



Zirkulierende microRNAs beim komplexen regionalen Schmerzsyndrom

Circulating microRNAs in complex regional pain syndrome

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Neurowissenschaften

Vorgelegt von

Bernhard Schwab

aus

Weißenburg

Würzburg 2021



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Grit Hein

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Heike Rittner

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

3. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Martini

4. Betreuer: Dr. med. Ann-Kristin Reinhold

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Complex Regional Pain Syndrome.....	1
1.1.1	CRPS im Wandel der Zeit.....	1
1.1.2	Diagnose von CRPS.....	4
1.1.3	Epidemiologie des CRPS.....	5
1.1.4	Klinische Symptome des CRPS.....	6
1.1.5	Pathophysiologie des CRPS.....	8
1.1.6	Therapie des CRPS	13
1.2	microRNAs.....	15
1.2.1	Biogenese der miRNAs.....	16
1.2.2	Targeting von miRNAs.....	17
1.2.3	Funktionsmechanismen von miRNAs	18
1.2.4	Zirkulierende extrazelluläre miRNAs.....	18
1.2.5	Exosomen.....	20
1.2.6	miRNAs in der Medizin.....	21
1.2.7	miRNAs bei chronischem Schmerz	22
1.2.8	miRNAs bei CRPS.....	23
1.2.9	Auswahl der miRNAs	24
1.3	Fragestellung	29
2	Methoden.....	30
2.1	Patientenauswahl und -rekrutierung	30
2.2	Blutentnahme und Fraktionierung	31
2.3	Exosomen-Isolation	31
2.4	Transmissionselektronenmikroskopie	32
2.4.1	Fixierung und Kontrastierung der Exosomen	33
2.5	RNA-Isolation	34
2.5.1	Prinzip	34
2.5.2	Durchführung	35
2.6	cDNA-Synthese	36
2.7	Polymerasekettenreaktion.....	37
2.7.1	TaqMan™-qPCR	38
2.7.2	Durchführung und Auswertung	39
2.8	Statistik	41

2.8.1 Ausreißer-Definition	41
2.9 Klinische Scores und Fragebögen	42
2.9.1 Numerische Schmerzskala	43
2.9.2 Neuropathic Pain Symptom Inventory	43
2.9.3 Graded Chronic Pain Scale	43
2.9.4 CRPS Severity Score	44
2.9.5 Beck Depression Inventory II	45
2.10 Geräte und Software	45
2.11 Kits und Chemikalien	46
3 Ergebnisse	48
3.1 Demographie	48
3.2 Gruppenvergleich	50
3.2.1 Erhöhte miRNA-Expression im Plasma von CRPS-Patienten	50
3.2.2 Keine Unterschiede bei der Expression der miRNAs in Leukozyten	52
3.2.3 Elektronenmikroskopie der Exosomen	54
3.2.4 Hochregulation mehrerer exosomaler miRNAs von Frakturkontrollen	55
3.3 Korrelation	58
4 Diskussion	61
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4.2 Diskussion der Methoden	62
4.3 Diskussion der Ergebnisse	65
4.3.1 Expression in den Exosomen	65
4.3.2 Expression im Plasma	67
4.3.3 Expression in den Leukozyten	69
4.3.4 Einfluss von Alter und Geschlecht	70
5 Zusammenfassung	74
6 Summary	76
7 Literaturverzeichnis	78
8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	88
9 Abkürzungsverzeichnis	89
10 Anhang	90
10.1 Korrelation von CRPS-Patienten und Frakturkontrollen	90
10.1.1 Plasma	90
10.1.2 Leukozyten	91
10.2 Korrelation der CRPS-Patienten der Einzelgruppe	91

10.2.1 Plasma	91
10.2.2 Leukozyten.....	92
10.2.3 Exosomen.....	93
10.3 Korrelation der Frakturkontrollen der Einzelgruppe	94
10.3.1 Plasma	94
10.3.2 Leukozyten.....	94
10.3.3 Exosomen.....	95
11 Danksagung	96
12 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
13 Eidesstattliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Complex Regional Pain Syndrome

1.1.1 CRPS im Wandel der Zeit

Die Bezeichnung „Complex Regional Pain Syndrome“ (CRPS) wurde 1993 von der International Association of the Study of Pain (IASP) eingeführt, um einen Symptomkomplex zu beschreiben, der durch einen Stimulus induzierten, regionalen und hauptsächlich distal gelegenen Schmerz charakterisiert wird [1]. Dieser Schmerz verhält sich disproportional zum auslösenden Ereignis sowohl hinsichtlich der Dauer als auch der Intensität. Er ist mit einer Vielzahl von verschiedenen autonomen und motorischen Einschränkungen verbunden. Vorher gab es mehrere unterschiedliche Bezeichnungen und Diagnosekriterien, die eine einheitliche Diagnosestellung und Forschung erschwerten.

Bereits im 17. und 18. Jahrhundert wurden in der Literatur mehrfach Syndrome beschrieben, die stark an das erinnern, was heute als CRPS bekannt ist. Dennoch gilt die Publikation von Mitchell, Morehouse und Keen aus dem Jahre 1864 weithin als Erstbeschreibung [2]. Sie beschrieben einen typischen brennenden Schmerz nach Nervenverletzungen durch Schusswunden, die mit Schwellung, Farb- und Temperaturasymmetrien der Haut, Empfindlichkeit gegenüber Berührung und Steifheit der Gelenke verbunden war. In einer späteren Veröffentlichung von 1872 nannte Mitchell das Syndrom Kausalgie.

Unter Verwendung der damals neuen Röntgentechnik beschrieb Paul Sudeck 1900 eine schmerzhaft und schnell fortschreitende Knochenatrophie [3]. Sie trat nach Weichteilschädigung und anderen Verletzungen auf und führte zu verschiedenen Symptomen, die bereits zuvor von Mitchell beschreiben worden waren [2]. Sudeck postulierte erstmals einen inflammatorischen Ursprung der Erkrankung.

Der französische Arzt René Lériche entwickelte 1917 die Hypothese, dass das sympathische Nervensystem entscheidend an der Entstehung der Kausalgie beteiligt sei. Diese Annahme basierte auf der erfolgreichen Behandlung eines Patienten mittels Sympathektomie im Bereich der *Arteria brachialis* [4]. Die Vermutung einer zentralen Rolle des Sympathikus bei der Schmerzentstehung wurde später von James A. Evans aufgegriffen. Er beschrieb 1947 Schmerzsyndrome bei 57 Patienten, die mit Symptomen wie Rötung, Blässe, Schwitzen, Ödemen und einer Atrophie von Haut und Knochen verbunden waren und von ihm durch eine sympathische Stimulation erklärt wurden [5]. Auch er konnte

eine Abschwächung des Schmerzes durch Sympathikusblockaden beobachten. Deshalb nahm er an, dass es durch gesteigerte Afferenzen im verletzten Gebiet zu einer Stimulation des Sympathikus komme. Evans prägte die Bezeichnung „Reflex Sympathetic Dystrophy“ (Reflexdystrophie, RSD), die auch heute teilweise noch verwendet wird.

Die IASP änderte im Rahmen ihrer ersten Konferenzen in den Jahren 1988 und 1993 die Bezeichnung des Krankheitsbildes in „Complex Regional Pain Syndrome“, um zu verdeutlichen, dass der Schmerz und nicht die Dystrophie-Symptomatik entscheidend sei. Dabei wurden auch erstmals Diagnosekriterien festgelegt [1].

Diagnosekriterien der IASP für CRPS (Orlando-Kriterien) [1]

CRPS I

1. Vorhandensein eines auslösenden schädigenden Ereignisses
2. Anhaltender Schmerz, Allodynie oder Hyperalgesie, wobei der Schmerz nicht durch das auslösende Ereignis erklärt werden kann
3. Nachweis von Ödemen, Veränderungen der Hautdurchblutung oder abnormale sudomotorische Durchblutung zum aktuellen oder einem früheren Zeitpunkt
4. Ausschluss einer anderen Ursache für einen derartigen Schmerz und solche Dysfunktionen

CRPS II

1. Typ II ist ein Syndrom, das nach der Verletzung eines Nervs auftritt. Spontane Schmerzen oder Allodynie/Hyperalgesie liegen vor und sind nicht beschränkt auf das Dermatom des verletzten Nervs.
2. Nachweis von Ödemen, Veränderungen der Hautdurchblutung oder abnormale sudomotorische Durchblutung zum aktuellen oder einem früheren Zeitpunkt im Bereich des Schmerzes nach dem auslösenden Ereignis
3. Ausschluss einer anderen Ursache für einen derartigen Schmerz und solche Dysfunktionen

Dabei wurde auch erstmals zwischen dem CRPS I, bei dem definitionsgemäß keine Nervenverletzung vorliegt, und dem CRPS II mit einer obligat vorhandenen Nervenschädigung unterschieden. Das CRPS I sollte dabei dem Krankheitsbild der RSD entsprechen, während das CRPS II der Kausalgie nachempfunden war.

Die Problematik dieser Kriterien bestand darin, dass sie trotz einer guten Sensitivität von 90% eine schlechte Spezifität von weniger als 50% und eine schlechte interne Validität

aufwiesen. So erfüllten in einer Validierungsstudie 37% der Patienten mit einer diabetischen Neuropathie die Diagnosekriterien für CRPS, weil auch sie häufig mechanische Allodynie und Hauttemperatur-Asymmetrien in einer Verbindung mit Ödemen aufwiesen [6]. Für eine weitere Optimierung wurden die klinischen Symptome von Patienten, die anhand der IASP-Kriterien diagnostiziert wurden, mit einer Faktorenanalyse stratifiziert und in vier Untergruppen eingeteilt, nämlich sensorisch, vasomotorisch, ödematös/sudomotorisch und trophisch/motorisch. Mit dieser Einteilung in vier Gruppen konnte die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse im Vergleich mit den beiden Gruppen der IASP-Kriterien verringert werden. Diese vier Gruppen bildeten auch die Grundlage für die Diagnosekriterien von Bruhl und Harden, die 2003 bei der Konsensus-Konferenz in Budapest mit geringfügigen Änderungen angenommen und als neue Kriterien etabliert wurden [7, 8].

Budapest Kriterien

1. Anhaltender Schmerz, der durch das Anfangstrauma nicht mehr erklärt werden kann
2. In der Anamnese muss der Patient von mindestens einem Symptom aus **drei** der vier folgenden Kategorien berichten:
 - Sensorisch: Hyperästhesie und/oder Allodynie
 - Vasomotorisch: Temperaturasymmetrie und/oder Veränderung der Hautfarbe und/oder Asymmetrie der Hautfarbe
 - Sudomotorisch/ödematös: Ödem und/oder Veränderungen des Schwitzens und/oder Asymmetrie des Schwitzens
 - Motorisch/trophisch: Verringerung des Bewegungsausmaßes und/oder motorische Dysfunktion (Schwäche, Tremor, Dystonie) und/oder trophische Veränderungen (Nägel, Haare, Haut)
3. Zum Zeitpunkt der Untersuchung muss beim Patienten mindestens ein Symptom aus **zwei** der vier folgenden Kategorien nachgewiesen werden:
 - Sensorisch: Hyperalgesie (im Pinprick) und/oder Allodynie (bei leichter Berührung, Temperatur, etc.)
 - Vasomotorisch: Temperaturasymmetrie ($> 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) und/oder Veränderung der Hautfarbe und/oder Asymmetrie der Hautfarbe
 - Sudomotorisch/ödematös: Ödeme und/oder Veränderungen des Schwitzens und/oder Asymmetrie des Schwitzens
 - Motorisch/trophisch: Verringerung des Bewegungsausmaßes und/oder motorische Dysfunktion (Schwäche, Tremor, Dystonie) und/oder trophische Veränderungen (Nägel, Haare, Haut)

4. Eine andere Erkrankung, wie z. B. eine entzündliche Erkrankung oder Thrombose erklärt die Summe der Krankheitszeichen nicht hinreichend.

In der neuen Fassung war die Angabe von drei Symptomen aus den vier Kategorien für eine Diagnose ausreichend. Für diese klinischen Diagnosekriterien konnten in einer Validierungsstudie eine Sensitivität von 0,99 und eine Spezifität von 0,68 nachgewiesen werden [9]. Die ursprünglichen Kriterien, die Symptome in allen vier Kategorien voraussetzen, werden noch im Bereich der Forschung eingesetzt und verfügen über eine Sensitivität von 0,78 und eine Spezifität von 0,79.

1.1.2 Diagnose von CRPS

Die Diagnose von CRPS erfolgt ausschließlich klinisch, wobei das vierte der oben genannten Diagnosekriterien bereits darauf hinweist, dass es sich dabei grundsätzlich um eine Ausschlussdiagnose handelt [10]. Apparative Diagnosemittel werden daher hauptsächlich dazu verwendet, um mögliche Differentialdiagnosen eliminieren zu können. Dazu gehören insbesondere Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Entzündungen, thromboembolische Erkrankungen, Kompartment- sowie Nervenkompressions-syndrome [10]. Für die apparative Diagnostik gibt es keinen Goldstandard und keine pathognomonischen Befunde, sodass auch ein Normalbefund eine Erkrankung nicht ausschließen kann. Darüber hinaus sollte die Diagnostik bei einem hinreichenden klinischen Verdacht eine Therapie nicht verzögern.

Etwa die Hälfte der Patienten weisen in der konventionellen Röntgenaufnahme nach ein bis zwei Monaten charakteristische gelenknahe Entkalkungsmuster auf [11]. Die 3-Phasen-Skelettszintigraphie mit Technetium-99m führt bei CRPS zu einer verstärkten Traceraufnahme in allen drei Phasen, was auf eine erhöhte Perfusion und einen gesteigerten Knochenumsatz hinweist [12]. Sie eignet sich vor allem für die frühe Erkrankungsphase und weist eine Sensitivität von 54% und eine Spezifität von 94% auf [13]. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit und der hohen Kosten wird diese Untersuchung hauptsächlich im Rahmen von Studien und bei gutachterlichen Fragen eingesetzt.

Wiederholte oder kontinuierliche Messungen der Hauttemperatur im Seitenvergleich können die Diagnose ebenfalls unterstützen, wenn Temperaturunterschiede von 1-2 °C

festgestellt werden können. Mit einer kontinuierlichen Messung kann man außerdem seitenasynchrone Schwankungen der Hauttemperatur nachweisen, die eine noch höhere Spezifität haben [14].

Die Durchführung einer konventionellen neurologischen Untersuchung (Elektroneurographie, Elektromyographie, evozierte Potenziale) ist sowohl für einen Ausschluss von Differentialdiagnosen als auch für eine Differenzierung zwischen CRPS I und II durch eine Verifizierung von Nervenläsionen sinnvoll [15, 16].

Die laborchemische Untersuchung liefert bei CRPS keine spezifischen Befunde und es konnte bisher auch kein verlässlicher Biomarker identifiziert werden [15, 17].

1.1.3 Epidemiologie des CRPS

Bei der Vielzahl von unterschiedlichen Diagnosekriterien ist es nicht verwunderlich, dass die Literatur sehr unterschiedliche Inzidenzen für CRPS angibt [6, 7]. Zwei große epidemiologische Studien deuteten darauf hin, dass die Inzidenz zwischen 5,5/100.000/Jahr und 26,2/100.000/Jahr liegt [18, 19]. Allerdings wurden dabei die IASP-Kriterien verwendet, die eine schlechte Spezifität aufweisen. Beerthuizen et al. konnten eine Abhängigkeit der Inzidenz von den verwendeten Diagnosekriterien nachweisen. In ihrer Studie mit 596 Patienten mit Extremitätenfrakturen erfüllten 48,5% die IASP-Kriterien, während mit den spezifischeren Budapest-Forschungskriterien nur 7% mit CRPS diagnostiziert wurden [20]. Bei einer Studie mit Patienten nach einer Karpaltunneloperation führten die klinischen Budapest-Kriterien zu einer vergleichbaren Inzidenz von 6,6% [21]. CRPS manifestiert sich überproportional häufig bei Frauen, die etwa 80% der Erkrankten bilden [18-20]. Auch wenn die Erkrankung theoretisch in jedem Alter auftreten kann, gibt es einen Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter mit einem Maximum in der Altersgruppe 50-59 Jahre [18].

Mehrere Untersuchungen bestätigten Frakturen als die häufigsten auslösenden Ereignisse für die Entwicklung des CRPS [11, 16, 19]. Darüber hinaus wurde eine Vielzahl weiterer Auslöser beschrieben, wie Verstauchungen, Operationen, Injektionen, lokale Infektionen, Verbrennungen, Erfrierungen, Sehnenverletzungen, Schlaganfälle und Herzinfarkte, Querschnittssyndrome und beinahe alle Nerven- und Plexusläsionen [11, 16, 18, 19]. In bis zu 10% der Fälle ist es allerdings nicht möglich, ein auslösendes Ereignis zu identifizieren [11, 22, 23]. Obwohl sich CRPS häufiger an der oberen Extremität manifestiert,

scheint die Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung nach Frakturen der unteren Extremität höher zu sein [18-20]. Eine Dislokation der Fraktur, Trümmerbrüche und eine Gelenkbeteiligung können die Erkrankungswahrscheinlichkeit ebenfalls steigern [20].

1.1.4 Klinische Symptome des CRPS

Das Leitsymptom des CRPS ist ein Schmerz, der in keiner Relation zum ursprünglichen Trauma oder auslösenden Ereignis steht und zwar sowohl hinsichtlich der Dauer als auch der Intensität [16]. Der Schmerz zeigt sich meistens in der Form eines Dauerschmerzes mit schwankender Intensität (77%), seltener kommen allerdings auch intermittierende und einschließende Schmerzen vor (23%) [24]. Dabei können körperliche oder psychische Belastung, Berührung und Temperatur- und Lageänderungen den Schmerz provozieren oder verstärken. Die Patienten berichten oft von einem in der Tiefe lokalisierten Schmerz mit einem vorrangig ziehenden, brennenden oder stechenden Charakter [24]. Darüber hinaus tritt in vielen Fällen eine nächtliche Akzentuierung auf [15].

