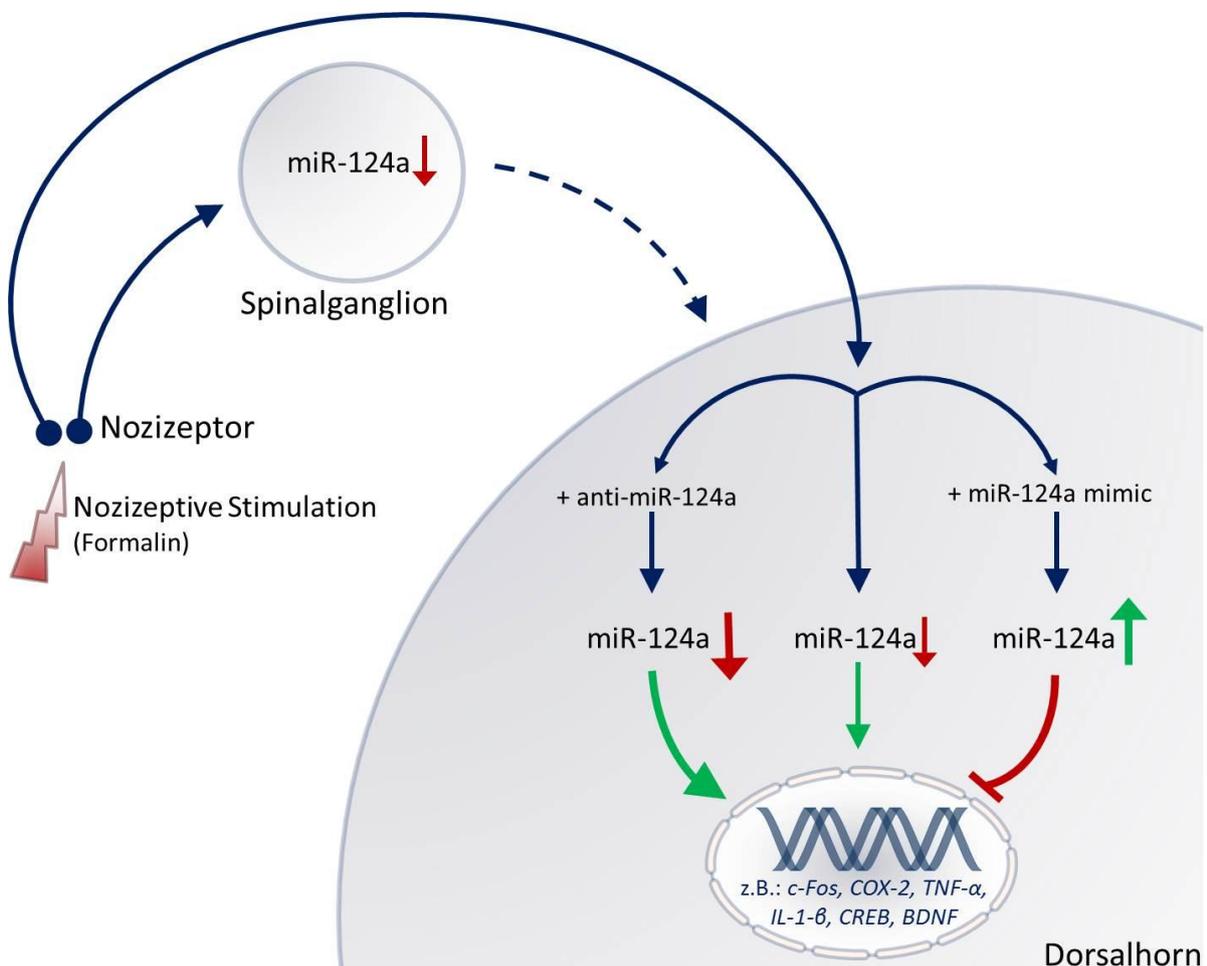


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Regulation und Modulation von microRNA-124a und der Entzündungsmarker bei der Formalin-induzierten, entzündlichen Nozizeption in den Spinalganglien und im Dorsalhorn des Rückenmarks. Vergleichend ist die Modulation von microRNA-124a und die veränderte Expression inflammatorischer Mediatoren nach systemischer Applikation der microRNA-124a-Regulatoren gezeigt.

4.4 microRNA-124a Targets als therapeutische Zielstrukturen

Die Beeinflussung des nozizeptiven Verhaltens durch die *in vivo* Modulation von microRNA-124a führte zur Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Über Datenbankrecherchen konnten einige microRNA-124a Targets selektiert werden, die als epigenetische Regulatoren die Gentranskription und somit möglicherweise Prozesse der Nozizeption kontrollieren. Mit computerbasierten Vorhersagen konnten neben dem Methyl-CpG-bindenden Protein 2 (MeCP2) auch die Chromatin-modifizierenden Gegenspieler Histon-Deacetylase 5 (HDAC5) und MYST Histon-Acetyltransferase 2 (MYST2) als potenzielle, Schmerz-relevante microRNA-124a-Targets und zusätzliche epigenetische Regulatoren abgegrenzt werden. Epigenetische Kennzeichnungen, also dauerhafte und z.T. vererbte kovalente Modifikationen der DNA (z.B. Methylierung) oder der DNA-verpackenden Histone (Deacetylierung, Phosphorylierung) können zu Umbildungen von Chromosomen führen, ohne dabei die DNA-Information selbst zu verändern (Döhning et al. 2011). Über solche strukturellen Markierungen wird die Aktivität einzelner Gene angezeigt, vermittelt und aufrechterhalten (Bird 2007). Umwelteinflüsse, wie bspw. Ernährung, Medikamente oder Chemikalien, aber auch soziale Beziehungen und das Alter können epigenetische Modifikationen der DNA bewirken. Über den Mechanismus der RNA-Interferenz können microRNAs zusätzlich einen epigenetischen Einfluss ausüben, was anhand zahlreicher siRNA-vermittelten RNAi-Studien in verschiedenen Schmerzmodellen bereits gezeigt werden konnte (Döhning et al. 2011). Dementsprechend beeinflussen epigenetische Mechanismen die Expression pro- und antinozizeptiver Gene und manipulieren über die Regulation therapeutischer Zielstrukturen und metabolisierender Enzyme die Pharmakodynamik und –Kinetik von Analgetika, was u.a. bereits für den μ -Opioidrezeptor (Hwang et al. 2007; Lin et al. 2008) und einige Cytochrom-P450-Enzyme (Dannenbergh/Edenberg 2006) gezeigt werden konnte. Umgekehrt können epigenetische Prozesse auch durch die Einnahme von Medikamenten verändert werden (Döhning et al. 2011). Folglich rückt die Epigenetik mit all ihren individuellen Ausprägungen als potenzielles „pharmakologisches Target“ zunehmend in den Fokus einer zukunftssträchtigen personalisierten Medizin. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Targets handelt es sich um Proteine, die epigenetische Markierungen an DNA bzw. Histone anheften (MYST2), diese Veränderungen ablesen (MeCP2) oder entfernen (HDAC5); (Denk/McMahon 2012). Die Funktion epigenetischer Regulatoren wird zudem von

Transkriptionsfaktoren, bspw. REST, beeinflusst, der seinerseits Kofaktoren, z.B. MeCP2, rekrutiert (Buckley et al. 2010). Mechanismen der Epigenetik konnten bereits mit diversen neuronalen Funktionen, bspw. der synaptischen Plastizität, Gedächtnisbildung und mit Lernprozessen assoziiert werden (Day/Sweatt 2011; Denk/McMahon 2012). Auch die zentrale Sensibilisierung von Rückenmarksneuronen im Rahmen der Schmerzchronifizierung wird über LTP-ähnliche Prozesse reguliert (Ji et al. 2003), sodass eine mögliche epigenetische Kontrolle der Nozizeption bei unterschiedlichen Schmerzformen vorstellbar ist. Dementsprechend konnte über die Steuerung der Chromatin-Konformation (Bannister/Kouzarides 2011) bereits eine epigenetische Expressionskontrolle Schmerz-relevanter Gene und eine dadurch veränderte Regulation der jeweiligen Genprodukte (NMDA-Rezeptoren, Protein-Phosphatase 1, CREB und BDNF) nachgewiesen werden (Chwang et al. 2007; Koshibu et al. 2009; Lubin et al. 2008). Bei chronischen Schmerzen konnten bis dato Histon-Acetylierungen, DNA-Methylierungen und die Aktivität des REST-Komplexes mit der Expressionskontrolle nozizeptiver Gene assoziiert werden (Denk/McMahon 2012). Im Rahmen chronisch-entzündlicher Schmerzen wurde eine CFA-induzierte Expression von HDAC5 im Rückenmark mit der Ausbildung inflammatorischer Hyperalgesie verknüpft (Bai et al. 2010). Zudem konnte durch die systemische oder intrathekale Verabreichung von HDAC-Inhibitoren (HDACi) eine analgetische Wirkung – speziell ein reduziertes Schmerzverhalten in Phase 2 des Formalin-Tests – beobachtet werden. Laut Chiechio et al. (2009) liegt der Schmerzhemmung eine Regulation von HDACs bzw. eine vermehrte Acetylierung des Transkriptionsfaktors p65/RelA zugrunde, wodurch die Aktivität NFκB-abhängiger Gene gesteigert und die Expression des metabotropen Glutamat-Rezeptor 2 (mGluR2) in Spinalganglien und im Rückenmark verstärkt werden (Chiechio et al. 2009). Auch bei der Behandlung neuropathischer Schmerzpatienten mit L-Acetylcarnitine wird mGluR2 über NFκB vermehrt exprimiert (Chiechio et al. 2002; Chiechio et al. 2006a/b) und die synaptische Schmerztransmission im Dorsalhorn vermindert (Gerber et al. 2000). Allerdings können durch die entzündliche (CFA) oder neuropathische (SNL) Reizung auch epigenetische Modifizierungen an Schmerz-relevanten Genen induziert werden (Zhang et al. 2011). Unter Verwendung von HDACi konnten in verschiedenen Tiermodellen Anzeichen der chronisch-entzündlichen Erkrankungen Arthritis, Kolitis und Hepatitis reduziert (Chung et al. 2003; Glauben et al. 2006; Leoni et al. 2005) und in einer humanen Studie juveniler, idiopathischer Arthritis bereits als Medikamente mit

therapeutischem Benefit, u.a. durch die Hemmung inflammatorischer Zytokine (Leoni et al. 2002), eingesetzt werden (Vojinovic et al. 2011). Die therapeutische Nutzung der Epigenetik könnte demzufolge generell bei Schmerzpatienten Anwendung finden. Da MYST2 als Histon-Acetyltransferase (HAT) die HDAC-vermittelte Chromatin-Kondensation reversiert und die Auflockerung des Chromatins begünstigt, ist es wahrscheinlich, dass auch MYST2 Mechanismen der Schmerzverarbeitung reguliert. Diese Hypothese wird durch eine Studie bekräftigt, in der gezeigt werden konnte, dass bei neuropathischen Schmerzen die Promotorregion des Chemokins CXCL2/CXCR2 vermehrt acetyliert ist. Diese Chromatin-Modifizierung kann mithilfe der Applikation eines HAT-Inhibitors reduziert und der Schmerz auf diese Weise gehemmt werden (Kiguchi et al. 2012). MeCP2 ist ein Bestandteil des REST-Komplexes, der, ähnlich wie CREB, mit der Regulation neuronaler microRNAs in Verbindung gebracht werden konnte (Wu/Xie 2006). Im inaktiven Zustand bindet MeCP2 an methylierte CpG-Inseln der DNA, wodurch eine Gentranskription verhindert wird (Fuks et al. 2003; Nan et al. 1998). Bei der Aktivierung von Neuronen induziert die Membrandepolarisation eine Calcium-vermittelte Phosphorylierung von MeCP2, was die Dissoziation von DNA-Promotoren bewirkt und so die Genexpression ermöglicht (Chen et al. 2003). Fehlregulationen von MeCP2 werden mit der Entwicklungsstörung des X-chromosomalen Rett-Syndroms assoziiert, was durch phänotypische Symptome von Autismus, Ataxie, mentaler Retardierung und durch epileptische Anfälle charakterisiert ist (Amir et al. 1999). Die exakte Balance der MeCP2 Expression ist daher wichtig für neuronale Funktionen und die korrekte Ausbildung des Gehirns (Shahbazian et al. 2002). Dabei reguliert MeCP2 die Anzahl erregbarer Synapsen in hippocampalen Neuronen und kontrolliert somit die exzitatorische Aktivität (Chao et al. 2007). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass MeCP2 sowohl bei neuropathischen als auch bei inflammatorischen Schmerzen aktiviert wird und über die Regulation von Plastizitätsgenen Prozesse der Nozizeption kontrolliert (Geranton et al. 2007 & 2008; Wang et al. 2011). Anhand von MeCP2-Überexpressions- und Knockout-Studien konnte BDNF als eines der prominentesten Zielgene von MeCP2 identifiziert werden (Chahrour et al. 2008; Chang et al. 2006). BDNF ist ein wichtiger Regulator bei akuten und entzündlichen, nicht aber bei neuropathischen Schmerzen (Zhao et al. 2006) und wird in Nozizeptoren exprimiert. Zudem fördert BDNF als „immediate-early-gene“ und Neuromodulator der synaptischen Plastizität im Dorsalhorn des Rückenmarks Mechanismen der zentralen Sensibilisierung, welche zur Entwicklung von Hyperalgesie