Sensibilitätsstörungen sind ein häufiges Symptom, das sich bei 88% der CRPS-Patienten nachweisen lässt [24]. Diese Störungen folgen in der Regel einem strumpfförmigen Verteilungsmuster distal der Lokalisation des Auslösers oder beschränken sich auf die Handflächen und Fußsohlen [24]. In der klinisch-neurologischen Untersuchung zeigt das sensorische System der meisten CRPS-Patienten auch funktionelle Einbußen und pathologisch erhöhte Antwortmuster [25]. Die Störungen betreffen sowohl das protopathische (Druck, Temperatur, Schmerz) als auch das epikritische System (feine Tastempfindung, Zwei-Punkt-Diskrimination, Vibration) [24]. Die am häufigsten bei CRPS-Patienten auftretenden Beeinträchtigungen sind eine gesteigerte Wahrnehmung schmerzhafter Reize (Hyperalgesie) und eine abgeschwächte Wahrnehmung nicht-schmerzhafter Stimuli (Hypästhesie) [25].

Temperatur- und Farbunterschiede der Haut zwischen gesunden und erkrankten Extremitäten sind ein häufiges Symptom und können bei 80% der Patienten nachgewiesen werden [11, 24]. Dabei kann man zwischen den Erkrankten mit einem „warmen“ Verlaufstyp mit überwärmten, geröteten und geschwollene Extremitäten und solchen mit einem „kalten“ Verlaufstyp mit kälteren und bläulich lividen Extremitäten unterscheiden [26]. Etwa 70% der Patienten gehören dem warmen Typ an, während circa 30% der Patienten einen

primär kalten Typ aufweisen [10, 26]. Bei der Ausprägung der autonomen Hautsymptomatik handelt es sich nicht um einen beständigen Zustand, weil sie tagesabhängigen Fluktuationen unterliegt [27]. Während des Krankheitsverlaufs kann es bei den Erkrankten zu einem Übergang von der warmen in die kalte Verlaufsform kommen. Ein Wandel von der kalten in die warme Verlaufsform wird allerdings nicht beobachtet [26]. Auch wenn Ödeme pathophysiologisch sowohl autonom als auch inflammatorisch bedingt sein können, werden sie üblicherweise den autonomen Symptomen zugeordnet [16]. Zu Beginn der Erkrankung weisen ca. 80 % der Patienten ein distales Ödem auf. Durch Orthostase, körperliche Anstrengung oder auch eine übertrieben intensive Physiotherapie kann das Ödem erheblich verstärkt werden [15]. Im Krankheitsverlauf kann häufig ein Rückgang des Ödems beobachtet werden, es bleibt jedoch bei ca. 40 % der Patienten auch im chronischen Stadium bestehen [16].

97 % der CRPS-Patienten weisen motorische Einschränkungen auf, die sich vor allem in einer Reduktion der Bewegungsfreiheit und des Kraftgrades zeigen und initial vor allem durch eine schmerz- und ödem-bedingte Bewegungsreduktion hervorgerufen werden [24]. Im späteren Krankheitsverlauf sind eher Fibrosierungsprozesse und Kontrakturen entscheidend. Unabhängig von der Krankheitsdauer weisen CRPS-Patienten pathologisch erhöhte Sehnenreflexe in der betroffenen Extremität auf [24]. Darüber hinaus können sich im Verlauf schwere muskuläre Pathologien wie Spasmen, Myoklonien, Tremor und Dystonien entwickeln, wovon bei den CRPS Typ II Patienten etwa ein Drittel betroffen ist [15, 24].

Bei CRPS-Patienten zeigen sich auch verstärkt Störungen des Körperschemas, die zu Störungen bei der Einleitung und Ausführung von Bewegungen führen können [16]. Dabei wird die betroffene Extremität in den meisten Fällen als vergrößert wahrgenommen [28]. Außerdem berichten Patienten von einem Gefühl der Fremdartigkeit der erkrankten Gliedmaßen [29]. Diese sogenannte Neglect-ähnliche Symptomatik entwickeln etwa 54 % der Patienten [15]. Bei den Betroffenen ist das Ausführen komplexer Bewegungen nur unter visueller Kontrolle möglich und es kommt zu Einschränkungen bei der Lokalisation von taktilen Stimuli.

CRPS kann zu unterschiedlichen trophischen Veränderungen an der betroffenen Extremität führen. Ausgeprägte trophische Störungen von Haut und Hautanhangsgebilden finden sich in ca. 30-40 % der Fälle [15]. Die Haut wird dann im Verlauf meist dünner und

glänzend. Das Wachstum von Fingernägeln und Haaren kann sich vor allem im frühen Krankheitsstadium erhöhen. Schon früh kann es ohne eine adäquate Therapie zu Fibrosierungen von Faszien kommen. Später kommt es auch zur Atrophie der Knochen, die sich im Röntgen als fleckige Entkalkung zeigt [16].

1.1.5 Pathophysiologie des CRPS

1.1.5.1 Inflammation

Vor allem beim warmen Verlaufstyp ähnelt das klinische Bild des CRPS stark einer peripheren Entzündung [30]. Dabei entsprechen Schmerz, Ödem, Temperatur- und Farbasymmetrie der Haut und die Bewegungseinschränkungen den klassischen Entzündungszeichen *Dolor, Tumor, Calor, Rubor* und *Functio laesa*. Allerdings können auch bei der kalten Verlaufsform vermehrt proinflammatorische Prozesse nachgewiesen werden [26, 30]. Auch die trophischen CRPS-Symptome können im Rahmen einer Inflammation erklärt werden. Fibrosierungsprozesse und Wachstumsveränderungen der Hautanhangsgebilde werden u. a. durch den stimulierenden Einfluss proinflammatorischer Chemokine auf bindegewebeproduzierende Zellen verursacht [31-33]. Ebenso erfolgt eine Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten, die zu einer Erhöhung des Knochenumsatzes führt [34]. Die lokale Hyperhidrose kann man durch eine Sensibilisierung der Schweißdrüsen durch das Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) erklären [35].

Demgegenüber weisen CRPS-Patienten bei der Untersuchung klassischer zellulärer und humoraler Entzündungsparameter keine auffälligen Befunde auf [36, 37]. Auch wenn bei der Verteilung der leukozytären Subpopulationen im Differentialblutbild kein Unterschied auftritt, so konnte durch Immunphänotypisierung eine Erhöhung von CD14+ und CD16+ positiven Monozyten bei CRPS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen nachgewiesen werden [38]. Die Zellanzahl dieser Monozyten korrelierte dabei mit der Ausprägung kalter Allodynie. Das Serum von CRPS-Patienten enthält außerdem verstärkt mRNAs der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF α) und Interleukin-2 (IL-2), während zugleich die mRNAs der antiinflammatorischen Mediatoren IL-10 und IL-4 erniedrigt sind [39]. Auch verschiedene Neuropeptide, wie Substanz P, Bradykinin und CGRP, können im Patientenserum in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden [40, 41]. Sie werden bei Neuroinflammation durch sensitivierte nozizeptive Fasern freigesetzt.

Weil die klinische Manifestation von CRPS lokal begrenzt sind, erwiesen sich Untersuchungen des betroffenen Gewebes als aufschlussreich. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Haut zeigte sich im akuten Stadium eine Vermehrung von zytokinproduzierenden Keratinozyten und Mastzellen, während sie im chronischen Stadium vermindert waren [42]. Die Haut von Patienten mit einem akuten CRPS wies erhöhte Spiegel von TNF- α im Vergleich mit komplikationslosen Traumapatienten auf [43]. Darüber hinaus konnten erhöhte Konzentrationen einer Vielzahl weiterer inflammatorischer Zytokine, Peptide und Trypsasen nachgewiesen werden [44]. Diese Anreicherung war dabei interessanterweise nicht nur auf die pathologische Seite beschränkt, sondern konnte teilweise auch kontralateral in vergleichbarem Maße festgestellt werden. Trotz der lokal begrenzten klinischen Präsentation scheint beim CRPS ein systemischer inflammatorischer Zustand vorzuliegen. Nach einer sechsmonatigen Therapie normalisierten sich die Zytokin-Veränderungen auf beiden Seiten [44].

In größer angelegten Langzeitstudien konnte ein Rückgang der Zytokin-Konzentration der Haut auch ohne eine Therapie nachgewiesen werden, wobei allerdings die klinische Symptomatik weitgehend erhalten blieb [45, 46]. Man kann daher annehmen, dass es im Verlauf des CRPS zu einem Wandel der zugrundeliegenden Pathophysiologie kommt. Im chronischen Stadium nimmt die Bedeutung der Inflammation eher ab, während alternative Mechanismen zu einer Aufrechterhaltung der Symptomatik führen [26, 47].

1.1.5.2 Autoimmunität

Die Erwägung einer autoimmunologischen Ätiologie des CRPS ist relativ neu und beruht auf einer Reihe von Beobachtungen, die im letzten Jahrzehnt gemacht wurden. Bei bis zu 70 % der Patienten konnten im Serum agonistische Autoantikörper gegen α 1-Adrenorezeptoren, β 2-Adrenorezeptoren sowie m2-Muskarinrezeptoren nachgewiesen werden. [32, 33]. Anti- β 2-Adrenorezeptor-Antikörper konnten aber auch schon bei Patienten mit orthostatischer Hypotonie nachgewiesen werden, die keine begleitende Schmerzsymptomatik aufwiesen [48]. Außerdem finden sich bei CRPS-Patienten hinsichtlich der Gesamtpopulation überproportional häufig postinfektiöse IgM- und IgG-Profile, für die eine Autoreaktivität gegenüber Neuronen des sympathischen Nervensystems nachgewiesen werden konnte [48].

Um die Annahme einer autoimmunen Teilgenese zu untermauern, wurden Mäusen im Experiment die IgG-Antikörper von CRPS-Patienten intraperitoneal verabreicht und durch Inzision der Hinterpfote wurde dann ein Extremitätentrauma simuliert. Die Mäuse entwickelten danach nur in der verletzten Extremität ein CRPS-ähnliches Krankheitsbild [49]. Die Tiere zeigten eine von der IgG-Dosis abhängige Hypersensitivität auf mechanische und thermische Stimuli. Anhand der mechanischen Hyperalgesie konnte eine verstärkte stimulusinduzierte Aktivität von A δ - und C-Nozizeptoren nachgewiesen werden [49]. Neben der peripheren Sensibilisierung konnte bei den Tieren eine ausgeprägte Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im Hinterhorn des Rückenmarks, im periaquäduktalen Grau und im somatosensorischen Kortex als Korrelat einer zentralen Sensibilisierung nachgewiesen werden. Die neurogliale Aktivierung wurde durch IL-1 vermittelt und war auch nach dem Abklingen der peripheren Inflammation noch nachweisbar [50].

1.1.5.3 Small-Fiber-Neuropathie

In mehreren Studien konnte in Hautbiopsien und den *Nervi surales* von amputierten Gliedmaßen von CRPS Typ I Patienten eine Reduktion von Nervenfasern nachgewiesen werden [51]. Dabei handelte es sich vor allem um eine selektive Degeneration kleiner unmyelinisierter Fasern. Somit können auch bei CRPS Typ I Patienten, bei denen definitionsgemäß keine Nervenverletzung vorliegt, mikroskopische Nervenläsionen auftreten. In der QST weisen CRPS-Patienten allerdings erst im chronischen Stadium typische Small-Fiber Pathologiemuster (erhöhte mechanische und thermische Schwellenwerte) auf [52]. Die Degeneration ist daher vermutlich nicht ursächlich für die Krankheitsentstehung, sondern entwickelt sich erst im Krankheitsverlauf.

Die Entstehung des neuropathischen Schmerzes wird auf eine Funktionsbeeinträchtigung überlebender Nervenfasern zurückgeführt, die durch ihre räumliche Nähe oder ihre synaptische Verbindung mit degenerierenden Fasern hervorgerufen wird [51]. Des Weiteren konnten in der Histologie der Haut neben einer Abnahme der Nervenfasernzahl auch eine Denervierung von Gefäßen, Haarbälgen und Schweißdrüsen festgestellt werden. Die dadurch entstehende autonome Dysregulation trägt zur Entstehung von Symptomen wie Ödem, Hyperhidrose, Temperatur- und Farbasymmetrie bei [51].

1.1.5.4 Das sympathische Nervensystem beim CRPS

Die oben beschriebene Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte ist mit einer aberranten sympathischen Innervation verbunden, die zu einem Verlust von Vasokonstriktionsreflexen und zu endothelialer Dysfunktion führt, die wiederum beim warmen Verlaufstyp die lokale Hyperämie und die Ödembildung mitbedingen. [53] Immunhistochemische Untersuchungen von Hautbiopsien erkrankter Extremitäten konnte eine unveränderte Expression von α 1-Adrenorezeptoren auf den dermalen Gefäßen und Schweißdrüsen von CRPS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen nachweisen [54]. Dennoch zeigten die Gefäße der erkrankten Extremität im Vergleich mit den gesunden Probanden eine verstärkte Vasokonstriktion bei Katecholamin-Applikation, was auf eine Hypersensitivität der α 1-Adrenorezeptoren unabhängig von der Expressionsdichte hinweist [55]. Dadurch könnten die verstärkte kutane Vasokonstriktion und die sich daraus ergebende bläulich-livide Hautfarbe beim kalten Verlaufstyp erklärt werden, obwohl die lokalen Noradrenalin Spiegel normal bis reduziert waren [53].

Die intraepidermalen Nervenfasern und Keratinozyten von Hautbiopsien erkrankter Extremitäten wiesen im Vergleich mit gesunden Kontrollen eine erhöhte Expression von α 1-Adrenorezeptoren auf [54]. Durch eine intradermale Injektion des Adrenorezeptor-Agonisten Phenylephrin konnte bei Patienten, die eine solche Vermehrung der neuronalen Adrenorezeptoren aufwiesen, eine Hyperalgesie in der betroffenen Extremität ausgelöst werden [56]. Ob die Aktivierung der Adrenorezeptoren unmittelbar zu einer Sensibilisierung der Nozizeptoren führt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Alternativ wird auch über eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Neuropeptide nach der Rezeptoraktivierung diskutiert [53].

1.1.5.5 Zentrale Prozesse und Neuroplastizität

Die komplexen Muster der autonomen Symptomatik sowie motorische und sensorische Befunde verweisen außerdem auf eine zentrale Funktionsstörung beim CRPS. Viele Patienten weisen Paresen auf, die sich nicht ausreichend durch Ödeme oder Kontrakturen erklären lassen [15]. Zu den diskutierten zugrundeliegenden Mechanismen gehören klassische Lernprozesse und neuronale Plastizität.

Es ist nachvollziehbar, dass schmerzverursachende und -verstärkende Bewegungen von den Patienten immer stärker eingeschränkt werden, da eine solches Verhalten durch

Schmerzreduktion belohnt und verstärkt wird [57]. In der Magnetenzephalographie konnte eine Verkleinerung des repräsentativen Feldes der betroffenen Gliedmaße im primär sensorischen Kortex nachgewiesen werden [58]. Das Ausmaß dieser Reorganisation korrelierte mit der Ausprägung der Schmerzsymptomatik und wies eine Reversibilität bei Schmerzreduktion auf [58]. Außerdem liefert sie eine mögliche Erklärung für Störungen bei der Größenwahrnehmung betroffener Extremitäten, aber auch für motorische Defizite.

Bei chronischen Verläufen kann man eine Atrophie der grauen Substanz im Bereich des ventromedialen präfrontalen Kortex, der vorderen Insel und des *Nucleus accumbens* feststellen, wobei diese Hirnareale an der Schmerzregulation, der sympathischen Efferenz und der Emotionalität beteiligt sind [59].

1.1.5.6 Familiäre Prädisposition

Wie bei vielen anderen Erkrankungen gibt es auch beim CRPS Hinweise auf genetische Faktoren bei der Krankheitsentstehung. So wurden bereits mehrere Fälle von familiär gehäuften Erkrankungen beschrieben [60, 61]. Die Patienten zeichneten sich durch einen frühen Krankheitsbeginn und eine stärkere Ausbildung der Symptomatik aus und neigten zu Rezidiven und einer Ausbreitung der Symptomatik. Außerdem bestand eine verstärkte Koinzidenz mit Migräne und Dystonie [60, 61].

Bei Patienten mit einer begleitenden Dystonie-Symptomatik konnten darüber hinaus auch Assoziationen zu den humanen Leukozytenantigenen (HLA) HLA-DR 13, HLA-B62, HLA-DQ8 nachgewiesen werden [62, 63]. Solche Verknüpfungen kommen auch bei verschiedenen autoinflammatorischen Erkrankungen mit genetischer Komponente vor, wie Multipler Sklerose und Zöliakie.

1.1.5.7 Psychische Aspekte

Eine Metaanalyse von Beerhuitzen et al. konnte einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von traumatischen Lebensereignissen und der Entwicklung eines CRPS nachweisen [64]. Entsprechend wiesen CRPS-Patienten in einer späteren Studie eine erhöhte Prävalenz für eine posttraumatische Belastungsstörung von 38 % auf [65]. Die oben genannte Metaanalyse untersuchte 11 weitere psychische Faktoren, wie unter anderem De-

pression und Ängstlichkeit, von denen keiner als signifikanter Prädiktor für die Entwicklung eines CRPS identifiziert werden konnte [64]. Dies erlaubt allerdings nur Aussagen hinsichtlich der untersuchten Faktoren, während ein genereller Ausschluss psychischer Faktoren nicht zulässig ist. So wurde später eine Assoziation zwischen CRPS und Alexithymie beschrieben [66]. Dabei handelt es sich um eine eingeschränkte Fähigkeit zur Identifizierung und Beschreibung von Gefühlen, sodass diese Patienten zu einer Fehlinterpretation von emotionalen Regungen als körperlicher Symptome neigen.

Der Einfluss von psychischen Symptomen und dabei vor allem von Ängstlichkeit auf die Prognose ist im Unterschied dazu relativ gut gesichert [67]. Ängstliche Patienten neigen hinsichtlich ihrer Symptome zu Hypervigilanz und Katastrophisierung, was zu einem Schmerzvermeidungsverhalten und einer Immobilisation der erkrankten Extremität führt, wodurch wiederum atrophische Prozesse begünstigt werden. Ähnlich wie bei anderen chronischen Schmerzerkrankungen können Depressionen und ein sekundärer Krankheitsgewinn zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung der Erkrankung beitragen.

1.1.6 Therapie des CRPS

Angesichts der interindividuell sehr unterschiedlichen klinischen Präsentation des Syndroms und der unzureichend verstandenen Pathophysiologie ist es nachvollziehbar, dass die Behandlung des CRPS eine therapeutische Herausforderung darstellt. Von besonderer Bedeutung für den Erfolg ist eine möglichst frühzeitige Zuführung des Patienten zu einer multimodalen Therapie [10]. Physiotherapie und Ergotherapie bilden die Ecksteine der Behandlung eines jeden Patienten, wodurch sich Verbesserungen von Koordination, Beweglichkeit, Schmerz und Ödem der betroffenen Extremität erzielen lassen [68]. Eine wichtige Therapieform, die in diesem Rahmen durchgeführt wird, ist die „Exposure in vivo“. Ein Psychotherapeut identifiziert angstauslösende Trigger, wie z. B. schmerzbezogene Ängste, Schmerzauslösung bei bestimmten Bewegungen und Situationen, die entsprechend ihrer Hierarchie therapiert und parallel durch einen Physiotherapeuten exponiert werden. Dabei werden die Patienten ermutigt, sich sogar bis über die Schmerzgrenze zu belasten, wodurch die Effektivität der Behandlung gesteigert werden kann [69]. Einen weiteren wichtigen Pfeiler bildet die Spiegeltherapie. Der Patient betrachtet das Spiegelbild seiner gesunden Extremität, während die erkrankte Extremität durch den Spiegel verdeckt ist. Die gesunde Gliedmaße wird Berührungsreizen ausgesetzt und bewegt, was

nach einiger Zeit vom Gehirn als Afferenz aus der erkrankten Seite interpretiert wird [70]. Beide Therapien sollen das Zusammenspiel von Motorik und Sensorik verbessern, die Angst vor dem Gebrauch der Extremität mindern und können nach Einweisung des Patienten auch selbstständig durchgeführt werden.

Diese Maßnahmen werden ergänzt durch den Einsatz von Pharmakotherapie. Die AWMF-Leitlinie bietet keine standardisierten Anweisungen für die Medikation, sodass vor allem versucht wird, eine funktionelle Besserung der Beschwerden des Patienten zu erreichen [10]. Da beim CRPS eine gesteigerte entzündliche Aktivität vorliegt, ist die Verwendung einer antiinflammatorischen Medikation naheliegend. Der positive Effekt von Kortikosteroiden wurde durch klinische Studien belegt [71]. Dabei empfiehlt sich eine kurze hochdosierte Stoßtherapie im frühen Stadium der Erkrankung mit einer anschließenden Dosisreduktion zur Vermeidung von Nebenwirkungen. Bei Inflammation entstehen verstärkt freie Radikale, die durch oxidativen Stress zu einer weiteren Schädigung des Gewebes führen können, weshalb auch Radikalfänger wie N-Acetylcystein und Dimethylsulfoxid eingesetzt werden können [10].

Als wirksame Schmerzmedikamente wurden bei CRPS durch Studien bisher nur orales Gabapentin und intravenöses Ketamin untersucht [10, 72, 73]. Wegen der neuropathischen Komponente der Schmerzen bei CRPS werden auch verschiedene Medikamente der neuropathischen Schmerztherapie eingesetzt [10, 74].

Bisphosphonate sind Medikamente, die dem Knochenabbau entgegenwirken und bei Krankheiten mit pathologischem Knochenmetabolismus eine koanalgetische Wirkung entfalten können. Diverse Studien konnten eine signifikante Schmerzreduktion bei CRPS-Patienten belegen und zwar besonders bei Nachweis von erhöhtem Knochenumsatz in der Drei-Phasen-Szintigraphie [10, 75].

Bei einem Therapieversagen oder einer unzureichenden Kontrolle der Symptomatik können auch interventionelle Therapiemaßnahmen in Betracht gezogen werden. Die schon lange verwendeten lokalen Sympathikusblockaden werden mittlerweile nur noch als Einzelfallentscheidung und nur nach erfolgreicher Testinjektion durchgeführt [76]. Stattdessen bietet die Spinalganglienstimulation eine gut belegte Alternative, durch die bei einem großen Anteil der Patienten für längere Zeit eine signifikante Schmerzlinderung erreicht werden kann [77]. Dabei werden dem Patienten mehrere Elektrodenkabel epidural im-

plantiert, welche das Rückenmark mit elektrischen Impulsen niedriger Intensität stimulieren. Diese Stimulation überlagert dann die Übertragung von pathologischen Schmerzsignalen an das Gehirn. Die Implantation ist ein komplexer Eingriff, weshalb dieses Verfahren nur an spezialisierten Zentren durchgeführt werden kann. Bei Patienten mit stärksten Schmerzen, einem weitgehenden Funktionsverlust und rezidivierenden Infektionen der erkrankten Gliedmaße wurden nach der Ausschöpfung der alternativen Behandlungsmöglichkeiten auch Amputationen durchgeführt. Diese Option ist allerdings wegen der hohen Inzidenzen von Rezidiven und Phantomschmerzen sehr umstritten [78].

Bei der multimodalen Therapie werden auch psychische Faktoren berücksichtigt. Psychologische Interventionen sind vor allem bei Patienten mit begleitenden psychischen Komorbiditäten von besonderer Bedeutung [10, 79]. Schmerzvermeidendes Verhalten und eine gesteigerte Aufmerksamkeit hinsichtlich der betroffenen Extremität führen zu Bewegungseinschränkungen und behindern dadurch auch die intensive Teilnahme an der Physiotherapie [67]. Deshalb sollte den Patienten früh ein Zugang zu psychotherapeutischen Maßnahmen ermöglicht werden, um solche dysfunktionalen Mechanismen zu vermeiden. Den Patienten sollen Techniken vermittelt werden, die ihnen dabei helfen können, den Schmerz im alltäglichen Leben eigenständig zu bewältigen. Dazu gehören unter anderem Biofeedback und die progressive Muskelrelaxation nach Jakobsen [10].

1.2 microRNAs

microRNAs (miRNAs) sind kurze (20-23 Nukleotide (nt)), endogene, einsträngige und nicht-kodierende RNAs, die an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt sind. Lee et al. beschrieben diese Eigenschaften erstmals 1993 für die *lin-4* RNA in *C. elegans* [80]. Im Jahr 2000 wurde mit *let-7* die zweite regulatorische RNA beschrieben, wobei *let-7* auch im Menschen und mehreren anderen Spezies nachgewiesen werden konnte [81]. Dies wurde als ein Hinweis darauf verstanden, dass die Klasse der kleinen regulatorischen RNAs ein konserviertes Prinzip der Genexpressionskontrolle darstellt. Im darauffolgenden Jahr wurden immer mehr Angehörige dieser Klasse entdeckt, sodass der Begriff „miRNAs“ eingeführt wurde [82].

Seitdem wurden miRNAs intensiv erforscht und wegen ihres regulatorischen Einflusses auf die Genexpression als wichtiger epigenetischer Faktor bei einer Vielzahl von physio-

logischen und pathophysiologischen Prozessen etabliert. Durch Klonierungs- und Sequenzierungsstudien wurden mittlerweile Tausende weitere miRNAs im Menschen, in Tieren, Pflanzen und Viren gefunden, wobei sich die reifen humanen miRNAs momentan auf über 2600 Exemplare belaufen (<http://www.mirbase.org/>; Stand: 10.08.2021).

1.2.1 Biogenese der miRNAs

Die Gene der miRNAs befinden sich in nichtkodierenden und kodierenden Abschnitten, wobei sie im letzteren Fall vor allem in den Introns liegen. Die Transkription erfolgt durch die RNA-Polymerase II, wodurch die Pri-miRNA erzeugt wird, die sich teilweise zu einer imperfekten Haarnadelstruktur zusammenlagert. Noch im Zellkern wird die Schleife durch den Mikroprozessionskomplex, der aus der RNase III Drosha und DCR8 besteht, in eine pre-miRNA umgewandelt. Das nukleäre Exportprotein Exportin-5 erkennt die Struktur der pre-miRNA und vermittelt ihren Transport ins Zytosol. Dort erfolgt der zweite Prozessierungsschritt durch die RNase III Dicer, der durch das dsRNA-Bindungsprotein TRBP unterstützt wird. Das dadurch entstehende Produkt ist eine doppelsträngige RNA, die aus zwei reifen miRNA Strängen besteht. Um ihre regulatorische Funktion ausüben zu können, muss die miRNA zusammen mit Argonaute (AGO)-Proteinen den sogenannten RNA-induced Silencing Complex (RISC) bilden. In dem reifen RISC wird jedoch nur einer der beiden Stränge aufgeladen. Der andere Strang wird bei der Formation des RISCs durch sterische Kräfte abgespalten und meist schnell abgebaut. Für den Einbau wird dabei bevorzugt der Strang mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende gewählt. Dieses Ende wird vom katalytischen Zentrum des AGO-Proteins erkannt und fest verankert. Der Auswahlmechanismus ist allerdings nicht absolut streng [83]. Abhängig vom Gewebe, vom Entwicklungsstadium und der jeweiligen miRNA wird auch der thermodynamisch stabilere Strang eingebaut. Da somit die Ermittlung des öfter verwendeten Strangs nicht ohne weiteres möglich ist, werden die miRNAs in der Nomenklatur mittlerweile nach ihrer Abstammung vom 5'- oder 3'-Arm der Haarnadelvorstufe mit -5p und -3p bezeichnet [84].

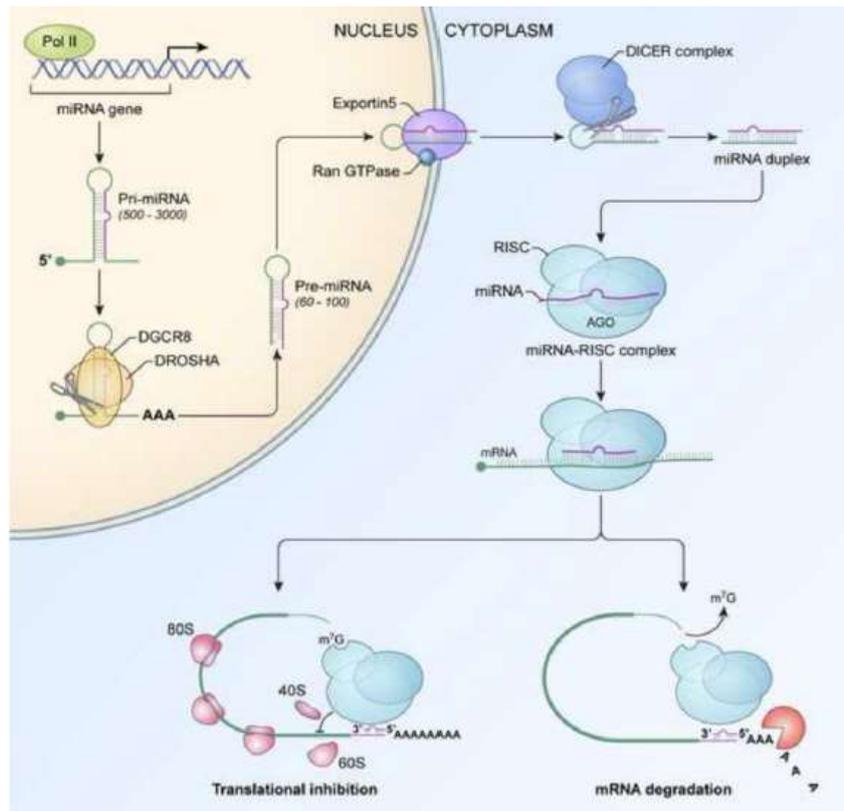


Abbildung 1: Biogenese und Funktion von miRNAs [85].

1.2.2 Targeting von miRNAs

miRNAs erkennen ihre zu regulierenden mRNA-Ziele durch eine Anlagerung mittels komplementärer Basenpaarung am 3'-nichttranslatierten Ende. Die Komplementarität ist dabei allerdings nicht immer perfekt, was ein Problem bei der Entwicklung von Algorithmen zur Bestimmung möglicher miRNA Ziele darstellte. Allerdings besitzen miRNAs einen Abschnitt am 5'-Ende mit obligat perfekter Basenpaarung. Diese sogenannte Seed-Region mit einer Länge von 6-8 nt trägt stark zur Spezifität bei. Darauf basierend wurden mittlerweile mehrere computergestützte Verfahren zur Zielvorhersage entwickelt, die zusätzlich weitere Aspekte einbeziehen, wie Lage und Anzahl der Bindungsstellen auf der mRNA, Strenge der Seed-Paarung, thermodynamische Einflüsse und die erwartete Gesamtbindungsstärke [86]. Im Rahmen von Genomanalysen wurde ein regulatorischer Einfluss der miRNAs auf mehr als 60% der menschlichen proteinkodierenden Gene angenommen [87].

1.2.3 Funktionsmechanismen von miRNAs

miRNAs regulieren die Genexpression durch zwei unterschiedliche Mechanismen, nämlich die Hemmung der Translation der mRNA und die Beschleunigung ihres Abbaus. Der größte Anteil ihrer Wirkung bezieht sich auf den Abbau der mRNA. Welcher der beiden Vorgänge abläuft, hängt vom Ausmaß der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA ab. Bei perfekter Basenpaarung kommt es zu einer Degradierung und bei partieller Komplementarität zur Translationshemmung [88]. Nach der Bindung des RISCs am 3'-Ende der mRNA wird der Abbau durch die 5'-3'-Exoribonuklease-Aktivität des AGO-Proteins 2 vermittelt. Der RISC wird dabei von Enzymen unterstützt, die auch an miRNA-unabhängigen mRNA-Degradierung beteiligt sind. Die Mechanismen zur Hemmung der Translation hat man bisher weniger gut verstanden, da sie in den Experimenten nur schwer von der Degradierung getrennt werden können. Es wird jedoch von einer Inhibition der Initiation der Translation durch eine Hemmung der dafür essentiellen RNA-Helicasen ausgegangen [88].

Die regulatorischen Vorgänge finden in der Zelle nicht gleichmäßig verteilt statt, sondern konzentrieren sich auf sogenannte P-Bodies. In diesen lichtmikroskopisch sichtbaren zytoplasmatischen Foci liegen die an der Degradation beteiligten Enzyme konzentriert vor. Außerdem bilden sie Lagerstellen für gehemmte mRNAs bis zur späteren Translation [89]. Obwohl sich der Großteil der miRNA Forschung vor allem mit deren supprimierender Funktion beschäftigt, wurde alternativ für einzelne miRNAs auch ein stimulierender Einfluss auf die Genexpression diskutiert [90].

1.2.4 Zirkulierende extrazelluläre miRNAs

Nach ihrer Biosynthese verbleiben nicht alle miRNAs in der Zelle. Ein Teil wird anschließend ins extrazelluläre Milieu freigesetzt. Danach können sie in unterschiedlichen biologischen Medien nachgewiesen werden, wie beispielsweise Blut, Liquor, Urin, Speichel und Muttermilch. Die miRNAs sind dort weiterhin funktionell und können regulierend aktiv werden [91, 92].

Es gibt mehrere Prozesse, die den Export von miRNAs aus dem Zellinneren und die anschließende Stabilisierung ermöglichen. Ohne Stabilisierung würden sie sehr schnell von den ubiquitären RNasen erfasst und degradiert werden. Daher müssen die miRNAs im

extrazellulären Milieu von deren Einfluss abgeschirmt werden. Alle Arten von extrazellulären Vesikeln wurden bereits als Vehikel für den extrazellulären Transport von miRNAs beschrieben. Da Exosomen auch in dieser Arbeit untersucht wurden, werden sie später noch genauer behandelt. Mikrovesikel sind extrazelluläre Vesikel mit einem Durchmesser von 100 bis 1000 nm, die durch Ausknospung und Abschnürung aus der Zellmembran entstehen. Sie tragen auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Antigene, deren Zusammensetzung der Ursprungszelle entspricht. In ihrem Inneren transportieren sie eine Vielzahl von funktionellen Proteinen, mRNAs und miRNAs. Mikrovesikel können durch Membranverschmelzung von Zellen aufgenommen werden, wodurch dann ihr Inhalt freigesetzt wird [93]. Unter Apoptose-Bedingungen setzen Zellen Mikrovesikel mit größerem Durchmesser frei, die als Apoptose-Körper bezeichnet werden. Sie enthalten spezifische miRNA Profile, die an die überlebenden Zellen weitergegeben werden [94]. Alternativ können miRNAs auch durch HDL (high-density lipoprotein) und LDL (low-density lipoprotein) zirkulieren. Bei diesen Lipoproteinen handelt es sich um nicht-kovalente Aggregate, die aus einer Einfachschicht von Phospholipiden und Apolipoproteinen bestehen, die sich mizellenartig um einen unpolaren Kern aus Triglyceriden und Cholesterinestern anordnet. Durch Interaktion mit HDL- oder LDL-Rezeptoren können sie mitgeführte miRNAs gezielt an Empfängerzellen abgeben [95].