beitragen können (Groth/Aanonsen 2002). Aufgrund der dargestellten Relevanz der epigenetischen Enzyme erscheint ein Zusammenspiel ZNS-spezifischer microRNAs, MeCP2 und BDNF bei der Regulation entzündlicher Nozizeption durchaus möglich. Im Rahmen eines im Institut durchgeführten mRNA Arrays konnte dementsprechend für MeCP2 eine starke Regulation im Rückenmark nach peripherer nozizeptiver Stimulation mit Formalin gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine reziproke Expression von microRNA-124a und den Targets MeCP2, HDAC5 und MYST2 sowie die Hochregulation von BDNF im Rückenmark nozizeptiv stimulierter Tiere nachgewiesen werden. Diese gegenläufigen Regulationen wurden durch die Behandlung mit microRNA-124a-Modulatoren zusätzlich verstärkt. Die durch microRNA-124a Mimic induzierte, verstärkte Repression von MeCP2 hat zu einer signifikanten Abnahme von BDNF geführt, während bei der Antagonisierung von microRNA-124a eine vermehrte Expression von MeCP2 und eine weitere Zunahme von BDNF detektiert werden konnten. Dabei korreliert der jeweilige BDNF-Gehalt mit dem beobachteten Schmerzverhalten. Die Regulation von HDAC5 und MYST2 wurde durch die Applikation der jeweiligen microRNA-124a-Modulatoren ähnlich, jedoch nicht signifikant, beeinflusst. Allgemein konnte durch die Modulation von microRNA-124a *in vivo* die Target-Expression lediglich in geringem Maße beeinflusst werden. Dieser Effekt könnte allerdings damit zusammen hängen, dass jede microRNA viele Targets hat und entsprechend jedes Target von vielen microRNAs reguliert werden kann (Friedman et al. 2009; Krek et al. 2005). Dennoch bestätigt vor allem die reziproke Expression von microRNA-124a und MeCP2, HDAC5 und MYST2 nach Applikation der microRNA-124a-Modulatoren die unmittelbare Interaktion der einzelnen Targets mit microRNA-124a. Diese Beobachtung konnte zusätzlich anhand der neuronalen Kolo-kalisation von microRNA-124a mit jeweils MeCP2, HDAC5 und MYST2 im Rückenmark immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung, und damit Aktivierung von MeCP2 konnte bedauerlicherweise im Western Blot nicht detektiert werden, da keine spezifischen Phospho-MeCP2-Antikörper gegen Mausgewebe auf dem Markt erhältlich sind. Eine direkte Interaktion von MeCP2 mit dem *Bdnf*-Promoter konnte jedoch BDNF als „downstream“-Target von MeCP2 bestätigen (Chen et al. 2003; Martinowich et al. 2003). Die Regulation von BDNF beweist demzufolge die Aktivität von MeCP2. Die beobachtete MeCP2- und BDNF-Expression nach Applikation der microRNA-124a-Modulatoren lässt daher vermuten, dass durch die Gabe des microRNA-124a-Inhibitors eine vermehrte MeCP2-Expression zu einer erhöhten BDNF-Expression führt, wodurch die

synaptische Aktivität und somit die Nozizeption verstärkt werden. Im Gegensatz dazu wird durch die Applikation des microRNA-124a Mimics die MeCP2- und nachstehende BDNF-Expression inhibiert, die synaptische Aktivität abgeschwächt und Schmerzen reduziert. Die signifikante Hemmung von BDNF bei einer Überexpression von microRNA-124a ist in einer weiteren Studie beschrieben worden, in der nachgewiesen wurde, dass die Einnahme von Kokain microRNA-124a reprimiert, die Expression von BDNF verstärkt und auf diesem Weg die Ausbildung dendritischer Fortsätze reguliert wird (Chandrasekar/Dreyer 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass MeCP2 die Synaptogenese, LTP und Gedächtnisbildung verstärkt (Li et al. 2011), das Wachstum und die Reifung von Dendriten reguliert (Zhou et al. 2006) und dass sowohl der Verlust von MeCP2 („loss-of-function“) als auch dessen veränderte Funktion („gain-of-function“) Prozesse der synaptischen Plastizität beeinträchtigen (Na et al. 2012). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte die Expression von MeCP2 in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten des Rückenmarks sowie die Regulation von MeCP2, DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und HDACs im Dorsalhorn bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen nachgewiesen werden. Ähnlich der Formalin-induzierten Hochregulation von MeCP2 im Rückenmark, vermittelt auch die entzündliche Stimulation mit CFA eine vermehrte Expression von MeCP2, DNMTs und HDACs in den äußeren Laminae des Dorsalorns, wohingegen im neuropathischen SNI-Modell die genannten Targets im Rückenmark und in den Spinalganglien inhibiert werden (Tochiki et al. 2012). Neben MeCP2 könnten die microRNA-124a-Targets HDAC5 und MYST2 die Genexpression zusätzlich beeinflussen. Die koordinierte Expression von microRNA-124a und MeCP2, HDAC5 und MYST2 konstituiert demzufolge möglicherweise ein präzise aufeinander abgestimmtes Netzwerk, das die Genexpression weiterer „downstream“-Effektoren, wie z.B. BDNF, im Rahmen chronisch-entzündlicher Schmerzen innerhalb des ZNS über epigenetische Kennzeichnungen reguliert. Diese könnten demnach zukünftig nicht nur als pharmakologische Angriffspunkte, bspw. über den Mechanismus der RNA-Interferenz genutzt werden, sondern zusätzlich zur Untersuchung und Bewertung Schmerz-relevanter Genvarianten (Lötsch/Geißlinger 2010), bei der Gestaltung einer personalisierten Schmerztherapie hilfreich sein.

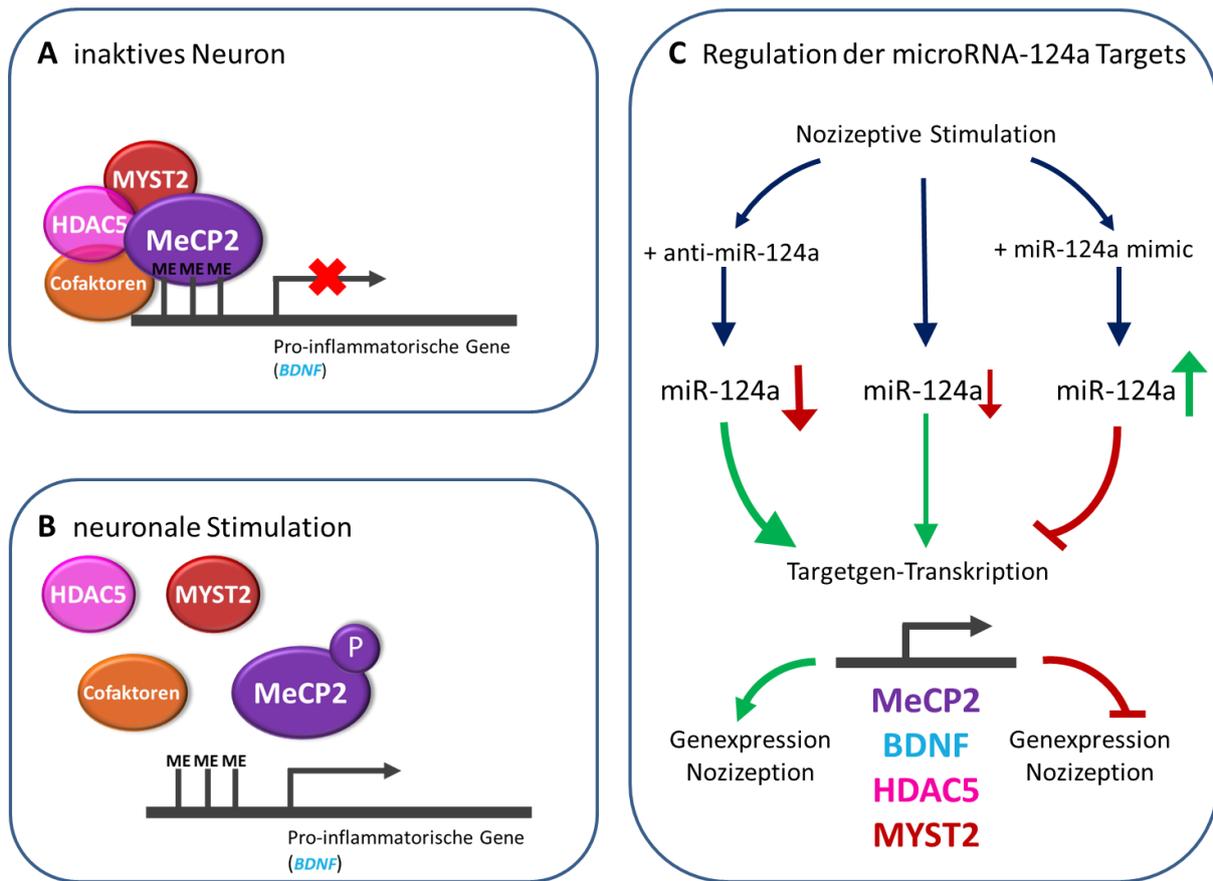


Abbildung 27: Schematische Darstellung der potenziellen Funktion der validierten microRNA-124a Targets. A: In inaktiven Neuronen bindet MeCP2 an methylierte CpG-Inseln der DNA und inhibiert die Target-Transkription. B: Bei neuronaler Stimulation wird MeCP2 phosphoryliert und dissoziiert von der DNA, wodurch die Transkription von Target-mRNAs ermöglicht wird. C: Hypothetische Regulation und Funktion der microRNA-124a Targets MeCP2, HDAC5, MYST2 und von BDNF bei nozizeptiver Stimulation sowie bei Modulation der microRNA-124a Konzentration.

4.5 Modulation von microRNAs als pharmakologische Therapieoption bei Schmerzen

Die in dieser Arbeit beschriebene *in vivo* Modulation von microRNA-124a veranschaulicht, dass eine veränderte microRNA Expression die Pathogenese entzündlicher Schmerzen beeinflussen kann. Hinsichtlich einer innovativen Therapiestrategie erscheint eine *in vivo* Modulation der endogenen microRNA-124a Konzentration daher prinzipiell vorstellbar. Die Tatsache jedoch, dass mehrere microRNAs ein und dasselbe Target regulieren können (Krek et al. 2005), bzw. die Modulation einer microRNA weitere Targets beeinflussen kann, stellt eine Herausforderung bezüglich der spezifischen Selektivität potenzieller microRNA-Modulatoren dar. Darüber hinaus ist nicht festgelegt, ob die Induktion oder die

Antagonisierung verschiedener microRNAs eine Therapieoption darstellt. So konnte bei der experimentell-induzierten Multiplen Sklerose (EAE) *in vivo* gezeigt werden, dass zum einen die Überexpression von microRNA-124a das Ausmaß der Neuroinflammation reduziert (Ponomarev et al. 2011) und zum anderen die Inhibierung von microRNA-326 die Symptome der EAE verringert (Du et al. 2009). Da das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose durch pathophysiologische Prozesse der Entzündung und der Neuropathie gekennzeichnet ist, veranschaulichen diese beiden Studien explizit, dass microRNAs maßgeblich die Neuroimmun-Regulation koordinieren. Zudem können neuropathische Schmerzen bei Streptozotocin-induzierter diabetischer Neuropathie in Mäusen durch Überexpression Gen-spezifischer microRNAs gelindert werden. Die physiologisch bedeutende, akute Nozizeption wird dabei nicht beeinflusst (Chattopadhyay et al. 2012). Im Einklang damit reduziert die spezifische Deletion von Dicer in $\text{Na}_v1.8$ -Nozizeptoren Entzündungsschmerzen in Mäusen ohne dabei die Erregungsschwelle für akute Schmerzen zu verändern, was u.a. damit erklärt werden kann, dass Dicer-defiziente Neurone keine neuronalen Adaptationen bspw. in Form von Sensibilisierungen erfahren (Zhao et al. 2010). Da inflammatorische Prozesse häufig auch an der Entstehung maligner Tumore teilhaben, die von schmerzhaften Symptomen begleitet werden, ist es nicht überraschend, dass eine Vielzahl deregulierter microRNAs bereits mit diversen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden (Chen et al. 2008; Esquelakersch/Slack 2006; Garzon et al. 2010; Spizzo et al. 2009). Dabei sind die genannten microRNAs in den entarteten Zellen häufig reprimiert und in Prozesse der Migration und Invasion von Krebszellen involviert (Fowler et al. 2010; Skalsky/Cullen 2011). Da z.B. die Transfektion von microRNA-124a und -137 über einen Zellzyklus-Arrest die Proliferation von Gliomzellen inhibiert und das Tumorwachstum reduziert, bietet die ektopische microRNA Expression eine therapeutische Option zur Behandlung maligner Krebserkrankungen (Silber et al. 2008). Hinsichtlich der Entwicklung microRNA-modulierender Oligonukleotide sieht sich die RNAi-Technologie vor dem Problem der speziellen Darreichung „Delivery“ und vor der Herausforderung eines geeigneten Transports potenzieller RNAi-Biologicals. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von speziellen Trägersystemen, bspw. in Form von Lipidemulsionen, die Effizienz der Organ-spezifischen Infusion microRNA-basierter Therapeutika auch bei systemischer Applikation erhöht werden kann (Trang et al. 2011). Um einen therapeutischen Vorteil gegenüber herkömmlichen Arzneimitteln zu erzielen, muss zudem eine gesicherte Anwendung RNAi-induzierender Therapeutika gegeben sein, d.h. eine

geringe Toxizität und ein kleines Nebenwirkungsprofil gegenüber einer stabilen und funktionserhaltenden Metabolisierung. Die Stabilität und Effizienz solcher Biologicals wird bspw. mit Nuklease-resistenten Phosphorothioaten im Molekül-Rückgrat gesichert und die intrazelluläre Aufnahme durch Cholesterol-Konjugate erhöht (Krüzfeldt et al. 2006). Neben den microRNA-Inhibitoren und Mimics (Krüzfeld et al. 2005 & 2007; Tsuda et al. 2009) werden auch „miRNA sponges“ (Ebert et al. 2007; Ebert/Sharp 2010), „miRNA decoys“ (Haraguchi et al. 2009) und „target protectors“ (Choi et al. 2007) hinsichtlich einer möglichen Verwendung als RNA-basierte Therapeutika untersucht. Insbesondere die Aktivierung des Immunsystems bei Verabreichung exogener RNA-Moleküle könnte für die Applikation von Antisense-induzierenden Therapeutika eine Hürde darstellen. In diesem Zusammenhang belegen mehrere Studien, dass „small molecules“ über die Virus-vermittelte Aktivierung der angeborenen Immunantwort in die Interferonproduktion eingreifen. So konnte bspw. gezeigt werden, dass siRNAs den JAK-STAT-Signalweg aktivieren und über die Regulation der dsRNA-abhängigen Proteinkinase PKR zu einer vermehrten Expression Interferon-abhängiger Gene beitragen (Sledz et al. 2003). Diese Wechselwirkung konnte auch bei shRNA-exprimierenden RNAi-Vektoren beobachtet werden (Bridge et al. 2003). Über die Erkennung des Toll-like-Rezeptor 3 stimulieren siRNAs und shRNAs zudem die Immunantwort in Makrophagen und dendritischen Zellen (Karikó et al. 2004). Auch infolge viraler Infektionen wird die angeborene Immunantwort über die Expression von IFN- β/α und die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs mobilisiert, wodurch weitere Interferon-abhängige Gene induziert werden (García-Sastre/Biron 2006). Da microRNAs ebenso über die Regulation IFN-stimulierter Gene in die antivirale Immunantwort eingreifen (Lagos et al. 2010; Sonkoly et al. 2007), könnten microRNA-basierte Therapeutika folglich Infektionen und allergische Reaktionen sowie eine spezifische Immunantwort und damit Antikörperbildung gegen die Biologicals fördern. Ähnliche Nebenwirkungen konnten bei den zurzeit auf dem Markt erhältlichen Biologicals zur Behandlung der Psoriasis-Arthritis dokumentiert werden, die vorwiegend in die TNF- α -Signalkaskade eingreifen, bspw. Etanercept und Infliximab, oder als Antikörper gegen Adhäsionsproteine, z.B. Efalizumab, wirken (Reich/Augustin 2005). Darüber hinaus könnten Entgleisungen des Immunsystems langfristig zu einer Immunschwäche führen und Autoimmun- oder Krebserkrankungen begünstigen. Die Umgehung des Immunsystems sowie die unbedingten Anforderungen an die Stabilität, Verfügbarkeit und intrazelluläre Aufnahme werden weiterhin eine spannende Aufgabe bei

der Entwicklung RNAi-basierter Therapeutika darstellen (Leung/Whittaker 2005). Allerdings sind microRNAs *in vivo* von großer Beständigkeit, lange wirksam (Lim et al. 2005), im Vergleich zu mRNAs wesentlich stabiler (Doleshal et al. 2008) und relativ resistent gegenüber nukleolytischen Abbauprozessen (Chen et al. 2008). Nichtsdestotrotz bleibt das Problem der Target-Selektivität potenzieller microRNA-Modulatoren zunächst bestehen, sodass bislang eine pharmakologische Therapie lediglich bei vorangeschrittenen Erkrankungen, bspw. bei einer Drittlinientherapie von Krebs, oder einer ausgeprägten neurodegenerativen Erkrankung zu vertreten wäre. Weitere Studien sind demnach in den nächsten Jahren dringend erforderlich und könnten zur Lösung der genannten Probleme beitragen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bestimmte neuronale microRNAs im Rückenmark und in den Spinalganglien konstitutiv exprimiert und nach peripherer Entzündung mit Formalin oder Zymosan differenziell reguliert werden. Bei der SNI-induzierten Neuropathie konnte indessen keine signifikante Regulation der untersuchten microRNAs nachgewiesen werden. Aufgrund der Lokalisation in den Neuronen der Schmerzverarbeitenden Laminae I und II des Dorsalhorns des Rückenmarks und angesichts der Regulation in entzündlich stimulierten Neuronen und Mikroglia wurde der Fokus der Arbeit auf die Untersuchung von microRNA-124a gelegt. Anhand von Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass eine periphere entzündliche Stimulation mit Formalin oder Zymosan microRNA-124a im Rückenmark inhibiert, die Expression pro-inflammatorischer und pro-nozizeptiver Gene hiernach ermöglicht und ein vermehrtes Schmerzverhalten bewirkt. Die funktionelle Relevanz von microRNA-124a wurde *in vivo* mittels intravenöser Applikation von microRNA-124a-Modulatoren bei einem Modell für entzündliche Schmerzen, dem Formalin-Modell untersucht. Dabei führte die Hemmung von microRNA-124a zu einem verstärkten Schmerzverhalten, welches mit einer Hochregulation verschiedener Entzündungsmarker einherging. Die Überexpression von microRNA-124a dagegen antagonisierte die Hochregulation entzündlicher Mediatoren und führte zu einer Schmerzhemmung. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit der antinozizeptive Effekt von microRNA-124a mit der Regulation der Epigenetik-regulierenden Targets MeCP2, HDAC5 und MYST2 assoziiert werden und u.a. über die Hemmung des neuromodulierenden, pro-inflammatorischen Peptids BDNF verifiziert werden. Die spezielle Darreichung von microRNA-124a könnte demzufolge einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie chronisch-entzündlicher Schmerzen liefern. Zukünftig werden weitere Studien notwendig sein um die eindeutige Funktion, die individuelle Wirkung sowie die therapeutische Relevanz von microRNA-124a zu analysieren. Darüber hinaus müssten Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Nebenwirkungsprofile für microRNA-124a erstellt werden, um potenzielle Risiken, Chancen und Vorteile der microRNA-Modulation hinsichtlich einer humanen Schmerztherapie bewerten zu können.

6. Ausblick

Die Entdeckung, dass Gene mit doppelsträngiger RNA in *Caenorhabditis elegans* effizient und spezifisch über den Mechanismus der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz ausgeschaltet werden können, brachte den ersten molekularen Durchbruch hinsichtlich der Beeinflussung einzelner Gene. Die beiden US-Forscher Andrew Z. Fire und Craig C. Mello erhielten 2006 hierfür folgerichtig den Nobelpreis der Medizin (Fire et al. 1998). Wenige Jahre später konnte zudem gezeigt werden, dass die körpereigenen microRNAs einen ähnlichen Effekt auf die Genexpression ausüben wie die exogenen siRNAs, wodurch schließlich das Interesse an den kleinen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen rasant zugenommen hat (Lee et al. 1993; Reinhart et al. 2000). Im Gegenteil zu siRNAs haben microRNAs den Vorteil, dass sie größtenteils Gewebe-spezifisch exprimiert werden. Bei systemischer Applikation microRNA-modulierender Substanzen ist daher mit weniger Nebenwirkungen zu rechnen. Abgesehen von eventuellen Modifizierungen, die die Stabilität und Effizienz und damit die Halbwertszeiten dieser potenziellen Biologicals erhöhen, handelt es sich bei diesen Molekülen um körperähnliche Strukturen. Aufgrund dessen ist es möglich, dass die Verabreichung von solchen microRNA-Modulatoren im Vergleich zu siRNAs eine geringere Immunantwort hervorrufen könnte. Trotz der genannten Vorteile gegenüber den siRNAs wird sich die Entwicklung microRNA-modulierender Biologicals vor der Herausforderung sehen, Zell- bzw. Gewebe-spezifische Moleküle zu generieren, um eine systemische Veränderung microRNA-regulierter Mechanismen zu vermeiden. Die Identifizierung Gewebe-spezifischer Target-Erkennungs- und Regulationsmuster für einzelne microRNAs ist bis zum heutigen Zeitpunkt allerdings kaum vorangeschritten. Da microRNAs darüber hinaus auch innerhalb einer Zelle diverse Targets regulieren, könnte die Applikation Gewebe-spezifischer microRNA-Modulatoren zu erheblichen, derzeit nicht abzuschätzenden, Nebenwirkungen führen. Hinsichtlich der biologischen Funktion und Regulation von microRNAs ist in der molekularen Grundlagenforschung immer noch vieles ungeklärt. Vor allem die Identifizierung und Erkennung der koordinierten Regulation gemeinsamer Targets und überschneidender Signalwege sowie die Abgrenzung regulativer Prozesse, die von mehreren microRNAs gleichzeitig kontrolliert werden, gestaltet sich schwierig. Demzufolge

ist es bis zu einer möglichen Entwicklung microRNA-basierter Therapeutika vermutlich noch ein langer, jedoch lohnenswerter und vielversprechender Weg.

7. Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

Abrahamsen, B., Zhao, J., Asante, C.O., Cendan, C.M., Marsh, S., Martinez-Barbera, J.P., Nassar, M.A., Dickenson, A.H., Wood, J.N. (2008): *The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain*. In: Science 1321(5889), S. 702-5.

Aldrich, B.T., Frakes, E.P., Kasuya, J., Hammond, D.L., Kitamoto, T. (2009): *Changes in expression of sensory organ-specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation*. In: Neuroscience 164(2), S. 711-23.

Alevizos, I., Alexander, S., Turner, R.J., Illei, G.G. (2011): *MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome*. In: Arthritis Rheum. 63(2), S. 535-44.

Alevizos, I., Illei, G.G. (2010): *MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases*. In: Nat Rev Rheumatol. 6(7), S. 391-8.

Alsaleh, G., Suffert, G., Semaan, N., Juncker, T., Frenzel, L., Gottenberg, J.E., Sibilia, J., Pfeffer, S., Wachsmann, D. (2009): *Bruton's tyrosine kinase is involved in miR-346-related regulation of IL-18 release by lipopolysaccharide-activated rheumatoid fibroblast-like synoviocytes*. In: J Immunol. 182(8), S. 5088-97.

Ambros, V. (2004): *The functions of animal microRNAs*. In: Nature 431(7006), S. 350-5.

Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y. (1999): *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2*. In: Nat Genet. 23(2), S. 185-8.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1999): *Short Protocols in Molecular Biology*. In: Current Protocols; 4. Auflage.

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., Bartel, D.P. (2008): *The impact of microRNAs on protein output*. In: Nature 455(7209), S. 64-71.

Bai, G., Ambalavanar, R., Wei, D., Dessem, D. (2007): *Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain*. In: Mol Pain 3:15.

Bai, G., Wei, D., Zou, S., Ren, K., Dubner, R. (2010): *Inhibition of class II histone deacetylases in the spinal cord attenuates inflammatory hyperalgesia*. In: Molecular Pain 6:51.

Bak, M., Silaharoglu, A., Møller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N., Kauppinen, S. (2008): *MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system*. In: RNA 14(3), S. 432-44.

Bannister, A.J., Kouzarides, T. (2011): *Regulation of chromatin by histone modifications*. In: Cell Res. 21(3), S. 381-95.

Baron, R., Binder, A., Wasner, G. (2010): *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment*. In: Lancet Neurol. 9(8): S. 807-19.

Bartel, D.P. (2004): *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. In: Cell 116(2), S. 281-97.

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D. (2009): *Cellular and molecular mechanisms of pain*. In: Cell 139(2), S. 267-84.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., Bentwich, Z. (2005): *Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs*. In: Nat Genet. 37(7), S. 766-70.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., Hannon, G.J. (2003): *Dicer is essential for mouse development*. In: Nat Genet. 35(3), S. 215-7.

Bird, A. (2007): *Perceptions of epigenetics*. In: Nature 447(7143), S. 396-8.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. In: Nucleic Acids Res. 7(6):1513-23.

Bourquin, A.F., Süveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A.C., Spahn, D.R., Decosterd, I. (2006): *Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse*. In: Pain 122(1-2), S. 14.e1-14.

Brandenburger, T., Castoldi, M., Brendel, M., Grievink, H., Schlösser, L., Werdehausen, R., Bauer, I., Hermanns, H. (2012): *Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain*. In: Neurosci Lett. 506(2), S. 281-6.

Bremer, J., O'Connor, T., Tiberi, C., Rehrauer, H., Weis, J., Aguzzi, A. (2010): *Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination*. In: PLoS One 5(8), S. e12450.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M. (2005): *Principles of microRNA-target recognition*. In: PLoS Biol. 3(3), S. e85.

Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., Iggo, R. (2003): *Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells*. In: Nat Genet. 34(3), S. 263-4.

Buckley, N.J., Johnson, R., Zuccato, C., Bithell, A., Cattaneo, E. (2010): *The role of REST in transcriptional and epigenetic dysregulation in Huntington's disease*. In: *Neurobiol Dis.* 39(1), S. 28-39.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., Julius, D. (1999): *A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat*. In: *Nature* 398(6726), S. 436-41.

Cervero, F., Laird, J. (1991): *One pain or many pains? A new look at pain mechanisms*. *News Physiol. Sci.* 6, S. 268-273.

Chahrour, M., Jung, S.Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S.T., Qin, J., Zoghbi, H.Y. (2008): *MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription*. In: *Science* 320(5880), S. 1224-9.

Chandrasekar, V., Dreyer, J.L. (2009): *microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity*. In: *Mol Cell Neurosci.* 42(4), S. 350-62.

Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S., Jaenisch, R. (2006): *The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression*. In: *Neuron* 49(3), S. 341-8.

Chao, H.T., Zoghbi, H.Y., Rosenmund, C. (2007): *MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number*. In: *Neuron* 56(1), S. 58-65.

Chattopadhyay, M., Zhou, Z., Hao, S., Mata, M., Fink, D.J. (2012): *Reduction of voltage gated sodium channel protein in DRG by vector mediated miRNA reduces pain in rats with painful diabetic neuropathy*. In: *Mol Pain* 8:17.

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

Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E. (2003): *Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2*. In: *Science* 302(5646), S. 885-9.

Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.Y. (2008): *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. In: *Cell Res.* 18(10), S. 997-1006.

Cheng, L.C., Pastrana, E., Tavazoie, M., Doetsch, F. (2009): *miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche*. In: *Nat Neurosci.* 12(4), S. 399-408.

Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., Darnell, R.B. (2009): *Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps*. In: *Nature* 460(7254), S. 479-86.

Chiechio, S., Caricasole, A., Barletta, E., Storto, M., Catania, M.V., Copani, A., Vertechy, M., Nicolai, R., Calvani, M., Melchiorri, D., Nicoletti, F. (2002): *L-Acetylcarnitine induces analgesia by selectively up-regulating mGlu2 metabotropic glutamate receptors*. In: *Mol Pharmacol*. 61(5), S. 989-96.

Chiechio, S., Copani, A., De Petris, L., Morales, M.E., Nicoletti, F., Gereau, R.W. 4th (2006a): *Transcriptional regulation of metabotropic glutamate receptor 2/3 expression by the NF-kappaB pathway in primary dorsal root ganglia neurons: a possible mechanism for the analgesic effect of L-acetylcarnitine*. In: *Mol Pain* 2:20.

Chiechio, S., Copani, A., Nicoletti, F., Gereau, R.W. 4th (2006b): *L-acetylcarnitine: a proposed therapeutic agent for painful peripheral neuropathies*. In: *Curr Neuropharmacol*. 4(3), S. 233-7.

Chiechio, S., Zammataro, M., Morales, M.E., Busceti, C.L., Drago, F., Gereau, R.W. 4th, Copani, A., Nicoletti, F. (2009): *Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain*. In: *Mol Pharmacol*. 75(5), S. 1014-20.

Choi, W.Y., Giraldez, A.J., Schier, A.F. (2007): *Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430*. In: *Science* 318(5848), S. 271-4.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. In: *Anal Biochem*. 162(1), S. 156-9.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (2006): *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. In: *Nat Protoc*. 1(2), S. 581-5.

Chung, Y.L., Lee, M.Y., Wang, A.J., Yao, L.F. (2003): *A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. In: *Mol Ther*. 8(5), S. 707-17.

Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., Sweatt, J.D. (2007): *The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation*. In: *J Neurosci*. 27(46), S. 12732-42.

Clapham, D.E. (2003): *TRP channels as cellular sensors*. In: *Nature* 426(6966), S. 517-24.

Clark, A.K., Grist, J., Al-Kashi, A., Perretti, M., Malcangio, M. (2011): *Spinal cathepsin S and fractalkine contribute to chronic pain in the collagen-induced arthritis model*. In: *Arthritis Rheum*. 64(6), S. 2038-47.

Coderre, T.J., Vaccarino, A.L., Melzack, R. (1990): *Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection*. In: *Brain Res*. 535(1), S. 155-8.

Coderre, T.J., Yashpal, K., Henry, J.L. (1994): *Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistent nociceptive responses in the formalin test*. In: *Neuroreport* 5(11), S. 1337-40.

- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A.M., Roses, A.D., Richards, C.A. (2008): *Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways*. In: J Alzheimers Dis. 14(1), S. 27-41.
- Conaco, C., Otto, S., Han, J.J., Mandel, G. (2006): *Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 103(7), S. 2422-7.
- Cuellar, T.L., Davis, T.H., Nelson, P.T., Loeb, G.B., Harfe, B.D., Ullian, E., McManus, M.T. (2008): *Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 105(14), S. 5614-9.
- Dai, Y., Huang, Y.S., Tang, M., Lv, T.Y., Hu, C.X., Tan, Y.H., Xu, Z.M., Yin, Y.B. (2007): *Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients*. In: Lupus 16(12), S. 939-46.
- Dai, Y., Sui, W., Lan, H., Yan, Q., Huang, H., Huang, Y. (2009): *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients*. In: Rheumatol Int. 29(7), S. 749-54.
- Dannenbergh, L.O., Edenberg, H.J. (2006): *Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation*. In: BMC Genomics 7:181.
- Davis, T.H., Cuellar, T.L., Koch, S.M., Barker, A.J., Harfe, B.D., McManus, M.T., Ullian, E.M. (2008): *Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus*. In: J Neurosci. 28(17), S. 4322-30.
- Day, J.J., Sweatt, J.D. (2011): *Epigenetic mechanisms in cognition*. In: Neuron 70(5), S. 813-29.
- Decosterd, I., Woolf, C.J. (2000): *Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain*. In: Pain 87(2), S. 149-58.
- De Jonghe, P., Timmerman, V., Nelis, E., De Vriendt, E., Löfgren, A., Ceuterick, C., Martin, J.J., Van Broeckhoven, C. (1999): *A novel type of hereditary motor and sensory neuropathy characterized by a mild phenotype*. In: Arch Neurol. 56(10), S. 1283-8.
- Denk, F., McMahon, S.B. (2012): *Chronic pain: emerging evidence for the involvement of epigenetics*. In: Neuron 73(3), S. 435-44.
- De Pietri Tonelli, D., Pulvers, J.N., Haffner, C., Murchison, E.P., Hannon, G.J., Huttner, W.B. (2008): *miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex*. In: Development 135(23), S. 3911-21.

de Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., DeLuca, M. (1985): *Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in Escherichia coli*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 82(23), S. 7870-3.

D'Mello, R., Dickenson, A.H. (2008): *Spinal cord mechanisms of pain*. In: Br J Anaesth. 101(1), S. 8-16.

Döhring, A., Geisslinger, G., Lötsch, J. (2011): *Epigenetics in pain and analgesia: an imminent research field*. In: Eur J Pain 15(1), S. 11-6.

Doleshal, M., Magotra, A.A., Choudhury, B., Cannon, B.D., Labourier, E., Szafranska, A.E. (2008): *Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. In: J Mol Diagn. 10(3), S. 203-11.

Drago, J., Gerfen, C.R., Lachowicz, J.E., Steiner, H., Hollon, T.R., Love, P.E., Ooi, G.T., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., et al. (1994): *Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 91(26), S. 12564-8.

Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z., Pei, G. (2009): *MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis*. In: Nat Immunol. 10(12), S. 1252-9.

Dubin, A.E., Patapoutian, A. (2010): *Nociceptors: the sensors of the pain pathway*. In: J Clin Invest. 120(11), S. 3760-72.

Dubuisson, D., Dennis, S.G. (1977): *The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats*. In: Pain 4(2), S. 161-74.

Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., Portenoy, R.K., Rice, A.S., Stacey, B.R., Treede, R.D., Turk, D.C., Wallace, M.S. (2007): *Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations*. In: Pain 132(3), S. 237-51.

Ebert, M.S., Neilson, J.R., Sharp, P.A. (2007): *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. In: Nat Methods 4(9), S. 721-6.

Ebert, M.S., Sharp, P.A. (2010): *MicroRNA sponges: progress and possibilities*. In: RNA 16(11), S. 2043-50.

Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J. (2006): *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. In: Nat Rev Cancer 6(4), S. 259-69.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N. (2008): *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* In: Nat Rev Genet. 9(2), S. 102-14.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998): *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. In: Nature 391(6669), S. 806-11.

Fowler, A., Thomson, D., Giles, K., Maleki, S., Mreich, E., Wheeler, H., Leedman, P., Biggs, M., Cook, R., Little, N., Robinson, B., McDonald, K. (2011): *miR-124a is frequently down-regulated in glioblastoma and is involved in migration and invasion*. In: Eur J Cancer 47(6), S. 953-63.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2009): *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. In: Genome Res. 19(1), S. 92-105.

Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., Kouzarides, T. (2003): *The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation*. In: J Biol Chem. 278(6), S. 4035-40.

Furer, V., Greenberg, J.D., Attur, M., Abramson, S.B., Pillinger, M.H. (2010): *The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. In: Clin Immunol. 136(1), S. 1-15.

Gallego, J.A., Gordon, M.L., Claycomb, K., Bhatt, M., Lencz, T., Malhotra, A.K. (2012): *In vivo microRNA detection and quantitation in cerebrospinal fluid*. In: J Mol Neurosci. 47(2), S. 243-8.

Gangaraju, V.K., Lin, H. (2009): *MicroRNAs: key regulators of stem cells*. In: Nat Rev Mol Cell Biol. 10(2), S. 116-25.

Gao, J., Wang, W.Y., Mao, Y.W., Gräff, J., Guan, J.S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., Tsai, L.H. (2010a): *A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134*. In: Nature 466(7310), S. 1105-9. E

Gao, F.B. (2010b): *Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development*. In: Neural Dev. 5:25.

García-Sastre, A., Biron, C.A. (2006): *Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente*. In: Science 312(5775), S. 879-82.

Garzon, R., Marcucci, G., Croce, C.M. (2010): *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. In: Nat Rev Drug Discov. 9(10), S. 775-89.

Géranton, S.M., Morenilla-Palao, C., Hunt, S.P. (2007): *A role for transcriptional repressor methyl-CpG-binding protein 2 and plasticity-related gene serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in the induction of inflammatory pain states*. In: J Neurosci. 27(23), S. 6163-73.

Géranton, S.M., Fratto, V., Tochiki, K.K., Hunt, S.P. (2008): *Descending serotonergic controls regulate inflammation-induced mechanical sensitivity and methyl-CpG-binding protein 2 phosphorylation in the rat superficial dorsal horn*. In: Mol Pain 4:35.

Gerber, G., Zhong, J., Youn, D., Randic, M. (2000): *Group II and group III metabotropic glutamate receptor agonists depress synaptic transmission in the rat spinal cord dorsal horn*. In: *Neuroscience* 100(2), S. 393-406.

Glauben, R., Batra, A., Fedke, I., Zeitz, M., Lehr, H.A., Leoni, F., Mascagni, P., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., Siegmund, B. (2006): *Histone hyperacetylation is associated with amelioration of experimental colitis in mice*. In: *J Immunol.* 176(8), S. 5015-22.

Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2004): *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. In: *Nature* 432(7014), S. 235-40.

Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., Bartel, D.P. (2007): *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. In: *Mol Cell* 27(1), S. 91-105.

Groth, R., Aanonsen, L. (2002): *Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia*. In: *Pain* 100(1-2), S. 171-81.

Guo, L.H., Schluesener, H.J. (2007): *The innate immunity of the central nervous system in chronic pain: the role of Toll-like receptors*. In: *Cell Mol Life Sci.* 64(9), S. 1128-36.

Han, L., Wen, Z., Lynn, R.C., Baudet, M.L., Holt, C.E., Sasaki, Y., Bassell, G.J., Zheng, J.Q. (2011): *Regulation of chemotropic guidance of nerve growth cones by microRNA*. In: *Mol Brain* 4:40.

Haraguchi, T., Ozaki, Y., Iba, H. (2009): *Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells*. In: *Nucleic Acids Res.* 37(6):e43.

Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlenn, E., Heiser, P.W., Wills, A.M., Wirguin, I., Rubin, L.L., Misawa, H., Tabin, C.J., Brown, R. Jr., Chen, A., Hornstein, E. (2010): *miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(29), S. 13111-6.

He, L., Hannon, G.J. (2004): *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. In: *Nat Rev Genet.* 5(7), S. 522-31.

He, Y., Yang, C., Kirkmire, C.M., Wang, Z.J. (2010): *Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid receptor*. In: *J Neurosci.* 30(30), S. 10251-8.

Hébert, S.S., De Strooper, B. (2009): *Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease*. In: *Trends Neurosci.* 32(4), S. 199-206.

Herranz, H., Cohen, S.M. (2010): *MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems*. In: *Genes Dev.* 24(13), S. 1339-44.

Hobert, O. (2008): *Regulatory logic of neuronal diversity: terminal selector genes and selector motifs*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 105(51), S. 20067-71.

Holzapfel, B., Wickert, L. (2007): *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. In: Biologie in unserer Zeit 37, S. 120-26.

Hunnskaar, S., Fasmer, O.B., Hole, K. (1985): *Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics*. In: J Neurosci Methods 14(1), S. 69-76.

Hunnskaar, S., Hole, K. (1987): *The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain*. In: Pain 30(1), S. 103-14.

Hwang, C.K., Song, K.Y., Kim, C.S., Choi, H.S., Guo, X.H., Law, P.Y., Wei, L.N., Loh, H.H. (2007): *Evidence of endogenous mu opioid receptor regulation by epigenetic control of the promoters*. In: Mol Cell Biol. 27(13), S. 4720-36.

Immke, D.C., Gavva, N.R. (2006): *The TRPV1 receptor and nociception*. In: Semin Cell Dev Biol. 17(5), S. 582-91.

Impey, S., Mark, M., Villacres, E.C., Poser, S., Chavkin, C., Storm, D.R. (1996): *Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus*. In: Neuron 16(5), S. 973-82.

Impey, S., Smith, D.M., Obrietan, K., Donahue, R., Wade, C., Storm, D.R. (1998): *Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning*. In: Nat Neurosci. 1(7), S. 595-601.

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

Jimenez-Mateos, E.M., Engel, T., Merino-Serrais, P., McKiernan, R.C., Tanaka, K., Mouri, G., Sano, T., O'Tuathaigh, C., Waddington, J.L., Prenter, S., Delanty, N., Farrell, M.A., O'Brien, D.F., Conroy, R.M., Stallings, R.L., Defelipe, J., Henshall, D.C. (2012): *Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects*. In: Nat Med., DOI: 10.1038/nm.2834.

Jin, S.X., Zhuang, Z.Y., Woolf, C.J., Ji, R.R. (2003): *p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain*. In: J Neurosci. 23(10), S. 4017-22.

Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummelkamp, T.R., Fleming, M.D., Camargo, F.D. (2008): *Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223*. In: Nature 451(7182), S. 1125-9.

Jones, T.L., Sorkin, L.S. (2005): *Activated PKA and PKC, but not CaMKIIalpha, are required for AMPA/Kainate-mediated pain behavior in the thermal stimulus model*. In: Pain 117(3), S. 259-70.

Julius, D., Basbaum, A.I. (2001): *Molecular mechanisms of nociception*. In: Nature 413(6852), S. 203-10.

Jung, J., Shin, J.S., Lee, S.Y., Hwang, S.W., Koo, J., Cho, H., Oh, U. (2004): *Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding*. In: J Biol Chem. 279(8), S. 7048-54.

Junn, E., Mouradian, M.M. (2012): *MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential*. In: Pharmacol Ther. 133(2), S. 142-50.

Kang, K., Pulver, S.R., Panzano, V.C., Chang, E.C., Griffith, L.C., Theobald, D.L., Garrity, P.A. (2010): *Analysis of Drosophila TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception*. In: Nature 464(7288), S. 597-600.

Karikó, K., Bhuyan, P., Capodici, J., Ni, H., Lubinski, J., Friedman, H., Weissman, D. (2004): *Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3*. In: Cells Tissues Organs 177(3), S. 132-8.

Kawahara, H., Imai, T., Okano, H. (2012): *MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis*. In: Front Neurosci. 6:30, S. 1-13.

Kawase-Koga, Y., Otaegi, G., Sun, T. (2009): *Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system*. In: Dev Dyn. 238(11), S. 2800-12.

Kawashima, H., Numakawa, T., Kumamaru, E., Adachi, N., Mizuno, H., Ninomiya, M., Kunugi, H., Hashido, K. (2010): *Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression*. In: Neuroscience 165(4), S. 1301-11.

Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Maeda, T., Fukazawa, Y., Tohya, K., Kimura, M., Kishioka, S. (2012): *Epigenetic augmentation of the macrophage inflammatory protein 2/C-X-C chemokine receptor type 2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves elicits neuropathic pain*. In: J Pharmacol Exp Ther. 340(3), S. 577-87.

Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W.B., Voronov, S.V., Murchison, E., Hannon, G., Abeliovich, A. (2007): *A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons*. In: Science 317(5842), S. 1220-4.

Kim, V.N., Han, J., Siomi, M.C. (2009): *Biogenesis of small RNAs in animals*. In: Nat Rev Mol Cell Biol. 10(2), S. 126-39.

Kong, Y.W., Cannell, I.G., de Moor, C.H., Hill, K., Garside, P.G., Hamilton, T.L., Meijer, H.A., Dobbyn, H.C., Stoneley, M., Spriggs, K.A., Willis, A.E., Bushell, M. (2008): *The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 105(26), S. 8866-71.

Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J.R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merkschlager, M., Theis, F.J., Köhr, G., Kaczmarek, L., Schütz, G. (2010): *MicroRNA loss enhances learning and memory in mice*. In: J Neurosci. 30(44), S. 14835-42.

Koshibu, K., Gräff, J., Beullens, M., Heitz, F.D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., Mansuy, I.M. (2009): *Protein phosphatase 1 regulates the histone code for long-term memory*. In: J Neurosci. 29(41), S. 13079-89.

Kosik, K.S. (2006): *The neuronal microRNA system*. In: Nat Rev Neurosci. 7(12), S. 911-20.

Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N. (2005): *Combinatorial microRNA target predictions*. In: Nat Genet. 37(5), S. 495-500.

Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K., Kosik, K.S. (2003): *A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development*. In: RNA 9(10), S. 1274-81.

Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isacson, O., Kosik, K.S. (2006): *Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis*. In: Stem Cells 24(4), S. 857-64.

Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J., Schübeler, D., Oertner, T.G., Schratt, G., Bibel, M., Roska, B., Filipowicz, W. (2010): *Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs*. In: Cell 141(4), S. 618-31.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2005): *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. In: Nature 438(7068), S. 685-9.

Krützfeldt, J., Poy, M.N., Stoffel, M. (2006): *Strategies to determine the biological function of microRNAs*. In: Nat Genet. 38 Suppl., S. 14-9.

Krützfeldt, J., Kuwajima, S., Braich, R., Rajeev, K.G., Pena, J., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2007): *Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs*. In: Nucleic Acids Res. 35(9), S. 2885-92.

Kuner, R. (2010): *Central mechanisms of pathological pain*. In: Nat Med. 16(11), S. 1258-66.

Kusuda, R., Cadetti, F., Ravanelli, M.I., Sousa, T.A., Zanon, S., De Lucca, F.L., Lucas, G. (2011): *Differential expression of microRNAs in mouse pain models*. In: Mol Pain 7:17.

Lagos, D., Pollara, G., Henderson, S., Gratrix, F., Fabani, M., Milne, R.S., Gotch, F., Boshoff, C. (2010): *miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator*. In: Nat Cell Biol. 12(5), S. 513-9.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2002): *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. In: Curr Biol. 12(9), S. 735-9.

Latremoliere, A., Woolf, C.J. (2009): *Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity*. In: *The Journal of Pain* 10(9), S. 895-926.

Lau, P., Verrier, J.D., Nielsen, J.A., Johnson, K.R., Notterpek, L., Hudson, L.D. (2008): *Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes*. In: *J Neurosci.* 28(45), S. 11720-30.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. (1993): *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. In: *Cell* 75(5), S. 843-54.