Der Großteil der zirkulierenden miRNAs liegt allerdings nicht vesikel-gebunden im Plasma vor [96, 97]. Um dem Abbau durch RNasen zu entgehen, bilden extrazelluläre miRNAs Komplexe mit RNA-bindenden Proteinen. Den größten Anteil bildet dabei das AGO-Protein 2, dessen Komplexe mit miRNAs relativ nuklease- und proteasestabil sind [96, 98]. Da es sich dabei um einen Teil des RISC handelt, können die gebundenen miRNAs weiterhin regulatorisch wirksam sein. Eine untergeordnete Rolle spielen außerdem das AGO-Protein 1 und Nucleophosmin [96, 97]. Der Exportmechanismus der miRNA-Protein-Komplexe ist noch nicht genau bekannt, aber es wird vermutet, dass ein großer Teil im Verlauf von Apoptose-Prozessen freigesetzt wird [96].

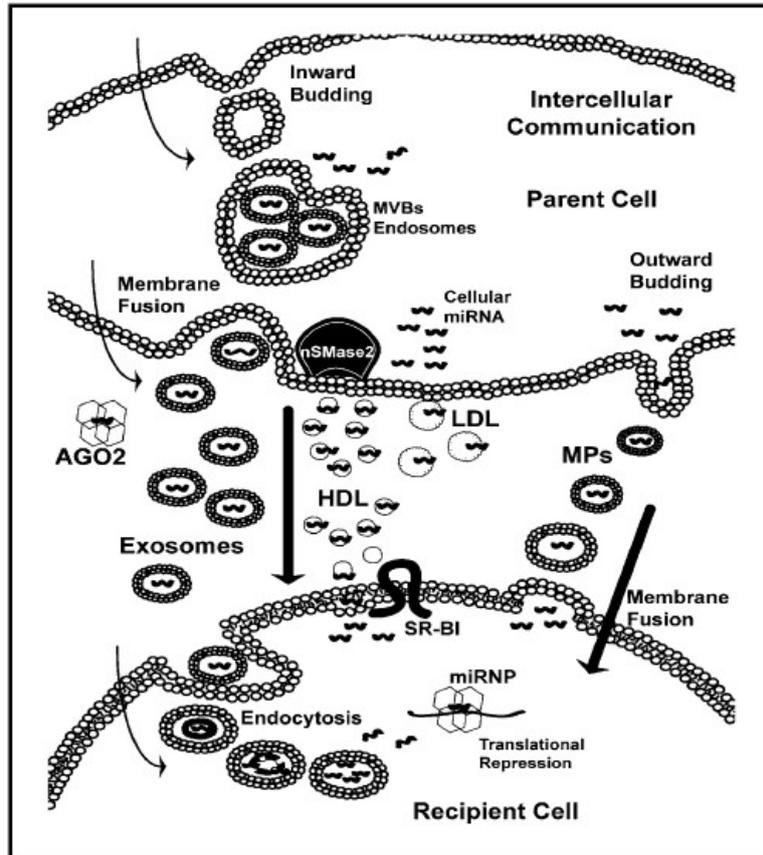


Abbildung 2: Freisetzung von miRNAs in den Extrazellulärraum [99].

1.2.5 Exosomen

Exosomen wurden erstmals 1981 als kleine Mikrovesikel mit 5'-Nukleaseaktivität beschrieben, die von neoplastischen Zelllinien freigesetzt wurden [100]. Als Johnstone et al. 1987 den Begriff „Exosom“ prägten, wurden sie zunächst als Abfallprodukte im Rahmen der Abstoßung überschüssiger Plasmamembranbestandteile interpretiert [101]. Später erkannte man jedoch ihre Funktion im Rahmen interzellulärer Kommunikation [91]. Exosomen sind extrazelluläre Vesikel mit einem Durchmesser von etwa 40-100 nm, die durch Endozytose gebildet werden. Durch Invagination der Membran entstehen innerhalb des ursprünglichen Endosoms mehrere kleinere Vesikel, weshalb es auch als multivesikulärer Körper (MVB) bezeichnet wird. Durch eine Membranverschmelzung des MVB mit der Plasmamembran werden die intraluminalen Vesikel in den Extrazellulärraum freigesetzt und gelten dann als Exosomen. Dieser Prozess findet größtenteils konstitutiv statt. Manche Zelltypen, wie beispielsweise hämatopoetische Stammzellen, T-Zellen und Mastzellen, können Exosomen abhängig von Calcium auch als Antwort auf Umweltreize

freisetzen [91]. Die Membranen von Exosomen verfügen über ein charakteristisches Profil von Proteinen und Lipiden, das sich mitunter stark von der Zusammensetzung der Ursprungszelle unterscheidet. Hinsichtlich ihres Entstehungsmechanismus enthalten sie ausschließlich Proteine aus der Plasmamembran und endozytotischen Kompartimenten. Ihr jeweiliges Oberflächenprofil fungiert als eine Adressierung für die Aufnahme in spezifische Zielzellen [91].

Bei der Beladung der Exosomen mit miRNAs konnten mehrere Regulationsmechanismen nachgewiesen werden [102]. Einige miRNAs weisen Exportmotive am 3'-Ende auf, die zu einem verstärkten Transport in Exosomen führen [102, 103]. Diverse intrazelluläre und RNA bindende Proteine bewirken einen verstärkten Transport in Exosomen [102]. Dazu gehört auch das RISC-Protein ARGO 2, wenn es nicht phosphoryliert vorliegt [104]. Außerdem konnte man zeigen, dass mehrere an der Biogenese der Exosomen beteiligte Membranproteine zu einer vermehrten Anreicherung selektiver miRNAs in den Vesikeln führen [102]. Diese Sortierungs- und Beladungsmechanismen sind energieabhängige Prozesse, die zu erheblichen Unterschieden zwischen den miRNA-Spektren der Exosomen und der Ursprungszellen führen [97].

1.2.6 miRNAs in der Medizin

Als Vermittler epigenetischer Effekte sind miRNAs sehr interessant für viele Bereiche der Medizin, wie Onkogenese, Immunologie sowie Entwicklungs- und Degenerationsprozesse. Durch ihren pleiotropen Wirkungsmechanismus greifen sie parallel in mehrere molekulare Signaltransduktionswege ein. Obwohl sie erst seit relativ kurzer Zeit bekannt sind, wird ihre Beteiligung an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen angenommen.

Neben der Beantwortung von pathophysiologischen Fragestellungen, gibt es auch Bestrebungen miRNAs diagnostisch und therapeutisch einzusetzen. Zirkulierende miRNAs werden als potenzielle Biomarker für unterschiedliche Krankheiten diskutiert, wodurch sie zu einem Hilfsmittel bei der Diagnosestellung und Therapieentscheidungen werden könnten [105]. Ihr Vorhandensein in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten (z. B. Blut, Urin und Speichel) erlaubt eine hierfür günstige und nicht-invasive Probengewinnung.

Als therapeutischer Ansatz wird versucht, durch die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden in die Regulationsmechanismen der miRNAs einzugreifen [106]. Diese

Oligonukleotide ahmen entweder die Funktion natürlich vorkommender miRNAs nach (mimics) oder enthalten Antisense-Sequenzen, durch die spezifische miRNAs gebunden und funktionell supprimiert werden können (antagomiRs). Eine antagomiR von miR-122 war das erste am Menschen getestete und auf miRNA basierende Therapeutikum [107]. miR-122 bindet in der Leber an zwei Bindungsstellen des HCV-Genoms und bildet einen oligomären Komplex, durch den das Genom vor Degradierung und Immunreaktionen geschützt wird. Die miR-122-antagomiR bindet die miRNA mit hoher Affinität und verhindert dadurch die Komplexbildung. Durch subkutane Applikation konnte eine von der Dosis abhängige Reduktion der HCV-Viruslast erreicht werden [107]. Ein liposomal gebundenes miR-34a-mimic wurde in einer Phase I Multicenter-Studie mit 99 Patienten zur Behandlung verschiedener fortgeschrittener solider Tumorentitäten getestet [108]. miR-34a ist eine Tumorsuppressor-miRNA, die mehr als 30 verschiedene Onkogene reguliert und in neoplastischen Geweben oft herunterreguliert oder deletiert wird. Beim Abschluss der Studie konnten bei drei Patienten ein anhaltendes partielles Ansprechen und bei 14 Patienten ein stabiler Krankheitsverlauf bei einer zweimal wöchentlichen intravenösen Gabe des miR-34a-mimics erzielt werden. Die Studie wurde jedoch wegen verstärkter immunvermittelter Nebenwirkungen abgebrochen [106].

1.2.7 miRNAs bei chronischem Schmerz

Die erste Untersuchung von miRNAs in einem Schmerzmodell erfolgte 2007 durch Bai et al. [109]. Sie beschrieben die Herabregulation von miR-10a, miR-29a, miR-98, miR-99a, miR-124, miR-134 und miR-183 im Trigeminalganglion bei inflammatorischem Muskelschmerz. Die Relevanz von reifen miRNAs bei inflammatorischem Schmerz konnte durch die Erzeugung einer Dicer-knockout Maus bestätigt werden [110]. Die Maus wies eine verminderte Schmerzsensibilisierung durch inflammatorische Mediatoren auf, während Berührungs- und akutes Schmerzempfinden unbeeinflusst blieben. In mehreren Modellen für neuropathischen Schmerz konnte eine miRNA-Dysregulation auf unterschiedlichen Ebenen des sensorischen Nervensystems (Nerv, DRG, Rückenmark) nachgewiesen werden [111]. Die Dysregulation einzelner miRNAs, wie miR-1a-3p und miR-206, war dabei abhängig von der Art der Nervenschädigung (Axotomie, Konstriktion, Crush), was auf eine Spezifität hinsichtlich des auslösenden Stimulus hinwies [111, 112]. Obwohl sowohl inflammatorischer als auch neuropathischer Schmerz chronische

Vorläufe annehmen können und sich sogar einige molekulare Mechanismen teilen, konnte man bemerkenswert häufig unterschiedliche miRNA-Profile beobachten [112]. miR-16 und -143 waren etwa bei inflammatorischem Schmerz herabreguliert, blieben aber bei Nervenschädigung unverändert [112]. Außerdem fanden sich bei neuropathischem Schmerz miR-21 herauf- und miR-7a herabreguliert, während sie bei Inflammation keine Veränderungen zeigten. Die schnellere Veränderung des miRNA-Spektrums als eine Reaktion auf inflammatorischen Schmerz wurde von Andersen et al. im Sinne eines adaptiven Mechanismus mit dem Ziel der Schmerzreduktion interpretiert [113]. Hingegen wurde bei neuropathischem Schmerz eher ein aggravierender Effekt vermutet [113].

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass einige extrazelluläre miRNAs durch Interaktion mit Toll-like Rezeptoren (TLR) eine Exzitation von Dorsalwurzelneuronen bewirken können, sodass sie die Fähigkeit haben, direkt eine Nozizeption auszulösen [114].

1.2.8 miRNAs bei CRPS

Wegen der ungeklärten und multifaktoriellen Pathophysiologie des CRPS gab es auch hier bereits Bestrebungen, eine potenzielle Beteiligung von miRNAs zu zeigen. Die erste Studie in diesem Zusammenhang war 2011 eine Micro-Array-Analyse von Orlova et al. Sie untersuchten Vollblutproben von CRPS-Patienten und gesunden Kontrollen und fanden 18 unterschiedlich regulierte miRNAs. Sie ermöglichten in einem weiteren Schritt eine Stratifizierung der Patientenkohorte, bei der 60 % der Patienten zu einer Subgruppe zusammengefasst wurden. Bei dieser Gruppe zeigten sich in der weiteren Auswertung neue und zuvor nicht vorhandene Korrelationen mit der klinischen Symptomatik und den Messwerten entzündlicher Mediatoren [115]. McDonald et al. untersuchten miRNAs in Exosomen aus dem Serum von CRPS-Patienten. Mehrere der zuvor von Orlova et al. beschriebenen miRNAs wurden erneut dysreguliert vorgefunden, allerdings mit umgekehrtem Trend. So waren die im Vollblut herabregulierten miRNAs in den Exosomen hochreguliert, was als Hinweis auf einen protektiven Effekt der Exosomen verstanden wurde. Durch die Übermittlung erhöhter Mengen regulierender miRNAs könnten sie einen modulierenden Einfluss auf die Expression inflammatorischer Mediatoren ausüben [116].

Besonders eingehend wurde in diesem Zusammenhang miR-939 untersucht, das mRNAs mehrerer proinflammatorischer Zytokine reguliert und durch Interaktion mit NF κ B an einem Knotenpunkt der Entzündungskaskade angreift. Während mir-939 im Vollblut von CRPS-Patienten herabreguliert war, konnte eine verstärkte Anreicherung in ihren Exosomen nachgewiesen werden. In einem *in vitro* Experiment wiesen die Empfängerzellen nach der Aufnahme von mit mir-939 beladenen Exosomen einen deutlich reduzierten Inflammationszustand auf [117].

miR-548-5p und miR-34a konnten als wichtige Prädiktoren für die Effektivität der Behandlung mit Ketamin identifiziert werden. Ein erhöhtes miR-548-5p führte zu einer verminderten Glucuronidierung und einer daraus resultierenden Hemmung des Ketaminabbaus [118]. Bei Patienten mit einer schlechten Wirksamkeit der Therapie konnten eine Herabregulation von miR-34a und ein niedrigerer durchschnittlicher BMI nachgewiesen werden [119]. Letzteres wurde auf eine Überexpression des Corticoid-releasing Hormone Rezeptors 1 zurückgeführt, der zu einer schnelleren Sättigung führt. Der zugrundeliegende die Effektivität der Ketamintherapie beeinflussende Mechanismus konnte jedoch wiederum nicht ermittelt werden.

In ähnlicher Weise wurde für exosomales miR-338-5p als einem direkten Regulator von IL-6 eine Assoziation hinsichtlich der Effektivität einer therapeutischen Plasmapherese beschrieben. Dabei war eine vermehrte Expression von miR-338-5p in Exosomen mit einem erhöhten IL-6-Plasmaspiegel verbunden. Das proinflammatorische IL-6 kann durch die Plasmapherese aus der Zirkulation entfernt werden, wodurch dann die Inflammation reduziert wird [120].

1.2.9 Auswahl der miRNAs

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten miRNAs erfolgte mit einem literaturbasierten Verfahren anhand von pathophysiologischen Überlegungen. Die miRNAs miR-183, -21 und -29b wurden zuvor bereits im Zusammenhang mit Nervenschädigung und Inflammation beschrieben. Außerdem handelt es sich bei diesen miRNAs um bekannte Regulatoren der Permeabilität von Immunbarrieren [121-123]. Ein Integritätsverlust der Blut-Hirn- und Blut-Nerven-Schranke ist im Rahmen neuropathischer und inflammatorischer Schmerzsyndrome häufig zu beobachten [124]. Die miR-183 wurde in diesem Zu-

sammenhang von unserer Arbeitsgruppe zuvor mit neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht [121]. Aufgrund der wachsenden Bedeutung von Exosomen in der Erforschung zirkulierender miRNAs wurden von diesen zusätzlich miR-144-5p und -233-5p untersucht. Diese miRNAs wurden bisher noch nicht so intensiv erforscht, aber beide konnten schon mit Inflammation und Neuropathie assoziiert werden. Auch diese miRNAs regulieren die Permeabilität immunologischer Barrieren [125, 126].

1.2.9.1 miR-183-5p

miR-183 ist eine 22-nt lange miRNA, die sich auf dem Chromosom 7 befindet und als Teil eines Clusters mit miR-182 und mir-96 eingeordnet wird [127]. miR-183 ist physiologisch beteiligt an der Differenzierung neuroektodermaler Gewebe im Rahmen der Embryogenese. Demgegenüber wurde aber auch ihre Bedeutung für unterschiedliche autoimmune, neurologische und maligne Erkrankungen nachgewiesen [127].

miR-183 wurde sowohl bei neuropathischen als auch bei inflammatorischen Schmerzen als herabreguliert beschrieben [109, 128]. Sie kontrolliert die basale mechanische Sensitivitätsschwelle vor allem durch eine Regulation spannungsgesteuerter Calciumkanäle auf A δ -Fasern [129]. Die Herabregulation von miR-183 im Neuropathiemodell führte wiederum zu einer Sensibilisierung der Fasern, sodass leichte Berührungen als schmerzhaft wahrgenommen werden.

Lin et al. konnten durch intrathekale Verabreichung von miR-183 eine Linderung der mechanischen Allodynie mononeuropathischer Ratten erzielen. Dieser Effekt wurde vermittelt durch die Herabregulierung des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.3 und von BDNF [130]. Ein weiteres wichtiges Regulationsziel von miR-183 ist mTOR, dessen Herabregulierung durch eine Hemmung von VEGF eine Verbesserung einer neuropathischen Schmerzsymptomatik bewirken kann [131].

1.2.9.2 miR-21-5p

miR-21 ist eine 22-nt lange miRNA, die in einem Intron auf dem Chromosom 17 codiert wird. Physiologisch spielt sie eine zentrale Rolle bei der Verzweigungsmorphogenese während der Embryonalentwicklung und sie ist auch an der Degradierung mütterlich übertragener mRNAs beteiligt [132]. miR-21 wurde bereits intensiv im Zusammenhang

mit unterschiedlichen pathologischen Zuständen untersucht, wie unter anderem hämatologischen und soliden Neoplasien sowie kardiovaskulären Erkrankungen [133].