Leoni, F., Zaliani, A., Bertolini, G., Porro, G., Pagani, P., Pozzi, P., Donà, G., Fossati, G., Sozzani, S., Azam, T., Bufler, P., Fantuzzi, G., Goncharov, I., Kim, S.H., Pomerantz, B.J., Reznikov, L.L., Siegmund, B., Dinarello, C.A., Mascagni, P. (2002): *The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(5), S. 2995-3000.

Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E.C., Lee, J.K., Porro, G., Pagani, P., Modena, D., Moras, M.L., Pozzi, P., Reznikov, L.L., Siegmund, B., Fantuzzi, G., Dinarello, C.A., Mascagni, P. (2005): *The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo*. In: *Mol Med.* 11(1-12), S. 1-15.

Leung, R.K., Whittaker, P.A. (2005): *RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics*. In: *Pharmacol Ther.* 107(2), S. 222-39.

Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2005): *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. In: *Cell* 120(1), S. 15-20.

Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C.B. (2003): *Prediction of mammalian microRNA targets*. In: *Cell* 115(7), S. 787-98.

Li, H., Zhong, X., Chau, K.F., Williams, E.C., Chang, Q. (2011): *Loss of activity-induced phosphorylation of MeCP2 enhances synaptogenesis, LTP and spatial memory*. In: *Nat Neurosci.* 14(8), S. 1001-8.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M. (2005): *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. In: *Nature* 433(7027), S. 769-73.

Lin, Y.C., Flock, K.E., Cook, R.J., Hunkele, A.J., Loh, H.H., Ko, J.L. (2008): *Effects of trichostatin A on neuronal mu-opioid receptor gene expression*. In: *Brain Res.* 1246, S. 1-10.

Liu, N.K., Wang, X.F., Lu, Q.B., Xu, X.M. (2009): *Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury*. In: *Exp Neurol.* 219(2), S. 424-9.

Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995): *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. In: *PCR Methods Appl.* 4(6), S. 357-62.

Lötsch, J., Geisslinger, G. (2010): *A critical appraisal of human genotyping for pain therapy*. In: Trends Pharmacol Sci. 31(7), S. 312-7.

Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D. (2008): *Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory*. In: J Neurosci 28(42), S. 10576-86.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (2006): *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. In: Thieme Verlag, Stuttgart; 16. Auflage.

Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S.B. (2005): *Role of the immune system in chronic pain*. In: Nat Rev Neurosci. 6(7), S. 521-32.

Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E. (2003): *DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation*. Science 302(5646), S. 890-3.

McMahon, S.B. (1997): *Are there fundamental differences in the peripheral mechanisms of visceral and somatic pain?* In: Behav Brain Sci. 20(3), S. 381-91.

McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M. (2007): *TRPA1 mediates formalin-induced pain*. In: Proc Natl Acad Sci U S A 104(33), S. 13525-30.

Meller, S.T., Gebhart, G.F. (1997): *Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat*. In: Eur J Pain 1(1), S. 43-52.

Messlinger, K. (1997): *Was ist ein Nozizeptor?* In: Anaesthesist 46(2), S. 142-153.

Messlinger, K. (2002): *Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentstehung*. In: Manuelle Medizin 40(1), S. 13-21.

Milligan, E.D., Watkins, L.R. (2009): *Pathological and protective roles of glia in chronic pain*. In: Nat Rev Neurosci. 10(1), S. 23-36.

Mu, W., Zhang, W. (2012): *Bioinformatic Resources of microRNA Sequences, Gene Targets, and Genetic Variation*. In: Front Genet. 3:31.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008): *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. In: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 9. Auflage.

Na, E.S., Nelson, E.D., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M. (2012): *The Impact of MeCP2 Loss- or Gain-of-Function on Synaptic Plasticity*. In: Neuropsychopharmacology; DOI: 10.1038/npp.2012.116.

Nakamachi, Y., Kawano, S., Takenokuchi, M., Nishimura, K., Sakai, Y., Chin, T., Saura, R., Kurosaka, M., Kumagai, S. (2009): *MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and*

monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum.* 60(5), S. 1294-304.

Nakanishi, K., Nakasa, T., Tanaka, N., Ishikawa, M., Yamada, K., Yamasaki, K., Kamei, N., Izumi, B., Adachi, N., Miyaki, S., Asahara, H., Ochi, M. (2010): *Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice.* In: *Spinal Cord* 48(3), S. 192-6.

Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., Asahara, H. (2008): *Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue.* In: *Arthritis Rheum.* 58(5), S. 1284-92.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A. (1998): *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.* In: *Nature* 393(6683), S. 386-9.

NanoDrop 1000 Spectrophotometer, V3.7 User's Manual, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE 19810 U.S.A., www.nanodrop.com, Revised 7/08.

Niederberger, E., Kynast, K.L., Lötsch, J., Geisslinger, G. (2011): *MicroRNAs as new players in the pain game.* In: *Pain* 152(7), S. 1455-8.

Nudelman, A.S., DiRocco, D.P., Lambert, T.J., Garelick, M.G., Le, J., Nathanson, N.M., Storm, D.R. (2010): *Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo.* In: *Hippocampus* 20(4), S. 492-8.

Packer, A.N., Xing, Y., Harper, S.Q., Jones, L., Davidson, B.L. (2008): *The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease.* In: *J Neurosci.* 28(53), S. 14341-6.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun, G. (2000): *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.* In: *Nature* 408(6808), S. 86-9.

Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., Chan, E.K. (2008): *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients.* In: *Arthritis Res Ther.* 10(4), R. 101.

Pereira, J.A., Baumann, R., Norrmén, C., Somandin, C., Mieke, M., Jacob, C., Lühmann, T., Hall-Bozic, H., Mantei, N., Meijer, D., Suter, U. (2010): *Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity.* In: *J Neurosci.* 30(19), S. 6763-75.

Poggi, S.H., Goodwin, K.M., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Tendi, E., Schninelli, S., Spong, C.Y. (2003): *Differential expression of c-fos in a mouse model of fetal alcohol syndrome.* In: *Am J Obstet Gynecol.* 189(3), S. 786-9.

Poh, K.W., Yeo, J.F., Ong, W.Y. (2011): *MicroRNA changes in the mouse prefrontal cortex after inflammatory pain*. In: Eur J Pain 15(8), 801.e1-12.

Ponomarev, E.D., Veremeyko, T., Barteneva, N., Krichevsky, A.M., Weiner, H.L. (2011): *MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway*. In: Nat Med. 17(1), S. 64-70.

Preall, J.B., Sontheimer, E.J. (2005): *RNAi: RISC gets loaded*. In: Cell 123(4), S. 543-5.

Recchiuti, A., Krishnamoorthy, S., Fredman, G., Chiang, N., Serhan, C.N. (2011): *MicroRNAs in resolution of acute inflammation: identification of novel resolvins D1-miRNA circuits*. In: FASEB J. 25(2), S. 544-60.

Reich, K., Augustin, M. (2005): *Biologics in der Therapie der Psoriasis*. Arzneimitteltherapie 23, S. 384-97.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. (2000): *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. In: Nature 403(6772), S. 901-6.

Rössler, H., Rüter, W. (2007): *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München; 19. Auflage.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2000): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. In: Cold Spring Harbor Laboratory; 3. Auflage.

Sanchez Freire, V., Burkhard, F.C., Kessler, T.M., Kuhn, A., Draeger, A., Monastyrskaya, K. (2010): *MicroRNAs may mediate the down-regulation of neurokinin-1 receptor in chronic bladder pain syndrome*. In: Am J Pathol. 176(1), S. 288-303.

Sanuki, R., Onishi, A., Koike, C., Muramatsu, R., Watanabe, S., Muranishi, Y., Irie, S., Uneo, S., Koyasu, T., Matsui, R., Chérasse, Y., Urade, Y., Watanabe, D., Kondo, M., Yamashita, T., Furukawa, T. (2011): *miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression*. In: Nat Neurosci. 14(9), S. 1125-34.

Schaefer, A., O'Carroll, D., Tan, C.L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., Greengard, P. (2007): *Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs*. In: J Exp Med. 204(7), S. 1553-8.

Schmidt, R.F., Lang, F. (2007): *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. In: Springer Berlin Heidelberg; 30. Auflage.

Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., Greenberg, M.E. (2006): *A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development*. In: Nature 439(7074), S. 283-9.

Schratt, G. (2009): *Fine-tuning neural gene expression with microRNAs*. In: Curr Opin Neurobiol. 19(2), S. 213-9.

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., Rajewsky, N. (2008): Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. In: *Nature* 455(7209), S. 58-63.

Shahbazian, M.D., Antalffy, B., Armstrong, D.L., Zoghbi, H.Y. (2002): *Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation*. In: *Hum Mol Genet.* 11(2), S. 115-24.

Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J., Kane, C., Hübel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M.E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J., Schratt, G.M. (2009): *A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the dephalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis*. In: *Nat Cell Biol.* 11(6), S. 705-16.

Silber, J., Lim, D.A., Petritsch, C., Persson, A.I., Maunakea, A.K., Yu, M., Vandenberg, S.R., Ginzinger, D.G., James, C.D., Costello, J.F., Bergers, G., Weiss, W.A., Alvarez-Buylla, A., Hodgson, J.G. (2008): *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells*. In: *BMC Med.* 6:14.

Skalsky, R.L., Cullen, B.R. (2011): *Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene*. In: *PLoS One* 6(9), e24248.

Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., Williams, B.R. (2003): *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. In: *Nat Cell Biol.* 5(9), S. 834-9.

Smalheiser, N.R., Lugli, G. (2009): *microRNA regulation of synaptic plasticity*. In: *Neuromolecular Med.* 11(3), S. 133-40.

Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., Wulczyn, F.G. (2005): *Regulation of miRNA expression during neural cell specification*. In: *Eur J Neurosci.* 21(6), S. 1469-77.

Sonkoly, E., Wie, T., Janson, P.C., Sääf, A., Lundeberg, L., Tengvall-Linder, M., Norstedt, G., Alenius, H., Homey, B., Scheynius, A., Stähle, M., Pivarcsi, A. (2007): *MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?* In: *PLoS One* 2(7), e610.

Spizzo, R., Nicoloso, M.S., Croce, C.M., Calin, G.A. (2009): *SnapShot: MicroRNAs in Cancer*. In: *Cell* 137(3), S. 586-586.e1.

Sternberg, E.M. (2006): *Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens*. In: *Nat Rev Immunol.* 6(4), S. 318-28.

Strickland, E.R., Hook, M.A., Balaraman, S., Huie, J.R., Grau, J.W., Miranda, R.C. (2011): *MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair*. In: *Neuroscience* 186, S. 146-60.

- Strickland, I.T., Richards, L., Holmes, F.E., Wynick, D., Uney, J.B., Wong, L.F. (2011): *Axotomy-induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons*. In: PLoS One 6(8), e23423.
- Stucky, C.L., Dubin, A.E., Jeske, N.A., Malin, S.A., McKemy, D.D., Story, G.M. (2009): *Roles of transient receptor potential channels in pain*. In: Brain Res Rev. 60(1), S. 2-23.
- Sullivan, C.S., Ganem, D. (2005): *MicroRNAs and viral infection*. In: Mol Cell 20(1), S. 3-7.
- Szallasi, A., Cortright, D.N., Blum, C.A., Eid, S.R. (2007): *The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept*. In: Nat Rev Drug Discov. 6(5), S. 357-72.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., Baltimore, D. (2006): *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. In: Proc Natl Acad Sci U S A. 103(33), S. 12481-6.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Baltimore, D. (2007): *MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field*. In: Immunity 26(2), S. 133-7.
- Tan, P.H., Yang, .LC., Ji, R.R. (2009): *Therapeutic potential of RNA interference in pain medicine*. In: Open Pain J. 2, S. 57-63.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J., Engelhardt, S. (2008): *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. In: Nature 456(7224), S. 980-4.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K. (1992): *The formalin test: an evaluation of the method*. In: Pain 51(1), S. 5-17.
- Tochiki, K.K., Cunningham, J., Hunt, S.P., Géranton, S.M. (2012): *The expression of spinal methyl-CpG-binding protein 2, DNA methyltransferases and histone deacetylases is modulated in persistent pain states*. In: Molecular Pain 8:14.
- Trang, P., Wiggins, J.F., Daige, C.L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D., Weidhaas, J.B., Bader, A.G., Slack, F.J. (2011): *Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice*. In: Mol Ther. 19(6), S. 1116-22.
- Trepel, M. (2008): *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. In: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 4. Auflage.
- Tsuda, N., Mine, T., Ioannides, C.G., Chang, D.Z. (2009): *Synthetic microRNA targeting glioma-associated antigen-1 protein*. In: Methods Mol Biol. 487, S. 435-49.