Im Zusammenhang mit Schmerzen wurde miR-21 bei peripheren Neuropathien beschrieben. Hier zeigte sich eine erhöhte Expression in Biopsien des *Nervus suralis* von Patienten mit schmerzhaften Neuropathien im Vergleich mit schmerzlosen Neuropathie-Patienten [134]. Außerdem wurde miR-21 in verschiedenen Tiermodellen für neuropathischen Schmerz hochreguliert [135-137]. 2013 erreichten Sakai et al. durch die Administration eines miR-21-Inhibitors eine Reduktion des Schmerzverhaltens von neuropathischen Tieren, was auf eine direkte Beteiligung von miR-21 an der Pathogenese neuropathischer Schmerzen hinweist [136]. Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht bekannt, es wird aber über eine Hemmung von PTEN diskutiert, welches im Rahmen axonaler Regeneration bekannt ist [135, 136]. Außerdem setzten geschädigte periphere Neuronen verstärkt mit miR-21 angereicherte Exosomen frei, die nach der phagozytotischen Aufnahme durch Makrophagen deren Polarisierung in einen proinflammatorischen Phänotyp auslösten [138]. Proinflammatorische Makrophagen infiltrieren bei Nervenschädigung wiederum das DRG und führen so zu einer neuronalen Sensibilisierung.

Diverse Inflammationsmediatoren, wie NF- κ B, IL-6 und Tumor Growth Factor β (TGF- β), fungieren als Transkriptionsfaktoren für miR-21 und führen zu einer Induktion im Rahmen von Entzündungsprozessen. Diese verzögerte Induktion deutet auf eine regulierende Funktion von miR-21 bei Entzündungsreaktionen hin und zwar im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus [139]. Es konnte allerdings in Tumorzellen auch eine entzündungsfördernde Wirkung durch die Induktion von NF- κ B nachgewiesen werden [139].

1.2.9.3 miR-29b-3p

miR-29b ist eine 22-nt lange miRNA, die aus zwei verschiedenen pre-miRNAs entsteht. Pre-miR-29b-1, die sich auf dem Chromosom 7 befindet, und pre-miR-29b-2, die zum Chromosom 1 gehört, verfügen über unterschiedliche nt-Sequenzen und Promoterregionen. Durch Splicen entsteht jedoch eine identische und reife miR-29b [140].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde miR-29b noch nicht in einem direkten Zusammenhang mit chronischen oder neuropathischen Schmerzen beschrieben. Die miRNA wurde vor allem wegen ihrer Assoziation mit Dysruption von Immunbarrieren einbezogen [123].

Yuan et al. fanden jedoch 2020 in den Dorsalwurzelganglien von Ratten, bei denen durch eine Injektion von Freund's Adjuvanz eine mechanische und thermische Hyperalgesie induziert wurde, eine erhöhte Expression von miR-29b [141]. Es wurde vermutet, dass miR-29b zu einer Demethylierung der Promoterregion des Nerve Growth Factor (NGF) und dadurch zu dessen verstärkter Expression führt. Nach einer erneuten Senkung des NGF-Spiegels zeigte sich die Hyperalgesie der Tiere wieder als rückläufig, sodass eine proanalgetische Wirkung von miR-29b angenommen wurde [141].

Obwohl miR-29b noch nicht in einem direkten Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen beschrieben wurde, konnte in verletzten *Nervi ischiadici* von Ratten und in geschädigten *Nervi optici* von Zebrafischen eine erhöhte Expression nachgewiesen werden [142, 143]. Da Zebrafische die Fähigkeit zur Neuroregeneration besitzen, wurde eine Beteiligung von miR-29b am Regenerationsprozess durch eine Regulation der Extrazellulärmatrix und von DNA-modulierenden Genen angenommen. Auch bei Ratten ergab sich im Diabetes-Tiermodell ein Hinweis auf eine neuroprotektive Eigenschaft von miR-29b. Eine Herabregulation im DRG war mit verstärkten Anzeichen diabetischer Neuropathie verbunden, wie axonaler Schwellung und Apoptose. Die Gabe von miR-29b-mimics inhibierte die Degeneration und ermöglichte ein erneutes axonales Wachstum [144].

1.2.9.4 miR-144-5p

miR-144 ist eine 22-nt lange miRNA auf Chromosom 17, die physiologisch eine regulatorische Funktion in der Hämatopoese einnimmt [145]. miR-144 wurde bereits im Rahmen von Tiermodellen als relevant für neuropathischen Schmerz beschrieben. Sowohl im Axotomie- als auch im Nervenkonstriktions-Modell zeigte sich eine signifikante Herunterregulation [146, 147]. Auch bei zentralnervöser Schädigung konnte im Rückenmarks-Ischämie/Reperfusion-Modell eine Herabregulation durch miR-144 nachgewiesen werden [148].

Im Rahmen von Inflammationsreaktionen zeigte miR-144-5p einen hemmenden Effekt. Proinflammatorische Makrophagen wiesen nach einer Applikation von miR-144-5p-mimics eine reduzierte Sekretion von Entzündungsmediatoren sowie eine verminderte Proliferation auf. Es wird angenommen, dass dieser Effekt durch eine Herabregulation

des TLR-2 mit einer sich daraus ergebenden Inhibierung des NK- κ B-Signalwegs vermittelt wird [149]. In ähnlicher Weise führte auch die Transfektion von miR-144-5p-mimics in T-Zellen zu einer reduzierten Produktion von TNF α und Interferon γ [150].

1.2.9.5 miR-223-5p

miR-223 ist eine 21-nt lange miRNA auf dem X-Chromosom, die vor allem durch ihre Funktion bei der Differenzierung der myeloischen Zellreihe in der Hämatopoese bekannt ist [151]. Zu Beginn dieser Arbeit wurde miR-223 noch nicht im Zusammenhang mit inflammatorischen oder neuropathischen Schmerzen beschrieben. Sie wurde aufgenommen, da sie durch ihren antiinflammatorischen, immunmodulatorischen Effekt als ein Regulator von Inflammationsreaktionen galt [151]. miR-223-5p moduliert Entzündungsreaktionen durch einen regulatorischen Einfluss auf diverse Rezeptoren proinflammatorischer Mediatoren, wie unter anderem den TNF α -Rezeptor und den Zelltodrezeptor 6 (DR6) [152]. Als direkter Regulator von TLR-4 sowie mehreren Mitgliedern der NOD-like Rezeptorfamilie übt miR-223-5p auch einen regulierenden Einfluss auf den NF κ B-Signaltransduktionsweg aus [153, 154]. Mit miR-223 beladene Mikrovesikel führten zu einer Differenzierung von Makrophagen in den antiinflammatorischen M2-Phänotyp. Diese Makrophagen stimulierten bei einer Koinkubation mit Schwanzzellen deren Proliferation, Migration und die Sekretion diverser Wachstumsfaktoren [155]. Eine solche Aktivierung der Schwanzzellen konnte häufig im Rahmen peripherer axonaler Regeneration beobachtet werden. Der Prozess war durch die Applikation eines miR-223-Inhibitors *in vitro* und *in vivo* reversibel. Ein direktes Regulationsziel von miR-223-5p ist außerdem Semaphorin 3A (Sema 3A), bei dem es sich um einen zentralen Inhibitor der axonalen Regeneration handelt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung von Sema 3A in verletzten Axonen zu einer deutlich besseren Heilung mit Remyelinisierung und verminderter Apoptose führt [152, 156]. Die Induktion antiinflammatorischer Makrophagen durch miR-223-5p spielt auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung. Durch Hyaluronsäure-Nanopartikel erfolgte eine lokale Applikation von miR-223-5p in Hautwunden von Mäusen, wodurch eine schnellere Neubildung von gleichmäßig vaskularisierter Haut erzielt wurde [157]. In der Histologie wies die neugebildete Haut eine erhöhte Konzentration von M2-Markerproteinen auf.

1.3 Fragestellung

CRPS ist eine Erkrankung, deren Diagnose auf klinischer Untersuchung und anamnestischen Angaben der Patienten beruht. miRNAs führen zu einer Dysregulation bei einer Vielzahl von pathologischen Zuständen und werden sogar als potenzielle Biomarker diskutiert. Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch beim CRPS eine aberrante Expression zirkulierender mit Schmerz assoziierter miRNAs im Blut auftritt. Dazu wurden die Expressionsniveaus von miR-183, -21 und -29b in Plasma, Leukozyten und Exosomen und von miR-144 und -223 in Exosomen gemessen. Blut wurde als Untersuchungsmaterial gewählt, da es bereits seit längerer Zeit als Probengut im klinischen Alltag fest etabliert ist und mit relativ geringer Invasivität gewonnen werden kann. Es erfolgte ein Vergleich von CRPS-Patienten mit Patienten mit vorangegangener Fraktur beziehungsweise Operation, die kein CRPS entwickelt hatten (Frakturkontrollen), und Kontrollen ohne vorangegangenes Trauma. Bisher erfolgte in der Literatur nur der Vergleich von CRPS-Patienten mit gesunden Kontrollen, sodass die Gegenüberstellung mit einem regelhaften Heilungsverlauf durch Frakturkontrollen (FK) einen neuartigen Ansatz darstellt. Dabei sollen letztlich die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es signifikante Unterschiede in der Expression der miRNAs zwischen CRPS- und Kontrollgruppen, die eine Unterscheidung zwischen den Gruppen erlauben?
2. Unterscheidet sich die Expression der zirkulierenden miRNAs zwischen den untersuchten Blutkomponenten?
3. Zeigen sich Korrelationen zwischen der miRNA-Expression und vorab erhobenen klinischen Daten?

2 Methoden

2.1 Patientenauswahl und -rekrutierung

Die Probanden wurden zwischen 2014 und 2017 nach der Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Würzburg (Antragsnummer: 52/14_z) im Rahmen einer europaweiten Studie eingeschlossen (<http://www.ncrna-pain.eu/>). Die Rekrutierung erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Würzburg, der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg, der Klinik für Chirurgie II des Universitätsklinikums Würzburg und der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Mainz. Das Patientenkollektiv bestand aus 30 Patienten mit aktiver CRPS-Erkrankung, 20 FK-Patienten und 20 gesunden Kontroll-Patienten ohne Extremitätentrauma. Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden wie folgt festgelegt:

Einschlusskriterium für CRPS-Patienten:

- Erfüllung der Budapest-Kriterien für CRPS

Einschlusskriterien für FK-Patienten:

- Operation oder Fraktur an der oberen Extremität in den zurückliegenden 12 Monaten ohne Hinweis auf CRPS

Einschlusskriterium für Kontroll-Patienten:

- Nicht-Erfüllen der Einschlusskriterien für CRPS- oder FK-Patienten
- Normale neurologische Untersuchung
- Keine Neuropathie
- Keine Schmerzerkrankung

Ausschlusskriterien für alle Gruppen:

- Tumorerkrankung innerhalb der letzten 5 Jahre
- Alkoholkonsum mit mehr als 3 Standard-Drinks/Tag bei Männern und mehr als 2 Standard-Drinks/Tag bei Frauen
- Vorliegen einer akuten Infektion
- Am Vortag: Starke körperliche Aktivität, schwere Mahlzeit, Alkoholkonsum
- Operation innerhalb der letzten vier Wochen

Die Anamnese und körperliche Untersuchung der Patienten wurden anhand standardisierter Bögen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene sensorische Qualitäten, Willkürmotorik, Sudomotorik und die genaue Schmerzlokalisierung erfasst. Bei der Anamneseerhebung wurde die medizinische Historie und die bisherige Medikation aufgenommen. Die Patienten wurden nach dem Bestehen von Autoimmunerkrankungen, Allergien, Depressionen, Angsterkrankungen und zeitgleich vorliegenden chronischen Schmerzleiden, wie Kopfschmerz, Rückenschmerz, Gelenkschmerz, diffuser Rumpfschmerz befragt. Sie beantworteten mehrere klinische Schmerzfragebögen und erhielten eine QST-Untersuchung.

2.2 Blutentnahme und Fraktionierung

Die Blutentnahmen erfolgten zwischen 8 und 9 Uhr morgens. Die Patienten wurden auf Nüchternheit, Krankheitsgefühl und Einhaltung der oben genannten Verhaltensweisen am Vortag befragt. Den Patienten wurden jeweils zweimal 9,5 ml Blut in EDTA-haltigen Monovetten entnommen. Nach dem Transport ins Labor wurden die Blutproben durch mehrfaches sanftes Invertieren resuspendiert und auf jeweils 1,5 ml fassende separate Gefäße aufgeteilt.

Für die Plasmagewinnung wurden die Blutproben 10 min mit 1200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Jeweils 500 µl des zellfreien Überstands wurden in neue Gefäße übertagen und sofort bei -80 °C eingelagert.

Für die Gewinnung der Leukozyten-Konzentrate wurden die Blutproben mit 7,5 ml Erythrocyte Lysis Puffer gemischt und für 25 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde während der Inkubation zweimal mittels Vortex vermischt, nämlich nach 7 min und nach 15 min. Danach erfolgte eine Zentrifugierung bei 400 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Leukozyten-Pellet wurde in 1,5 ml RNA protect Cell Reagent resuspendiert. Jeweils 500 µl der Suspension wurden in neue Gefäße übertragen und sofort bei -80 °C eingelagert.

2.3 Exosomen-Isolation

In dieser Arbeit wurde das miRCURY™ Exosome Isolation Kit verwendet, bei dem die Exosomen mit Polyethylenglykol (PEG) präzipitiert wurden. Dieses Prinzip wurde zuvor

bereits routinemäßig zur Präzipitierung von Viren und anderen kleinen Partikeln verwendet [158, 159].

Um eine Kontamination des Endprodukts zu verhindern, wurden zunächst 1 ml Plasma mit Thrombin versetzt und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 10000 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Thrombin führt zur Umwandlung des enthaltenen Fibrinogens in Fibrin. Die großen Polymere können durch die Zentrifugation besser erfasst werden und ziehen andere große Plasmabestandteile mit sich, wie Zellschutt und große Mikrovesikel. Von dem Überstand wurden anschließend 800 µl abgezogen, ohne das Fibrinpellet zu berühren. Der gewonnene Überstand wurde mit 320 µl des Präzipitierungs-Puffers versetzt, mittels Vortex vermischt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert.

Durch den Puffer wird ein neutraler pH-Wert und eine hohe Salzkonzentration eingestellt, wodurch das enthaltene PEG mit den Exosomen interagieren kann [158]. Die spezifische Zusammensetzung des Puffers steuert die Größe der zu präzipitierenden Mikropartikel. Durch die Interaktion des PEG mit den Ladungen der Oberflächenproteine werden die Exosomen umschlossen und vom Lösungsmittel abgeschirmt. Die Löslichkeit der Exosomen nimmt dabei so weit ab, dass sie schon bei niedriger Umdrehungszahl abzentrifugiert werden können [159]. Entsprechend wurde der Ansatz nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 500 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend rückstandslos entfernt und verworfen. Das Pellet wurde in 140 µl des Resuspensions-Puffers aufgelöst, um ein Endvolumen von etwa 200 µl zu erhalten. Danach wurde unverzüglich mit der RNA-Isolation fortgefahren.

2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erlaubt die Erzeugung eines Durchlicht-Elektronenbilds mit 100- bis 500000-facher Vergrößerung und einem Auflösungsvermögen von bis zu 0,1 nm. Der Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops ist dabei dem eines Lichtmikroskops nachempfunden. Anstelle von Licht werden Elektronen verwendet, die durch eine Kristallkathode erzeugt und in der Richtung der Anode beschleunigt werden. Innerhalb des Mikroskops herrscht ein Vakuum, um ein Durchbrennen der Kathode, elektrische Überschläge zwischen Kathode und Anode und eine Ablenkung der Elektronen durch Luftmoleküle zu verhindern. Der Elektronenstrahl wird durch

die Passage von Kondensorlinsen verdichtet und auf die Probenebene projiziert. Dort können die Elektronen die Probe entweder ungehindert durchdringen oder sie werden bei einer Kollision mit Probenatomen gering beziehungsweise bei einer Kollision mit positiven Atomkernen stärker abgelenkt. Die Einstellung der Objektivblende erlaubt ausschließlich die Passage von nicht oder nur schwach gestreuten Elektronen, wodurch eine Erhöhung des Kontrasts erreicht wird. Das Endbild wird auf eine Fotoplatte projiziert, wodurch die Elektronen in sichtbares Licht umgewandelt werden. Die Vergrößerung entspricht dabei dem Produkt der Vergrößerung der Objektiv-, Beugungs-, Zwischen- und Projektivlinsen. [160] Die Fixierung und die mikroskopischen Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Nicole Wagner vom Institut für Anatomie der Universität Würzburg durchgeführt.

2.4.1 Fixierung und Kontrastierung der Exosomen

Die pelletierten Exosomen wurden zunächst in 0,1 M Kakodylatpuffer (50 mM Kakodylat, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, pH 7.2) mit 4% Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd für 2 h auf Eis fixiert. Danach wurden die Exosomen viermal und zwar jeweils für 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert und für 10 min in 0,1 M Kakodylat gewaschen. Anschließend wurde 1%iges Osmiumtetroxid in 0,1 M Puffer für 60 min hinzugegeben. Dieser Schritt muss in dunkler Umgebung stattfinden, um eine Präzipitierung zu vermeiden. Im Anschluss daran wurden die Exosomen für 10 min mit 0,1 M Kakodylatpuffer gewaschen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Am folgenden Tag wurden die Proben dann viermal für 10 min mit 0,1 M Kakodylat Puffer gewaschen. Zur Entfernung des Wassers wurde eine Ethanolserie mit ansteigenden Konzentrationen von 30%, 50% und 70% für jeweils 15 min verwendet. Die Exosomen wurden dann mit 2%igem Uranylacetat unter erneutem Lichtausschluss kontrastiert. Danach erfolgte eine weitere Dehydrierung mit einer Ethanolserie, wobei aufsteigende Konzentrationen von 70%, 80%, 90%, 96% und zweimal 100% für jeweils 10 min verwendet wurden. Nach der Entfernung des Wassers wurden die Proben zweimal in Propylenoxid für jeweils 30 min inkubiert. Das Propylenoxid fungiert dabei als Übergangslösungsmittel zwischen dem Ethanol und dem Epon. Zu Beginn des Einbettungsprozesses wurden die Exosomen über Nacht in eine 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Epon812 gegeben. Die Probenbehälter wurden offengelassen, damit das Propylenoxid in dieser Zeit evaporieren konnte. Am folgenden Tag wurde

der Einbettungsprozess durch eine Inkubation in reinem Epon für 2 h und eine Polymerisierung bei 60 °C für 48 h abgeschlossen.

Mit einem Ultracut wurden dünne Schnitte angefertigt, die dann mit einem LEO AB 912 Transmissionselektronenmikroskop untersucht wurden.

2.5 RNA-Isolation

2.5.1 Prinzip

Die Extraktion der RNA basiert auf einer Lyse der Probe mit einem phenolhaltigen Lyse-reagenz und Chloroform mit einer anschließenden Auftrennung des Lysats durch Zentrifugation in eine wässrige und eine organische Phase [161]. Das im Lyse-reagenz enthaltene Guanidinthiocyanat führt als chaotropes Salz zum einen zu einer Denaturierung der Proteine in der Probe und zum anderen ist es ein wirkungsvoller Inhibitor von Ribonukleasen, wodurch die RNA vor Degradierung geschützt wird. Das Phenol des Reagenzes wirkt durch eine Wechselwirkung mit dem hydrophoben Kern der Proteine ebenfalls denaturierend. Das anschließend hinzugegebene Chloroform verstärkt die denaturierende Wirkung des Phenols zusätzlich. Außerdem verhindert es die Bildung unlöslicher RNA-Komplexe, die sich in der Interphase anreichern würden. Durch seine hohe Dichte (1,47 g/cm³) bildet das Chloroform die Grundlage für die Phasentrennung bei der Zentrifugation. Phenol würde zwar durch seine Dichte von 1,07 g/cm³ in wässriger Lösung selbst eine Phasentrennung bewirken, sie erfolgt allerdings nach dem Vermischen mit dem ebenfalls unpolaren Chloroform schneller und gründlicher. Der sich dadurch ergebende saure pH-Wert führt dazu, dass sich die RNA nur in der wässrigen Phase anreichert, während die DNA in der organischen Phase gelöst bleibt. Die Grundlage dafür bildet die Protonierung des Phosphatrückrats der Nukleinsäuren unter diesen Verhältnissen. Die doppelsträngige DNA verliert dadurch sämtliche Ladungen und ist dadurch nur noch in unpolaren Medien löslich. Die ungepaarten Nukleinbasen der einsträngigen RNA werden jedoch nicht protoniert, sodass sie auch nach der Protonierung des Phosphatrückrats weiterhin in polarer Form vorliegt und deshalb in der wässrigen Phase verbleibt. Nach einer Inkubation des Reaktionsansatzes zur Gewährleistung einer ausreichenden Lyse erfolgt die Zentrifugation, um die obengenannten drei Phasen zu erhalten: Eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält, eine weiße Interphase, die durch unlösliche Probenbestand-

teile gebildet wird und die untere organische Phase, in der die DNA gelöst ist. Die wässrige Phase wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reagenzröhrchen überführt. Dabei ist darauf zu achten, die Interphase nicht zu berühren, um eine Verunreinigung des Endprodukts zu vermeiden. Zur weiteren Aufreinigung der RNA werden die mitgelieferten Spin-Säulen verwendet. Während des Durchschreitens der Silikatmembran bei der Zentrifugation wird die RNA festgebunden, wodurch ein effizienteres Waschen in den Folgeschritten ermöglicht wird. Die Bindung beruht auf der hohen Affinität positiv geladener Silikatgruppen mit dem negativ geladenen Phosphatrückrest der RNA. Da die RNA dafür deprotoniert vorliegen muss, wird die gewonnene wässrige Phase zuvor mit 100%igem Ethanol versetzt. Dabei sind auch die in der Lösung enthaltenen chaotropen Salze von großer Bedeutung für diese Wechselwirkung. Unter dem vorherrschenden pH von < 7 brechen sie die Wasserstoffbrücken zwischen dem Wasserstoff des Wassers und den negativ geladenen Sauerstoffmolekülen des Silikats. Danach bilden sie Kationenbrücken zwischen der Membran und dem Phosphat der RNA. Durch die anschließenden Waschschriffe mit den im Kit enthaltenen Waschpuffern und dem 80%igem Ethanol werden noch vorhandene Kontaminationen und Salze entfernt. Bei der abschließenden Zugabe von RNase-freiem Wasser liegen schließlich salzarme Verhältnisse bei einem pH von > 7 vor, wodurch die Bindung der RNA an die Silikatmembran gelöst wird. Nach der Applikation des RNase-freien Wassers liegt daher die RNA in wässriger Lösung vor [162].

2.5.2 Durchführung

Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem miRNeasy Serum/Plasma Protokoll:

200 μ l der Probe wurden mit 1 ml Quiagen Lysis Reagenz versetzt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μ l Chloroform hinzugegeben und für 15 s wurde durch heftiges Schütteln erneut gemischt. Nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung bei 4 °C für 15 min bei 12000 g zentrifugiert.

Von den drei entstandenen Phasen wurde die obere wässrige Phase mit einer Pipette vorsichtig entnommen, in ein neues Reagenzgefäß übertragen und mit dem 1,5-fachen Volumen von 100%igem Ethanol gemischt.

Anschließend wurden 700 µl des Gemischs auf die Spin-Säule übertragen und für 15 s bei Raumtemperatur mit 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Prozess wurde dann mit der restlichen Probe wiederholt.

Danach wurden 700 µl RWT Puffer auf die Säule geladen und für 15 s bei Raumtemperatur mit 8000 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde mit 500 µl RPE Puffer beladen und mit denselben Einstellungen zentrifugiert. Dann wurden 500 µl 80%iges Ethanol auf die Säule gegeben und für 2 min bei Raumtemperatur mit 8000 g zentrifugiert.

Die Spin-Säule wurde danach in ein neues Sammelgefäß überführt und mit geöffnetem Deckel für 5 min bei Raumtemperatur mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um sämtliche Alkoholrückstände von der Membran zu entfernen. Die Säule wurde anschließend erneut in ein neues Sammelgefäß übertragen.

Zuletzt wurden 20 µl RNase-freies Wasser auf die Mitte der Membran gegeben, ohne die Membran dabei zu berühren. Nachdem erneut für 1 min bei Raumtemperatur mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde, lag die RNA in wässriger Lösung im Sammelgefäß vor.

Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit einem nanoDrop2000-Spektrometer gemessen.

2.6 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die RNA mit einer von der RNA abhängigen reversen Transkriptase (RT) in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Dafür wurde das TaqMan™ MicroRNA Reverse Transkription Kit verwendet, bei dem eine modifizierte Moloney murine leukemia virus RT mit optimierten Eigenschaften für die cDNA-Synthese eingesetzt wird. Durch Modifikationen wurde dabei die RNase-H-Aktivität entfernt, wodurch das Umschreiben von längeren Transkripten möglich ist. Durch die erhöhte Thermostabilität der RT behält sie ihre Funktionalität bei Reaktionstemperaturen von bis zu 50°C.

Zur Erhöhung der Spezifität der Reaktion wurden sequenzspezifische TaqMan™-Primer verwendet, welche durch ihre thermodynamisch günstige Haarnadelform nur an das zu amplifizierende Gen binden.

Alle Vorbereitungsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Mastermix wurde nach dem Protokoll aus den benötigten Mengen von nukleasefreiem Wasser, RT Puffer, RNase Inhibitor, dNTP Mix und Multiscribe™ RT hergestellt. 5 µl der RNA-Lösung, die zuvor auf eine Konzentration von 2 ng/µl verdünnt worden waren, wurden zu 7 µl Mastermix gegeben und vermischt. Anschließend wurden 3 µl Primer zu dem Ansatz gegeben und das Gemisch wurde dann für 5 min auf Eis inkubiert.

Die Proben wurden in einen 2720 Thermalcycler gegeben und zunächst für 30 min auf 16 °C erwärmt. Dadurch soll eine Dimerbildung verhindert werden, sodass alle miRNAs und Primer als Einzelstrang vorliegen. Danach wurde die Temperatur für 30 min auf 42 °C erhöht, womit die Synthese des cDNA-Strangs eingeleitet wird. Die RT wurde anschließend durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min inaktiviert. Abschließend wurden die Proben für mindestens 7 min auf 4 °C gekühlt, um eine Degradierung der cDNA zu verhindern. [163]

Reaktionsansatz für Mastermix (7 µl):

4,16 µl	Nukleasefreies Wasser
1,50 µl	10X Reverse Transkription Puffer
0,19 µl	RNase Inhibitor 20 U/µl
0,15 µl	100 mM dNTP
1,00 µl	MultiScribe™ Reverse Transcriptase

2.7 Polymerasekettenreaktion

Für die Genquantifizierung wurde die DNA mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Bei einer Echtzeit-PCR werden zusätzlich Fluoreszenzfarbstoffe hinzugegeben, die im Rahmen des Vervielfältigungsprozesses aktiviert werden. Anhand der messbaren Fluoreszenz kann dann auf die Menge der ursprünglichen DNA zurückgeschlossen werden.

Die Vermehrung der DNA erfolgt dabei in drei Schritten. Durch das Erhitzen auf 95 °C wird eine Teilung in die Einzelstränge erreicht („Schmelzen“). Anschließend erfolgt bei 60 °C die Anlagerung der genspezifischen Primer an die DNA-Matrize („Annealing“). Danach erfolgt die Synthese eines komplementären Strangs durch die DNA-Polymerase

(„Elongation“). Auf diese Weise kommt es bei jedem der 40 Zyklen zu einer Verdopplung der ursprünglichen Menge der Ausgangs-DNA.

2.7.1 TaqMan™-qPCR

Die TaqMan™-Methode wurde zur Erhöhung der Spezifität der nachzuweisenden DNA-Sequenz entwickelt. Sie beruht auf dem Prinzip des sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers. Dafür wird neben den beiden Primern ein zusätzliches drittes Oligonukleotid verwendet, das zwischen den beiden Primern an die Matrize bindet. Diese TaqMan™-Sonde ist am 5'- und am 3'-Ende mit einem grünen Reporter-Farbstoff und einem roten Quencher-Farbstoff markiert. Das grüne Licht ist wegen seiner kürzeren Wellenlänge energiereicher und wird, solange sich die beiden Farbstoffe in enger räumlicher Nähe befinden, an den Quencher weitergeleitet. Dadurch wird die Emission der grünen Fluoreszenz unterdrückt, sodass man nur rotes Licht detektieren kann.

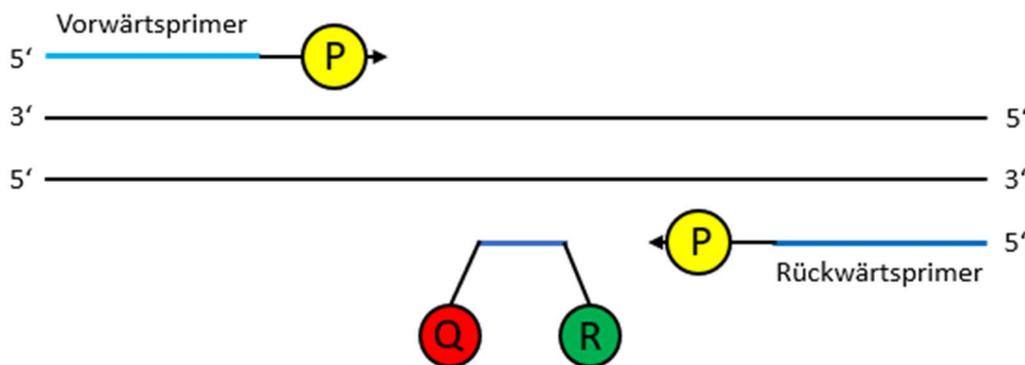


Abbildung 3: Polymerisation des komplementären Strangs. Q = Quencher-Farbstoff, R = Reporter-Farbstoff, P = Polymerase

Wenn die Polymerase bei ihrem Fortschreiten in der Elongation die Sonde erreicht, dann wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität des Enzyms abgebaut, wodurch die beiden Farbstoffe voneinander getrennt werden. Durch diese räumliche Trennung fällt die Supprimierung des Reporter-Farbstoffs weg, sodass danach grüne Fluoreszenz detektiert werden kann.

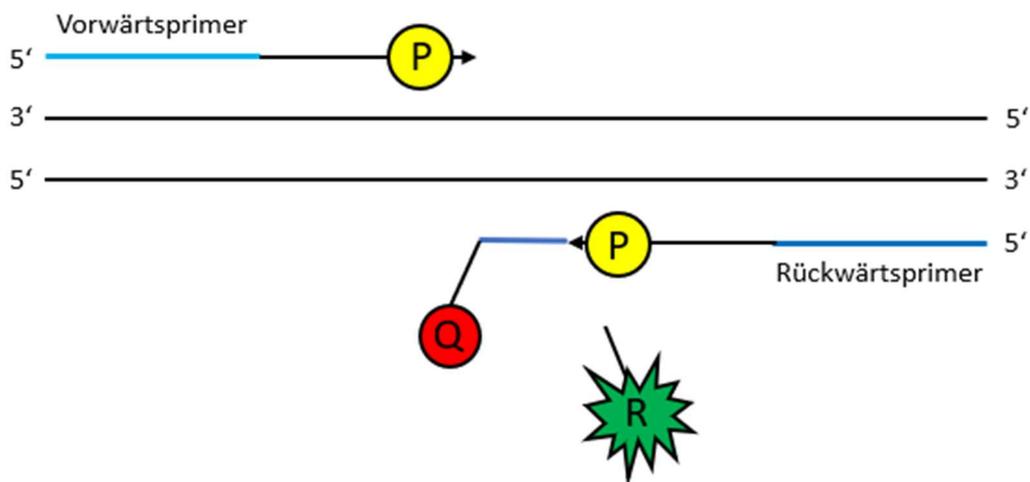


Abbildung 4: Freisetzung des Reporter-Farbstoffs. Q = Quencher-Farbstoff, R = Reporter-Farbstoff, P = Polymerase.

Da bei jedem Vermehrungsschritt Reporter-Farbstoff freigesetzt wird, steigt die gemessene Fluoreszenz proportional mit der Menge der amplifizierten DNA. Um falsche Messungen durch eine Kontamination zu vermeiden, wurden bei jedem PCR-Lauf zusätzlich Kontrollproben gemessen, bei denen keine cDNA hinzugegeben wurde. In diesen wurde keine Aktivität festgestellt.

2.7.2 Durchführung und Auswertung

Für jede Probe wurden drei Reaktionsansätze gemessen, um etwaige Ausreißer erkennen zu können.

Reaktionsansatz für ein Triplikat:

32,00 µl	TaqMan™ Fast Advanced Master Mix
24,54 µl	Nukleasefreies Wasser
4,26 µl	cDNA
3,20 µl	TaqMan™ Sonden

Im Step One Plus Cycler wurden die Proben bei 95 °C für 1 s denaturiert und dann erfolgte die Amplifizierung der Einzelstränge bei 60 °C für 20 s. Dies wurde in 40 Zyklen bei einer gleichzeitigen Messung der freigesetzten Fluoreszenz durchgeführt.

2.7.2.1 Schwellenwert-Zyklus

Um Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der DNA ziehen zu können, wird bei der quantitativen Real-Time-PCR der Schwellenwert-Zyklus (engl. threshold cycle (CT)) bestimmt. Dafür muss zunächst ein Schwellenwert ermittelt werden. Der Schwellenwert wird definiert als Mittelwert der Standardabweichung der messbaren Fluoreszenz zwischen dem dritten und dem fünfzehnten Zyklus multipliziert mit Zehn. Der Schnittpunkt des Fluoreszenzsignals mit dem Schwellenwert wird auf die x-Achse projiziert. Zu diesem Zeitpunkt liegt in jedem Reaktionsgefäß theoretisch die gleiche Menge neu amplifizierter DNA vor, sodass danach zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der freigesetzten Fluoreszenz gemessen werden kann. Aus den ΔCT -Werten der Triplikate jedes Targets wurde der Mittelwert gebildet, der dann für die weitere Quantifizierung verwendet wurde.

2.7.2.2 ΔCT -Methode

Die Effizienz der cDNA-Synthese weist erhebliche Unterschiede auf, weshalb zusätzlich zu den miRNAs auch sogenannte Housekeeping-Gene (HKG) amplifiziert wurden. Diese Gene erfüllen basale Funktionen in den Zellen, sodass interindividuell eine sehr stabile Expression anzunehmen ist. Beim Plasma und den Leukozyten wurde snU6 verwendet, da es als stabile endogene Kontrolle weit verbreitet ist [164]. In den Exosomen zeigte snU6 allerdings eine schwankende Expression, was bereits in einer anderen Arbeit beschrieben wurde [165]. Deshalb wurde für die Exosomen HY3 als endogene Kontrolle verwendet, das in diesem Zusammenhang bereits erfolgreich eingesetzt wurde [166]. Bei der relativen Quantifizierung wurden diese beiden Gene als endogene Kontrollen zur Normalisierung herangezogen. Dazu wurden die CT-Werte der HKG von den CT-Werten der Zielgene subtrahiert.

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ HKG}$$

Da es bei jedem PCR-Zyklus zu einer Verdoppelung der vorliegenden DNA kommt, handelt es sich beim ΔCT um einen logarithmischen Wert. Zur besseren Auswertbarkeit wurde er daher durch Potenzierung in eine linear verlaufende relative Expression umgewandelt.

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta CT}$$

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc.) und Excel 365 (Microsoft). Die Adjustierung der Expression für die Kontrollvariablen Alter und Geschlecht wurde mit einer multiplen linearen Regression on ranks mit SPSS Statistics 25 (IBM) durchgeführt und die Regressionsresiduen berechnet [167]. Zur Quantifizierung des Einflusses von Alter und Geschlecht werden die Regressionsgewichte β aufgeführt, die den Korrelationskoeffizienten entsprechen [168]. Beim Geschlecht handelt es sich um eine punktbiseriale Korrelation, bei der ein positiver Korrelationskoeffizient für eine stärkere Ausprägung beim höher kodierten Merkmal spricht, während negative Werte auf eine stärkere Ausprägung beim niedriger kodierten Merkmal hinweisen (weiblich kodiert mit 0, männlich kodiert mit 1). Somit entspricht im Folgenden eine positiver punktbiserialer Korrelationskoeffizient einer höheren miRNA-Expression bei Männern und negative Werte entsprechen einer höheren Expression bei Frauen.