Vella, M.C., Choi, E.Y., Lin, S.Y., Reinert, K., Slack, F.J. (2004): *The C. elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR*. In: *Genes Dev.* 18(2), S. 132-7.

Venkatachalam, K., Montell, C. (2007): *TRP channels*. In: *Annu Rev Biochem.* 76, S. 387-417.

Viader, A., Chang, L.W., Fahrner, T., Nagarajan, R., Milbrandt, J. (2011): *MicroRNAs modulate Schwann cell response to nerve injury by reinforcing transcriptional silencing of dedifferentiation-related genes*. In: *J Neurosci.* 31(48), S. 17358-69.

Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., Lee, S.K. (2007): *The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development*. In: *Genes Dev.* 21(7), S. 744-9.

Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H., Impey, S. (2005): *A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(45), S. 16426-31.

Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979): *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(2), S. 615-9.

Vojinovic, J., Damjanov, N., D'Urzo, C., Furlan, A., Susic, G., Pasic, S., Iagaru, N., Stefan, M., Dinarello, C.A. (2011): *Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis*. In: *Arthritis Rheum.* 63(5), S. 1452-8.

von Hehn, C.A., Baron, R., Woolf, C.J. (2012): *Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms*. In: *Neuron* 73(4), S. 638-52.

von Schack, D., Agostino, M.J., Murray, B.S., Li, Y., Reddy, P.S., Chen, J., Choe, S.E., Strassle, B.W., Li, C., Bates, B., Zhang, L., Hu, H., Kotnis, S., Bingham, B., Liu, W., Whiteside, G.T., Samad, T.A., Kennedy, J.D., Ajit, S.K. (2011): *Dynamic changes in the microRNA expression profile reveal multiple regulatory mechanisms in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain*. In: *PLoS One* 6(3), e17670.

Wang, Y., Liu, C., Guo, Q.L., Yan, J.Q., Zhu, X.Y., Huang, C.S., Zou, W.Y. (2011): *Intrathecal 5-azacytidine inhibits global DNA methylation and methyl-CpG-binding protein 2 expression and alleviates neuropathic pain in rats following chronic constriction injury*. In: *Brain Res.* 1418, S. 64-9.

Wayman, G.A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.Y., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., Impey, S. (2008): *An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(26), S. 9093-8.

Weng, H., Shen, C., Hirokawa, G., Ji, X., Takahashi, R., Shimada, K., Kishimoto, C., Iwai, N. (2011): *Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction*. In: *Biomed Res.* 32(2), S. 135-41.

White, F.A., Bhangoo, S.K., Miller, R.J. (2005): *Chemokines: integrators of pain and inflammation*. In: *Nat Rev Drug Discov.* 4(10), S. 834-44.

Willemen, H.L., Huo, X.J., Mao-Ying, Q.L., Zijlstra, J., Heijnen, C.J., Kavelaars, A. (2012): *MicroRNA-124 as a novel treatment for persistent hyperalgesia*. In: *J Neuroinflammation* 9(1):143.

Wood, K.V., de Wet, J.R., Dewji, N., DeLuca, M. (1984): *Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns*. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 124(2), S. 592-6.

Wood, K.V. (1990): *Luc genes: introduction of colour into bioluminescence assays*. In: *J Biolumin Chemilumin.* 5(2), S. 107-14.

Woolf, C.J., American College of Physicians, American Physiological Society (2004): *Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management*. In: *Ann Intern Med.* 140(6), S. 441-51.

Worm, J., Stenvang, J., Petri, A., Frederiksen, K.S., Obad, S., Elmén, J., Hedtjörn, M., Straarup, E.M., Hansen, J.B., Kauppinen, S. (2009): *Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF*. In: *Nucleic Acids Res.* 37(17), S. 5784-92.

Wu, D., Raafat, M., Pak, E., Hammond, S., Murashov, A.K. (2011): *MicroRNA machinery responds to peripheral nerve lesion in an injury-regulated pattern*. In: *Neuroscience* 190, S. 386-97.

Wu, D., Raafat, A., Pak, E., Clemens, S., Murashov, A.K. (2012): *Dicer-microRNA pathway is critical for peripheral nerve regeneration and functional recovery in vivo and regenerative axonogenesis in vitro*. In: *Exp Neurol.* 233(1), S. 555-65.

Wu, J., Xie, X. (2006): *Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression*. In: *Genome Biol.* 7(9):R85.

Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Kellis, M. (2005): *Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals*. In: *Nature* 434(7031), S. 338-45.

Xu, B., Hsu, P.K., Karayiorgou, M., Gogos, J.A. (2012): *MicroRNA dysregulation in neuropsychiatric disorders and cognitive dysfunction*. In: *Neurobiol Dis.* 46(2), S. 291-301.

Yamasaki, K., Nakasa, T., Miyaki, S., Ishikawa, M., Deie, M., Adachi, N., Yasunaga, Y., Asahara, H., Ochi, M. (2009): *Expression of MicroRNA-146a in osteoarthritis cartilage*. In: *Arthritis Rheum.* 60(4), S. 1035-41.

Yao, J., Liu, B., Qin, F. (2011): *Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(27), S. 11109-14.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R. (2003): *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. In: *Genes Dev.* 17(24), S. 3011-6.

Yoshida, N., Kobayashi, K., Yu, L., Wang, S., Na, R., Yamamoto, S., Noguchi, K., Dai, Y. (2011): *Inhibition of TRPA1 channel activity in sensory neurons by the glial cell line-derived neurotrophic factor family member, artemin*. In: *Mol Pain* 7:41.

Zhang, Z., Cai, Y.Q., Zou, F., Bie, B., Pan, Z.Z. (2011): *Epigenetic suppression of GAD65 expression mediates persistent pain*. In: *Nat Med.* 17(11), S. 1448-55.

Zhao, J., Seereeram, A., Nassar, M.A., Levato, A., Pezet, S., Hathaway, G., Morenilla-Palao, C., Stirling, C., Fitzgerald, M., McMahon, S.B., Rios, M., Wood, J.N.; London Pain Consortium. (2006): *Nociceptor-derived brain-derived neurotrophic factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain*. In: *Mol Cell Neurosci.* 31(3), S. 539-48.

Zhao, J., Lee, M.C., Momin, A., Cendan, C.M., Shepherd, S.T., Baker, M.D., Asante, C., Bee, L., Bethry, A., Perkins, J.R., Nassar, M.A., Abrahamsen, B., Dickenson, A., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Wood, J.N. (2010): *Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and pain thresholds*. In: *J Neurosci.* 30(32), S. 10860-71.

Zheng K., Li H., Zhu Y., Zhu Q., Qiu M. (2010): *MicroRNAs are essential for the developmental switch from neurogenesis to gliogenesis in the developing spinal cord*. In: *The Journal of Neuroscience* 30, S. 8245-50.

Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, .L, Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., Hu, L., Steen, J.A., Weitz, C.J., Greenberg, M.E. (2006): *Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation*. In: *Neuron* 52(2), S. 255-69.

Internetquellen

Deutsche Gesellschaft zum Studium des Schmerzes e.V. (DGSS); Sektion der International Association for the Study of Pain (IASP): *Zahlen und Fakten zum chronischen Schmerz*. Online im WWW unter http://www.dgss.org/fileadmin/pdf/ZahlenundFakten_neu.pdf [Stand: 08.08.2012].

Deutsche Schmerzgesellschaft e.V.; Sektion der International Association for the Study of Pain (IASP): *Versorgungssituation der Schmerztherapie in Deutschland. Stellungnahme der Deutschen Schmerzgesellschaft zum HTA-Bericht*. Online im WWW unter http://www.dgss.org/fileadmin/pdf/PK_250412_3_HTA_Bericht.pdf [Stand: 08.08.2012].

IGENUITY® SYSTEMS: *Ingenuity IPA Software - Pathway Analysis*. Online im WWW unter http://www.ingenuity.com/products/pathways_analysis.html [Stand: 08.08.2012].

International Association for the Study of Pain (IASP): *Classification of Chronic Pain; Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*. Online im WWW unter http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Classification_of_Chronic_Pain&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=2687 [Stand: 08.08.2012].

TargetScanHuman, Prediction of microRNA targets. Release 6.2: June 2012. Online im WWW unter http://www.targetscan.org/vert_61/ [Stand: 08.08.2012].

microRNA.org - Targets and Expression, Predicted microRNA targets & target downregulation scores, experimentally observed expression patterns. Release: August 2010. Last Update: 2010-11-01. Online im WWW unter <http://www.microrna.org/microrna/home.do> [Stand: 08.08.2012].

miRecords - an integrated resource for microRNA-target interactions. Last Update: 2010-11-25. Online im WWW unter <http://mirecords.biolead.org/> [Stand: 08.08.2012]. Siehe außerdem: Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X., Li, T. (2009): *miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions*. *Nucleic Acids Res.*, D105-D110.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das nozizeptive System	S.6
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der peripheren Sensibilisierung	S.9
Abb. 3: Zentrale Sensibilisierung; synaptische Übertragung im Dorsalhorn des Rückenmarks	S.11
Abb. 4: microRNA Prozessierung	S.13
Abb. 5: Prinzipien der microRNA-mRNA Interaktionen	S.14
Abb. 6: pMIR-REPORT™-Vektoren	S.41
Abb. 7: Fluoreszenzmarkierung der microRNA-Sonden	S.54
Abb. 8: microRNA Regulation im Rückenmark bzw. in DRGs nach peripherer Injektion von Formalin.....	S.62
Abb. 9: Regulation ZNS-spezifischer microRNAs im Rückenmark bzw. in DRGs nach peripherer Injektion von Zymosan.....	S.64
Abb. 10: Regulation ZNS-spezifischer microRNAs im Rückenmark bzw. in DRGs bei SNI-induzierter Neuropathie.....	S.65
Abb. 11: Chromogene <i>in situ</i> Hybridisierung spezifischer microRNA-Sonden bzw. einer Negativkontrolle im Rückenmark und in den DRGs.....	S.66
Abb. 12: Kolokalisation von microRNA-124a mit neuronalen Zellmarkern im Dorsalhorn..	S.68
Abb. 13: Kolokalisation von microRNA-124a mit weiteren neuronalen Zellmarkern im Dorsalhorn.....	S.69
Abb. 14: Kolokalisation von microRNA-134 mit neuronalen Zellmarkern im Dorsalhorn....	S.70
Abb. 15: Kolokalisation von microRNA-124a mit neuronalen Zellmarkern in DRGs.....	S.71
Abb. 16: Kolokalisation von microRNA-134 mit neuronalen Zellmarkern in DRGs.....	S.72
Abb. 17: Expression von microRNA-124a und -134 in unstimulierten Primärzellen.....	S.74
Abb. 18: Expression von microRNA-124a und -134 in Primärzellen nach Stimulation mit Zytokinmix	S.75
Abb. 19: Luziferase-Assay transfizierter HeLa-Zellen zur Überprüfung der microRNA-124a Expression unter zusätzlicher Verwendung von microRNA-Modulatoren	S.77
Abb. 20: Formalin-Test nach i.v.-Applikation des microRNA-124a-Inhibitors.....	S.79

Abb. 21: Formalin-Test nach i.v.-Applikation des microRNA-124a Mimics S.80

Abb. 22: Regulation anerkannter Schmerz- und Entzündungsmediatoren im Rückenmark nach peripherer Injektion von Formalin und i.v.-Applikation des microRNA-124a-Inhibitors oder des -Mimics S.81