Zum Vergleich der drei Gruppen wurde bei Normalverteilung eine one-way ANOVA (ANOVA) und bei nicht vorhandener Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis-Test (KWT) durchgeführt. Als post-hoc Test wurde der Bonferroni-Test eingesetzt. Für die Partialkorrelation wurde bei Normalverteilung die Pearson-Korrelation und bei nicht vorhandener Normalverteilung die Spearman-Korrelation verwendet, mit einer sich anschließenden Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung einer Alphafehler-Kumulierung. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant definiert.

2.8.1 Ausreißer-Definition

Bei der Messung der Expressionsniveaus traten auch einzelne stark erhöhte Werte auf. Um eine Verzerrung der statistischen Auswertung durch diese Messpunkte zu verhindern, wurde die Boxplot-Methode nach Tukey als Ausreißer-Definition eingesetzt [169]. Boxplots zeigen den Median als zentrale Linie, wobei die obere und die untere Begrenzung der Box dem 75. und dem 25. Perzentil entsprechen. Die Enden der Antennen (Whisker) entsprechen oben dem 90. Perzentil und unten dem 10. Perzentil. Die Differenz zwischen dem 75. und 25. Perzentil wird als Interquartilabstand bezeichnet. Messwerte gelten dann als Ausreißer, wenn sie entweder den 1,5-fachen

Interquartilabstand über dem 75. Perzentil oder unter dem 25. Perzentil liegen. (Abbildung 5)

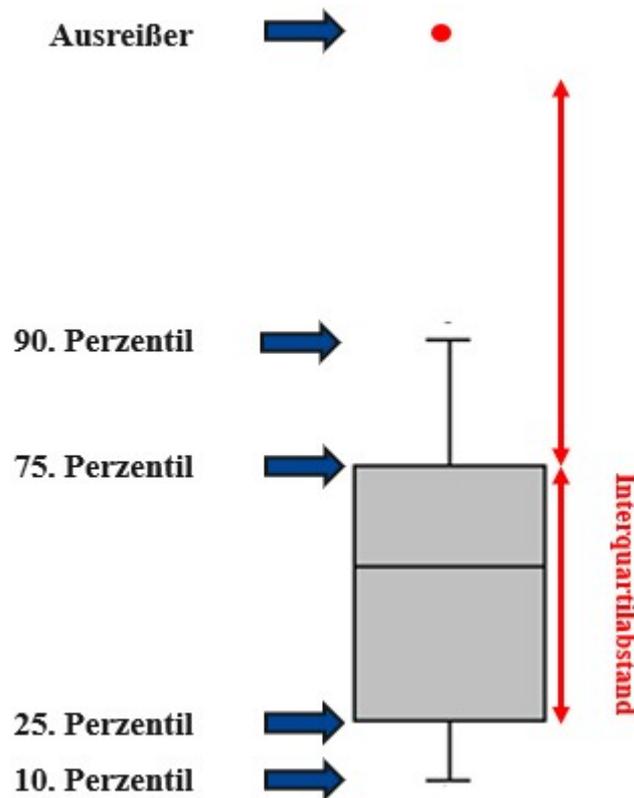


Abbildung 5: Ausreißer-Definition.

2.9 Klinische Scores und Fragebögen

Im klinischen Alltag wird eine Vielzahl unterschiedlicher klinischer Scores und Fragebögen zur Einordnung des Zustands von Patienten eingesetzt. Dabei werden abhängig von der spezifischen Fragestellung diagnostische Parameter bzw. die Selbsteinschätzung der Patienten in repräsentative Punktwerte übersetzt. Klinische Scores werden dabei zur Risikoabschätzung, zur Auswahl von Behandlungen und für ein Assessment des Therapieerfolgs herangezogen.

Wegen seiner vielgestaltigen Präsentation ist es naheliegend, dass beim CRPS oft unterschiedliche Scoresysteme verwendet werden. Auch wenn ihre Verwendung weitverbreitet ist und empfohlen wird, gibt es keinen Konsens darüber, welche spezifischen Scores eingesetzt werden sollen [8]. Die in dieser Arbeit verwendeten Scoresysteme und Fragebögen werden im Folgenden näher erläutert.

2.9.1 Numerische Schmerzskala

Das Leitsymptom des CRPS ist ein anhaltender Schmerz, dessen Intensität naturgemäß nicht objektiv gemessen werden kann. Alternativ erfolgt bei der numerischen Schmerzskala (Numeric Rating Scale, NRS) eine subjektive Einordnung durch den Patienten. Es handelt sich dabei um eine eindimensionale Skala, auf der die Patienten ihre subjektiv empfundenen Schmerzen durch einen Zahlenwert von 0 bis 10 angeben. „10“ entspricht hier dem stärksten vorstellbaren Schmerz, während „0“ für Schmerzfreiheit steht. Der Score ist einfach abzufragen und zwar sowohl in schriftlicher als auch in mündlicher Form. Durch mehrfache Ermittlung im Zeitverlauf können zusätzlich Maximal-, Minimal- und Durchschnittswerte erfasst werden [170].

2.9.2 Neuropathic Pain Symptom Inventory

Beim Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI) handelt es sich um einen Selbsteinschätzungsfragebogen für eine differenzierte Erfassung der Ausprägung und Qualität der Symptome von neuropathischen Schmerzen [171]. Das NPSI wurde bereits in mehrere Sprachen übersetzt, darunter auch Deutsch, und als valides und reliables Messinstrument bestätigt [172]. Der Fragebogen enthält 10 Fragen zu unterschiedlichen Symptomen neuropathischer Schmerzen, deren jeweilige Intensität innerhalb der letzten 24 h auf einer numerischen Skala von 0 bis 10 erfasst werden kann. In zwei weiteren Fragen wird zwischen anhaltenden und anfallsartigen Schmerzen differenziert. Die Bewertung der einzelnen Fragen wird in einem Gesamtwert von maximal 100 Punkten zusammengefasst. Der Gesamtscore ist sensitiv für Veränderungen der Schmerzintensität, wodurch er einen attraktiven Verlaufparameter für Interventionsstudien bildet [171]. Der Bogen wurde bereits bei der Überprüfung der Effektivität von Sympathikusblockaden bei CRPS eingesetzt [173].

2.9.3 Graded Chronic Pain Scale

Die Graded Chronic Pain Scale (GCPS) ist ein reliabler, valider und zeitökonomischer Selbsteinschätzungsbogen für Patienten mit unterschiedlichen chronischen Schmerzzuständen. Der Bogen besteht aus sieben Fragen. Eine erfasst die Anzahl der Tage mit

schmerzbedingter Beeinträchtigung. Drei Fragen sollen das subjektive Ausmaß der Behinderung im Alltag erschließen. Die weiteren drei Fragen beziehen sich auf die Schmerzintensität. Dadurch ergeben sich für Schmerzintensität und Einschränkung jeweils Punktwerte von 0 bis 100. Zusammen mit der Tageszahl können diese Werte dann zur Einordnung der Patienten in eine von vier Schmerzhierarchien verwendet werden. Abhängig vom vorgesehenen Verwendungszweck können sowohl die Einzelskalen als auch die hierarchischen Schmerzkategorien zum Einsatz kommen. Für die Korrelation wurden die Skalen für Schmerzintensität und Einschränkung in dieser Arbeit separat verwendet [174].

2.9.4 CRPS Severity Score

Das am weitesten verbreitete und am besten akzeptierte Messinstrument für die Ausprägung des CRPS ist der von Harden et al. 2010 vorgeschlagene CRPS Severity Score (CSS). Er wurde ursprünglich anhand der An- bzw. Abwesenheit von 17 Kriterien ermittelt, die sich an den Budapest-Kriterien orientierten [8, 175]. 2017 wurde der Score minimal modifiziert, um eine Gleichstellung zwischen anamnestischen und beobachteten Kriterien zu erreichen [176]. Die Kriterien lauten wie folgt:

Anamnestische Kriterien

Anhaltender disproportionaler Schmerz
Allodynie und Hyperalgesie
Asymmetrie der Temperatur
Asymmetrie der Hautfarbe
Asymmetrie beim Schwitzen
Asymmetrisches Ödem
Trophische Veränderungen
Motorische Veränderungen

Beobachtete Kriterien

Hyperalgesie bei Pinprick-Reiz
Allodynie
Asymmetrie der Temperatur
Asymmetrie der Hautfarbe
Asymmetrie beim Schwitzen
Asymmetrisches Ödem
Trophische Veränderungen
Motorische Veränderungen

Bei der Auswertung entspricht die Anwesenheit eines Symptoms einem Punktwert von 1, während die Abwesenheit einen Punktwert von 0 ergibt, sodass insgesamt ein Maximalpunktwert von 16 erreicht werden kann. Die Validität und Reliabilität des CSS und seine Eignung zur Unterscheidung zwischen CRPS- und nicht-CRPS-Patienten wurde empirisch belegt [8]. Der CSS verfügt über eine Sensitivität bezüglich der Veränderungen

der klinischen Symptomatik, wobei allerdings erst eine Veränderung um 4,9 Skaleneinheiten einer klinisch relevanten Veränderung entspricht [176].

2.9.5 Beck Depression Inventory II

Zur Einbeziehung psychischer Faktoren beim CRPS wurde ein Fragebogen zur Erfassung depressiver Symptomatik einbezogen. Das Beck Depression Inventory II (BDI II) ist die 1996 veröffentlichte revidierte Version des ursprünglichen BDI, die speziell an die DSM-IV Kriterien für das Krankheitsbild „major depression“ angepasst wurde. Der Score eignet sich zur Bestimmung der Schwere einer depressiven Symptomatik, ist allerdings für die Erstellung einer klinischen Diagnose ungeeignet. Er besteht aus 21 Fragen, die charakteristische Symptome und Einstellungen bei Depression erfassen. Für jede Frage werden 4 Antwortmöglichkeiten angeboten, die nach Intensität geordnet sind und Punktwerten von 0 bis 3 entsprechen. Somit können Summenwerte von 0 bis 63 erreicht werden, wobei Werte über 19 als klinisch relevant gelten. Die interne Konsistenz, Reliabilität und Validität des BDI II wurden mehrfach in Studien belegt [177].

2.10 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Eppendorf Centrifuge 5418 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Applied biosystems 7300 real time PCR System	Applied Biosystems, Warrington, UK
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2720 Thermocycler	Applied Biosystems, Warrington, UK
Combi Spin	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS, Tokyo, Japan
Eppendorf Research Pipetten (10, 20, 100, 1000µl, Multipipette)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reichert-Jung Ultracut E	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
LEO AB 912 Transmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Software	Hersteller
-----------------	-------------------

Methoden

StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Warrington, UK
NanoDrop 2000/2000c Thermoscientific	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Image SP, version 1.2.3.46 (x64)	Tröndle Systems, Singen, Deutschland

2.11 Kits und Chemikalien

Kits	Hersteller
miRCURY™ Exosome Isolation Kit	Exiqon, Vedbaek, Dänemark
miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
miR-183 TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 002269)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
miR-21 TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 000397)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
miR-29b TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 000413)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
miR-144-5p TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 002148)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
miR-223-5p TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 002098)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
U6 snRNA TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 001973)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
HY3 TaqMan™ MicroRNA Assay (Artikel-Nr.: 001214)	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Erythrocyte Lysis Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNAprotect Cell Reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase freies H ₂ O	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
RNase away	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Methoden

Epon component A	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Epon component B	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Osmiumtetroxid	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Propylenoxid	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Kakodylat Puffer	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

3 Ergebnisse

Hiermit wird darauf verwiesen, dass Teile dieser Arbeit bereits vorab publiziert wurden [178].

3.1 Demographie

In dieser Arbeit wurden die Expressionsprofile ausgewählter zirkulierender miRNAs von 30 CRPS-Patienten, 20 FK, die nach einem Extremitätentrauma einen unauffälligen Heilungsverlauf aufwiesen, und 20 Kontrollen ohne Trauma im Plasma, in Leukozyten und in Exosomen bestimmt. Tabelle 1 zeigt neben den demographischen Daten die Ergebnisse mehrerer Schmerzscores, die mit standardisierter Fragebögen erhoben wurden.

	CRPS-Patienten (n = 30)	FK (n = 20)	Kontrollen (n = 20)	p-Wert¹
Alter (Jahre)	50,2 ± 10,3 (25;73)	40,4 ± 12,3 (20;63)	50,5 ± 10,9 (34;74)	0,006
Geschlecht (n (%)♀/n (%)♂)	24 (80%)/ 6 (20%)	9 (45%)/11 (55%)	16 (80%)/4 (20%)	0,016
Symptombdauer (Jahre)	2,4 ± 2,6 (0,1; 10,8)	0,52 ± 0,45 (0;1,7)		< 0,001
Aktueller Schmerz (NRS²)	4,2 ± 2,3 (0;9)	0,8 ± 1,1(0;4)		< 0,001
Durchschnittlicher Schmerz letzte Woche (NRS)	5,4 ± 1,9 (1;8)	2,3 ± 1,8 (0;6)		< 0,001
Maximaler Schmerz letzte Woche (NRS)	7,6 ± 2,1 (0;10)	4 ± 2,9 (0;5)		< 0,001
CSS³	12 ± 2,5 (6;16)	1 ± 0,9 (0;3)		< 0,001
NPSI Summe⁴	40 ± 20 (0;95)	10 ± 8 (0;31)		< 0,001
BDI II Score⁵	14,1 ± 11,1 (2;40)	3,1 ± 3,4 (2;12)		< 0,001
GCPS⁶ Beeinträchtigung	51,1 ± 20,9 (3,3; 86,7)	17,1 ± 19,6 (0;80)		< 0,001
GCPS Schmerzintensität	55,6 ± 20,5 (7;90)	18,2 ± 15,9 (0;53,3)		< 0,001

Tabelle 1: Demographie und klinische Scores der Gruppen. ¹Unabhängiger t-Test (one-way ANOVA; Pearson Chi Square für Geschlecht). Alle p-Werte sind zweiseitig. p < 0.05 signifikant; ²NRS, Numeric Rating Scale, Range 0-10. ³CSS, CRPS Severity Score, Range 0-16. ⁴NPSI, Neuropathic Pain Symptom Inventory, Range 0-100. ⁵BDI II, Beck Depression Inventory II, Range 0-63, ⁶GPSC, graded chronic pain scale, Beeinträchtigung, Range 0-100. GCPS Schmerzintensität, Range 0-100.

Es zeigte sich, dass die CRPS-Patienten und Kontrollen hinsichtlich ihrer Alters- und Geschlechtszusammensetzung sehr ähnlich waren, während die FK bei beiden Parametern signifikant abwichen. Deshalb wurden die Expressionsniveaus für den Vergleich zwischen den Gruppen und die Korrelation noch mathematisch an diese Kontrollvariablen adjustiert [167].

Es war festzustellen, dass auch die FK sehr wohl unter einer gewissen Schmerzsymptomatik litten. Allerdings waren sowohl die aktuellen und durchschnittlichen als auch die maximalen Schmerzwerte der letzten Woche bei den CRPS-Patienten signifikant höher, was sich auch in den Fragebögen zeigte, wobei die CRPS-Patienten in allen klinischen Schmerzscores und im BDI II höhere Werte erreichten.

Hinsichtlich des zeitlichen Aspekts wiesen die CRPS-Patienten außerdem eine längere Symptombdauer auf, sodass sie im Vergleich zu den FK-Patienten bereits seit einer längeren Zeit unter einer ausgeprägteren Schmerzsymptomatik litten.

Wegen eines Dokumentationsfehlers wurden bei der Gruppe der trauma-naiven Kontrollen zwei Probanden eingeschlossen, die entgegen der Ausschlusskriterien am Abend zuvor moderate Mengen Alkohol zu sich genommen hatten.

3.2 Gruppenvergleich

3.2.1 Erhöhte miRNA-Expression im Plasma von CRPS-Patienten

Die CRPS-Patienten zeigten eine signifikante Hochregulation von miR-21 und miR-29b im Vergleich zu den FK (Abbildung 6 B, C). Bei miR-29b ergab sich auch bei der Expression der Kontrollen eine Hochregulation, die allerdings wegen deren hoher Varianz nicht signifikant war. Die miR-183 war bei den FK herunterreguliert, aber es bestand keine Signifikanz (Abbildung 6A).