Abb. 23: Kollokalisierung von microRNA-124a mit Zielproteinen im Rückenmark S.84

Abb. 24: qRT-PCR-Expressionsanalyse der microRNA-124a, der Ziel-mRNAs MeCP2, sowie dessen Targetgen BDNF, HDAC5 und MYST2 im Rückenmark S.85

Abb. 25: qRT-PCR-Analysen im Rückenmark nach Applikation des microRNA-124a-Inhibitors bzw. des -Mimics S.87

Abb. 26: Schematische Darstellung der Regulation und Modulation von microRNA-124a und der Entzündungsmarker bei der Formalin-induzierten, entzündlichen Nozizeption in den Schmerz-relevanten Geweben S.99

Abb. 27: Schematische Darstellung der potenziellen Funktion der validierten miR-124a Targets S.105

Die Abbildungen 1, 2, 3, 7, 26 & 27 wurden unter Verwendung der Graphikelemente von „SERVIER Medical Art“: Online im WWW unter <http://www.servier.de/medicalart/> [Stand: 08.08.2012], und unter Gebrauch der „Biomedical PowerPoint Toolkit-Suite“, Copyright © molifolio.com: Online im WWW unter <http://www.motifolio.com/> [Stand: 08.08.2012] angefertigt.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bioinformatische Datenbanken S.15

Tabelle 2: Expression ausgewählter microRNAs im ‚Agilent Mouse miRNA Microarray Rel12.0‘ von DNAVision siehe Anhang

Tabelle 3: Pipettierschema der HeLa-Transfektion mit den pMIR-REPORT™-Vektoren und den microRNA-interagierenden Oligonukleotiden S.49

7.4 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AF	Alexa Fluor®
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP	Alkalische Phosphatase
ASIC	engl. acid-sensing (proton-gated) ion channel
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDNF	engl. brain-derived neurotrophic factor
β -Gal	β -Galactosidase
BK	engl. big potassium (Large conductance, calcium- and voltage-gated potassium (BK) channels)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cDNA	komplementäre DNA (engl. copy-DNA)
CFA	Complete Freund's Adjuvant
cfu	koloniebildende Einheiten (engl. colony-forming units)
cFos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CGRP	engl. calcitonin gene-related peptide
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CM	Zytokinmix (engl. Cytokinemix)
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	engl. cAMP response element-binding protein
CT-Wert	Schwellenwertzyklus (engl. Threshold Cycle)
CXCL2/CXCR2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 / Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DOI	Digital Object Identifier
DRG	Spinalganglien, Hinterwurzelganglien (engl. dorsal root ganglia)
dsRNA	engl. double-stranded RNA, Doppelstrang-RNA
dT-Primer	Desoxythymidin-Primer
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. Linked Immunosorbent Assay
ES	Embryonale Stammzellen
et al.	„und andere“
Fast Red TR	4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemi-zinc chloride salt
FCS	Fetales Kälberserum
Formalin	Formaldehyd-Lösung
GABA	γ -Aminobuttersäure (engl. <i>gamma</i> -Aminobutyric acid)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. glial fibrillary acidic protein)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G _s	Stimulierendes G-Protein
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Kation
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC5	Histon-Deacetylase 5
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
HNPP	2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate
hsa	Homo sapiens
IB4	Isolektin B4
Iba1	engl. ionized calcium binding adaptor molecule 1
IFN	Interferon
IgG (H + L)	Immunglobulin G (heavy and light chain)
IL-1- β	Interleukin-1- β
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPA	engl. Ingenuity Pathway Analysis
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
i.t.	intrathekal
i.v.	intravenös
JAK-STAT	engl. janus kinase-signal transducer and activator of transcription
K ⁺	Kalium-Kation
kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LB-Medium	engl. lysogeny broth medium
LNA	engl. locked nucleic acid
LPS	Lipopolysaccharid
LTP	Langzeit-Potenzierung (engl. long-term potentiation)
MAPK	engl. mitogen-activated protein kinase
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl. multiple cloning site)
MeCP2	Methyl-CpG-bindendes Protein 2
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA, miR	microRNA

ml	Milliliter
mmu	Mus musculus
MPZ	engl. myelin protein zero
mRNA	messenger-RNA
MYST2	MYST Histon-Acetyltransferase 2
n.a.	nicht verfügbar (engl. not available)
Na _v 1.8	spannungsabhängiger Natriumkanal 1.8
NBT	Nitroblautetrazolium
NF200	Neurofilament 200 kDa
ng	Nanogramm
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. nerve growth factor)
NGS	engl. normal goat serum
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NK1-R	Neurokinin 1-Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Neuropeptid
n.s.	nicht signifikant
ORF	engl. open reading frame
P2X3	Ionotroper Purinrezeptor (P2X)3
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffer saline)
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween [®] -20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLCβ/γ	Phospholipase Cβ/γ
PMP22	engl. peripheral myelin protein 22
pre-microRNA	pre-miR, pre-miRNAs
pri-microRNA	pri-miR, pri-miRNAs
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
-R	-Rezeptor
REST	engl. repressor element 1-silencing transcription factor
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription

SCI	Rückenmarksverletzung (engl. spinal cord injury)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
shRNA	engl. short hairpin RNA
siRNA	engl. small interfering RNA
SNI	engl. Spared Nerve Injury
SNL	Spinalnerv-Ligatur (engl. spinal nerve ligation)
SSC	engl. sodium chloride, sodium citrate
STMN2	Stathmin-like 2
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tricine	N-[Tris-(hydroxymethyl)methyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton [®] X-100	O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]-polyethoxyethanol
Trk-A/B-R	Tyrosinkinase-A/B-Rezeptor
tRNA	transfer-RNA
TRP	engl. transient receptor potential
TRPA1	engl. TRP cation channel, subfamily A, member 1
TRPV1	engl. TRP cation channel, subfamily V, member 1
Tween [®] -20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Einheit (engl. unit)
u.a.	unter anderem
UNG	Uracil-N-Glykosylase
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
u.v.a.	und viele(s) andere
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT ₃	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)-Rezeptor 3
°C	Grad Celsius
(v/v)	Volumenanteil
%	Prozent

8. Anhang

8.1 microRNA Microarray-Tabelle

Tabelle 2: Expression ausgewählter microRNAs im ‚Agilent Mouse miRNA Microarray Rel12.0‘ von DNAVision. In der Tabelle ist die Expression der ZNS-spezifischen und ausgewählter, stark exprimierter bzw. regulierter microRNAs dargestellt, die über den Array identifiziert werden konnten. Angegeben ist die jeweilige Expression normalisiert gegen den Median aller „Expressionsintensitäten“.

	naiv	Formalin		Zymosan		Sham	SNI	
		1h	8h	1h	8h	1d	1d	7d
miR-9	1,90	1,73	1,61	2,35	1,88	1,81	1,63	1,71
miR-99a	35,68	36,73	38,00	38,59	37,11	34,89	36,77	33,30
miR-124a	19,71	18,08	15,87	15,89	18,19	17,66	17,21	16,48
miR-132	0,53	0,55	0,58	0,52	0,60	0,55	0,57	0,56
miR-134	0,16	0,18	0,15	0,15	0,19	0,20	0,16	0,15
let-7f	147,32	141,67	135,20	118,92	139,67	135,65	132,59	129,01
miR-29a	184,99	186,90	172,66	141,64	186,56	188,40	183,17	165,55
miR-96	79,93	71,25	64,50	56,97	71,29	74,11	73,43	73,11
miR-451	102,14	153,42	90,77	80,60	111,43	135,82	86,69	64,78
miR-494	23,23	27,54	12,35	4,20	22,66	31,09	7,97	10,82

8.2 Veröffentlichungen und Tagesbeiträge

Publikationen

Kynast, K.L., Russe, O.Q., Möser, C.V., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2013): *Modulation of CNS-specific microRNA-124a alters the inflammatory response in the formalin test in mice*. In: Pain 154(3), S. 368-76.

Niederberger, E., Möser, C.V., **Kynast, K.L.**, Geisslinger, G. (2013): *The non-canonical I κ B kinases IKK ϵ and TBK1 as potential targets for the development of novel therapeutic drugs*. In: Curr Mol Med. 13(7), S. 1089-97.

Lempp, T., Toennes, S.W., Wunder, C., Russe, O.Q., Möser, C.V., **Kynast, K.L.**, Freitag, C.M., Niederberger, E. (2012): *Altered gene expression in the prefrontal cortex of young rats induced by the ADHD drug atomoxetine*. In: Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 40, S. 221-228.

Kallenborn-Gerhardt, W., Schröder, K., Del Turco, D., Lu, R.R., **Kynast, K.L.**, Kosowski, J., Niederberger, E., Shah, A.M., Brandes, R.P., Geisslinger, G., Schmidtko, A. (2012): *NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury*. In: J Neurosci. 32(30), S. 10136-45.

Coste, O., Möser, C.V., Sisignano, M., **Kynast, K.L.**, Minden, A., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2012): *The p21-activated kinase PAK 5 is involved in formalin-induced nociception through regulation of MAP-kinase signaling and formalin-specific receptors*. In: Behav Brain Res. 234(1), S. 121-8.

Möser, C.V.*, **Kynast, K.L.***, Baatz, K., Russe, O.Q., Ferreirós, N., Costiuk, H., Lu, R.R., Schmidtko, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2011): *The protein kinase IKK ϵ is a potential target for the treatment of inflammatory hyperalgesia*. In: J Immunol. 187(5), S. 2617-25.

Niederberger, E., **Kynast, K.L.**, Lötsch, J., Geisslinger, G. (2011): *MicroRNAs as new players in the pain game*. In: Pain 152(7), S. 1455-8.

(*Authors have contributed equally)

Tagungsbeiträge

Posterpräsentationen

Kynast, K.L., Russe, O.Q., Möser, C., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2012): *microRNA-124a plays a role in inflammatory nociception in mice*. 14th World Congress on Pain®, Mailand, Italien. 27.08. bis 31.08.2012.

Russe, O.Q., **Kynast, K.L.**, Möser, C., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2012): *AMPK activators are potential inhibitors of inflammatory hyperalgesia*. 14th World Congress on Pain®, Mailand, Italien. 27.08. bis 31.08.2012.

Möser C., **Kynast, K.L.**, Lu, R.R., Russe, O.Q., Costiuk, H., Schmidtko, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2012): *I-kappaB kinase epsilon and Tank Binding Kinase are involved in inflammatory hyperalgesia*. 14th World Congress on Pain®, Mailand, Italien. 27.08. bis 31.08.2012.

Möser, C., **Kynast, K.L.**, Baatz, K., Russe, O.Q., Schmidtko, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2011): *I-kappaB kinase epsilon is involved in inflammatory hyperalgesia by modulation of NF-kappaB*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Frankfurt, 2011. 30.03. bis 01.04.2011.

Möser, C., **Kynast, K.L.**, Kupis, S., Häussler, A., Tegeder, I., Geisslinger, G., Niederberger, E. (2009): *I-kappaB kinases as novel targets for the pharmacotherapy of pain and inflammation*. 50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Mainz. 10.03. bis 12.03.2009.

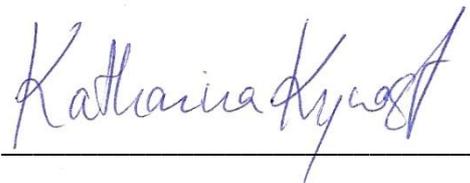
8.3 Eidesstattliche Erklärung

Sehr geehrte Damen, sehr geehrte Herren,

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation über „*Die Funktion von microRNAs bei der Entstehung und Verarbeitung von Schmerzen*“ selbständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und alle wörtlichen oder inhaltlichen Entlehnungen aus anderen benutzten Druckwerken oder digitalisierten Publikationen und Quellen kenntlich gemacht habe. Zudem versichere ich, dass ich die angefügte Dissertation in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht und mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, 27.11.2012

Ort, Datum



Handwritten signature of Katharina Kynast

Unterschrift (Katharina Kynast)