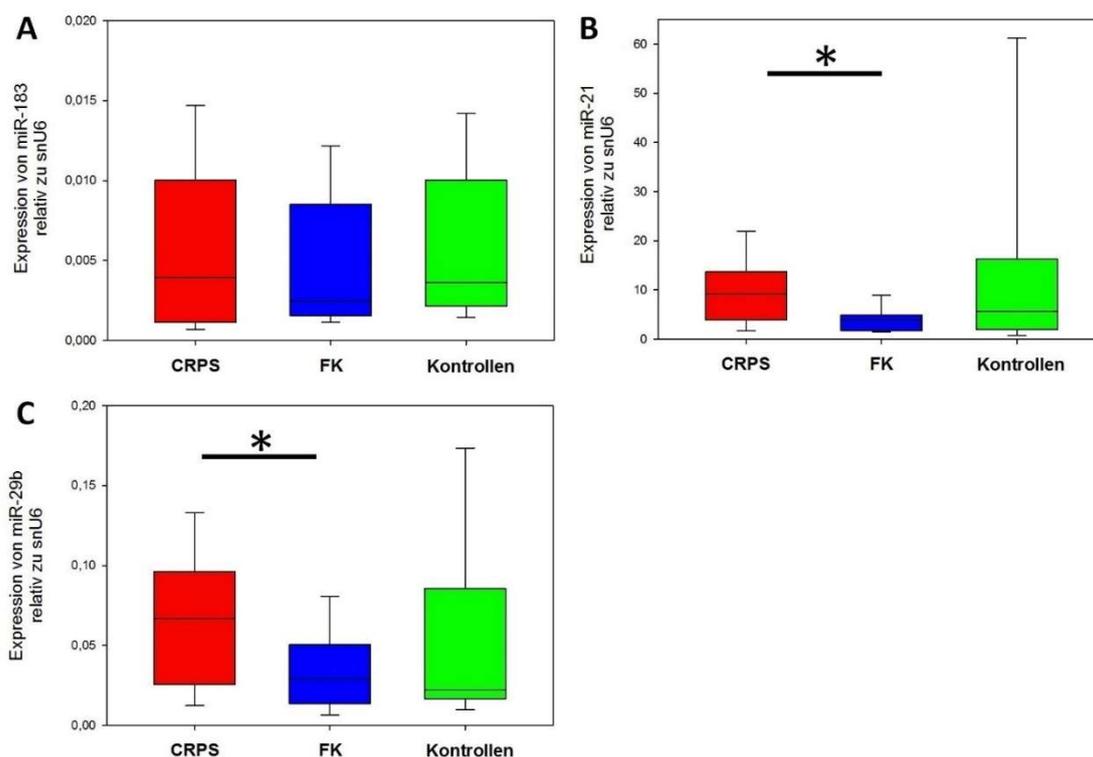


Abbildung 6: Hochregulation von miR-21 und miR-29b bei CRPS-Patienten im Vergleich zu Frakturkontrollen und keine Unterschiede bei miR-183 im Plasma. (A) miR-183; CRPS-Patienten (n = 27), FK (n = 19), Kontrollen (n = 16); KWT. (B) miR-21; CRPS-Patienten (n = 29), FK (n = 17), Kontrollen (n = 18); KWT. (C) miR-29b; CRPS-Patienten (n = 28), FK (n = 17), Kontrollen (n = 17); KWT. (*p < 0.05 signifikant).

Nach der statistischen Bereinigung des Einflusses von Alter und Geschlecht bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr (Abbildung 7). Die generellen Trends blieben jedoch erhalten. miR-21 und -29b waren bei den Patienten im Vergleich mit den anderen Gruppen hochreguliert.

Die multiple Regressionsanalyse mit Alter und Geschlecht als unabhängige Variablen ergab nur für das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die Expression von miR-21

mit einer Tendenz zur verstärkten Expression bei Frauen (**Tabelle 2**). Bei miR-183 und miR-29b waren weder Alter noch Geschlecht relevante Prädiktoren.

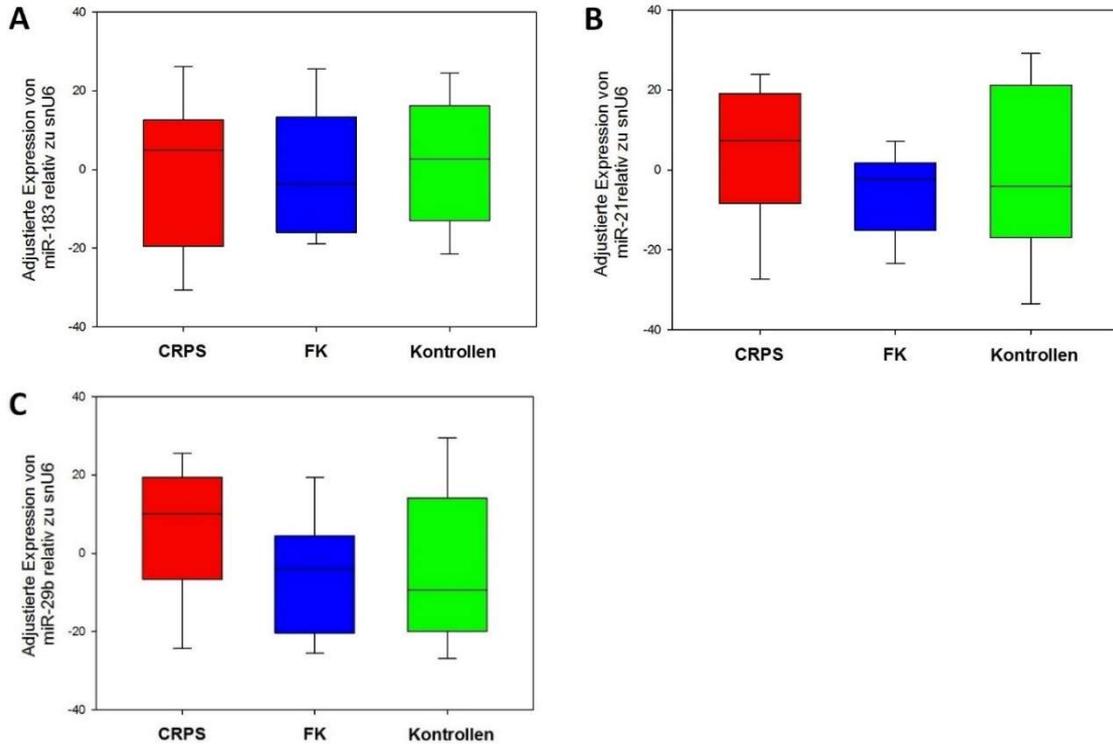


Abbildung 7: Kein signifikanter Unterschied von miR-183, miR-29b und miR-183 im Plasma nach Normalisierung für Alter und Geschlecht. (A) miR-183; CRPS-Patienten (n = 27), FK (n = 19), Kontrollen (n = 16); ANOVA. (B) miR-21; CRPS-Patienten (n = 29), FK (n = 17), Kontrollen (n = 18); KWT. (C) miR-29b; CRPS-Patienten (n = 28), FK (n = 17), Kontrollen (n = 17); ANOVA.

miRNA	Alter ¹	Geschlecht ²
miR-183	0,14	-0,19
miR-21	0,11	-0,26*
miR-29b	0,09	-0,03

Tabelle 2: Korrelation von Alter und Geschlecht mit miRNA-Expression im Plasma. ¹bivariate Korrelation. ²punktbiseriale Korrelation. (*p < 0.05 signifikant).

3.2.2 Keine Unterschiede bei der Expression der miRNAs in Leukozyten

In Leukozyten bestanden weder bei miR-183, miR-21 noch bei miR-29b signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 8**).

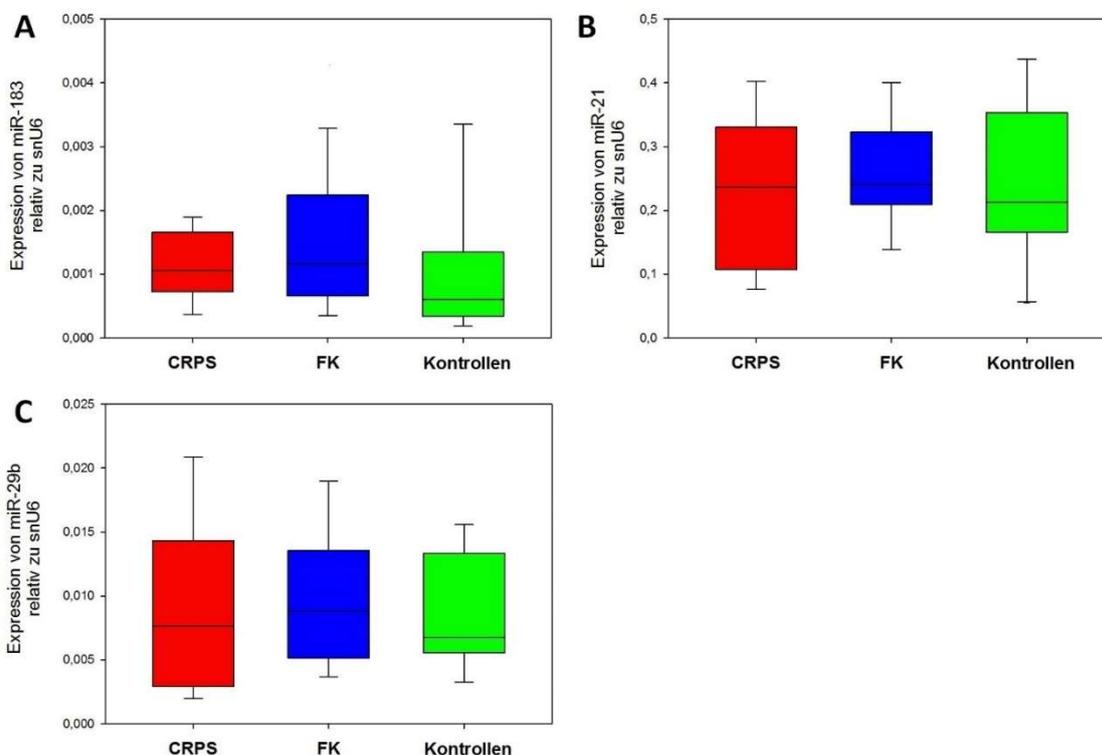


Abbildung 8: Keine signifikanten Unterschiede bei miR-183, -21 und -29b in Leukozyten. (A) miR-183; CRPS-Patienten (n = 27), FK (n = 18), Kontrollen (n = 17); KWT. (B) miR-21; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 20); ANOVA. (C) miR-29b; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 20); KWT.

Nach Adjustierung für Alter und Geschlecht bestanden in den Leukozyten weiterhin keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 9**). Die Verhältnisse zwischen den Gruppen zeigten sich unverändert. Entsprechend konnte in der multiplen Regressionsanalyse bei keiner der miRNAs ein signifikanter Einfluss von Alter und Geschlecht nachgewiesen werden (**Tabelle 3**).

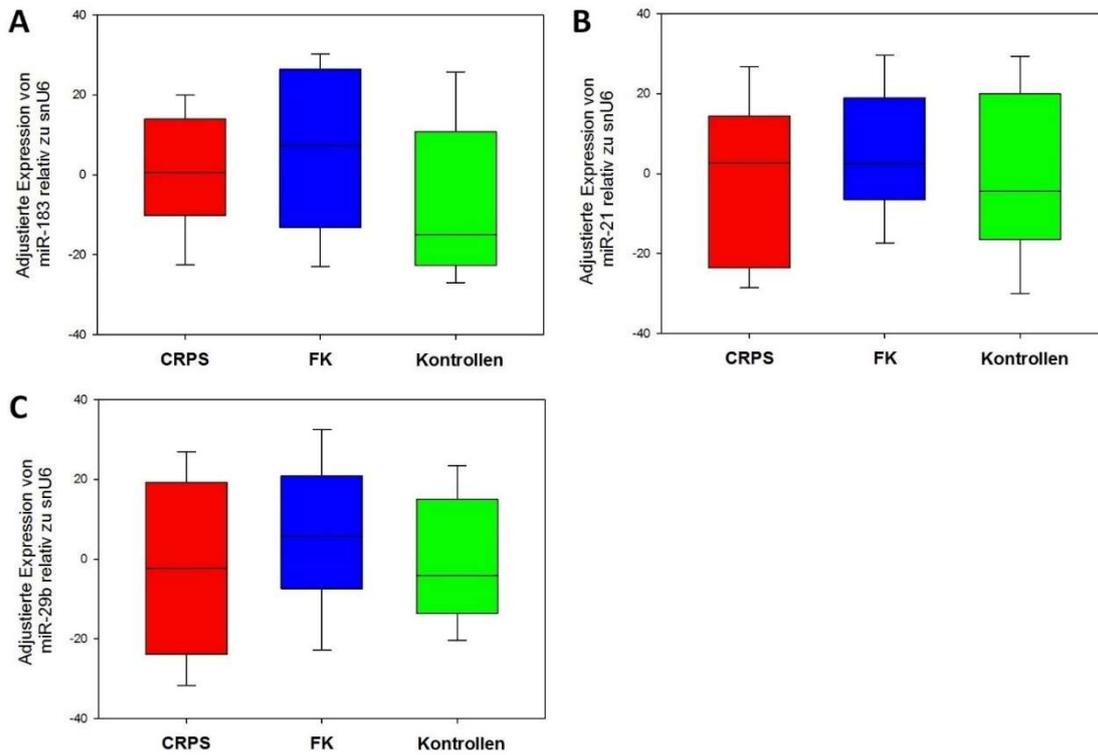


Abbildung 9: Keine Unterschiede bei miR-183, -21 und -29b in Leukozyten nach Adjustierung für Alter und Geschlecht. (A) miR-183; CRPS-Patienten (n = 27), FK (n = 18), Kontrollen (n = 17); ANOVA. (B) miR-21; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 20); KWT. (C) miR-29b; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 20); KWT.

miRNA	Alter ¹	Geschlecht ²
miR-183	-0,05	-0,11
miR-21	0,06	-0,1
miR-29b	0,2	-0,07

Tabelle 3: Korrelation von Alter und Geschlecht mit miRNA-Expression in Leukozyten.

¹bivariate Korrelation. ²punktbiseriale Korrelation.

3.2.3 Elektronenmikroskopie der Exosomen

Um zu zeigen, dass bei der PEG-basierten Präzipitierungsmethode tatsächlich Vesikel der korrekten Größe isoliert wurden, wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Exosomenproben von zwei gesunden Probanden durchgeführt. In der Tat konnten in beiden Proben Vesikel mit für Exosomen typischer Größe und Morphologie nachgewiesen werden (**Abbildung 10**).

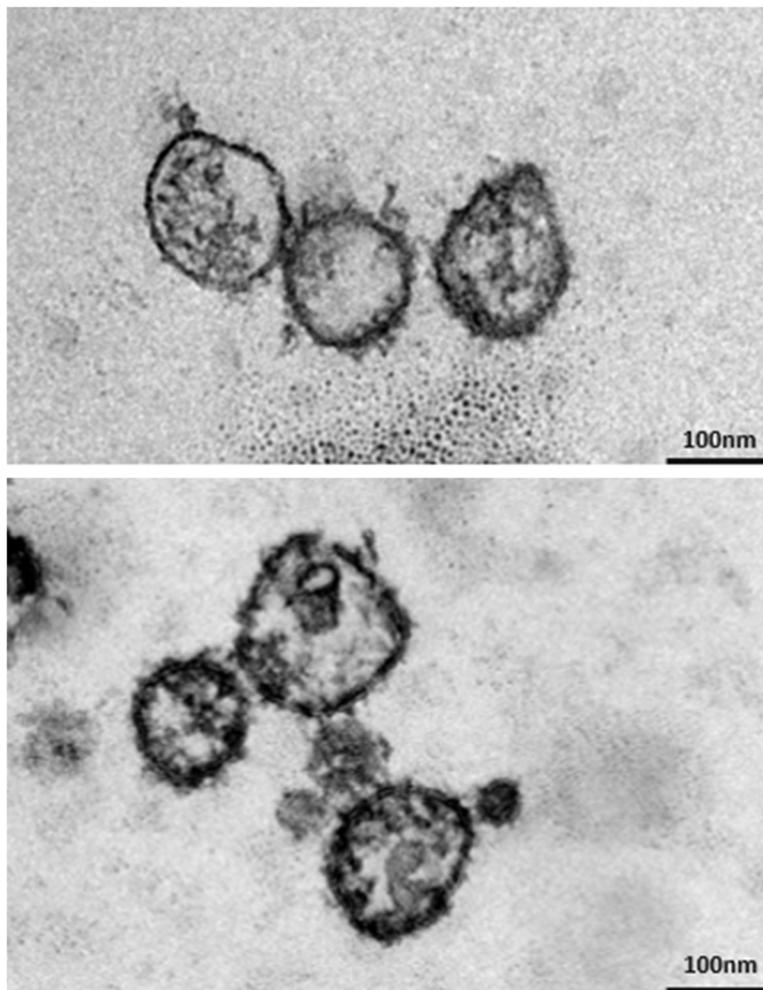


Abbildung 10: Exosomen in der TEM. Primärvergrößerung 150.000, n = 2.

3.2.4 Hochregulation mehrerer exosomaler miRNAs von Frakturkontrollen

Bei den Exosomen fanden sich die ausgeprägtesten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die FKs zeigten hier im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen eine erhöhte Expression der untersuchten miRNAs. Bei miR-183, miR-144-5p und miR-223-5p war diese Hochregulation im Vergleich mit der CRPS-Gruppe jeweils signifikant (**Abbildung 11 A, D, E**). Bei miR-183 ergab sich mit einer 2,9-fachen Hochregulation der größte Unterschied in den Exosomen der FK verglichen mit den CRPS-Patienten. Bei miR-223-5p kam es zu einer 2-fachen und bei miR-144-5p zu einer 1,5-fach erhöhten Hochregulation bei den Frakturkontrollen im Vergleich mit den CRPS-Patienten. Diese drei Unterschiede wiesen jeweils eine statistische Signifikanz auf. Zwischen den CRPS-Patienten und der Kontrollgruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 11**). Nach der Normalisierung für Alter und Geschlecht ergab sich in den Exosomen nur bei miR-223-5p weiterhin eine signifikante Hochregulation bei den FK bezogen auf die CRPS-Patienten (**Abbildung 12 E**). Bei miR-183 und miR-144-5p wiesen die FK nun keine signifikant erhöhte Expression mehr auf (**Abbildung 12 A, D**). Bei miR-29b und -144-5p bestanden ähnliche Expressionsniveaus bei allen Gruppen.

In der multiplen Regressionsanalyse ergab sich bei miR-183 eine negative Korrelation mit dem Alter und eine verstärkte Expression bei Männern. Bei miR-29b und 144-5p wurde nur für das Alter ein relevanter Einfluss nachgewiesen, ebenfalls mit einer abfallenden Expression im Alter. Für miR-21 und miR-223-5p waren weder Alter noch Geschlecht signifikante Prädiktoren (**Tabelle 4**).

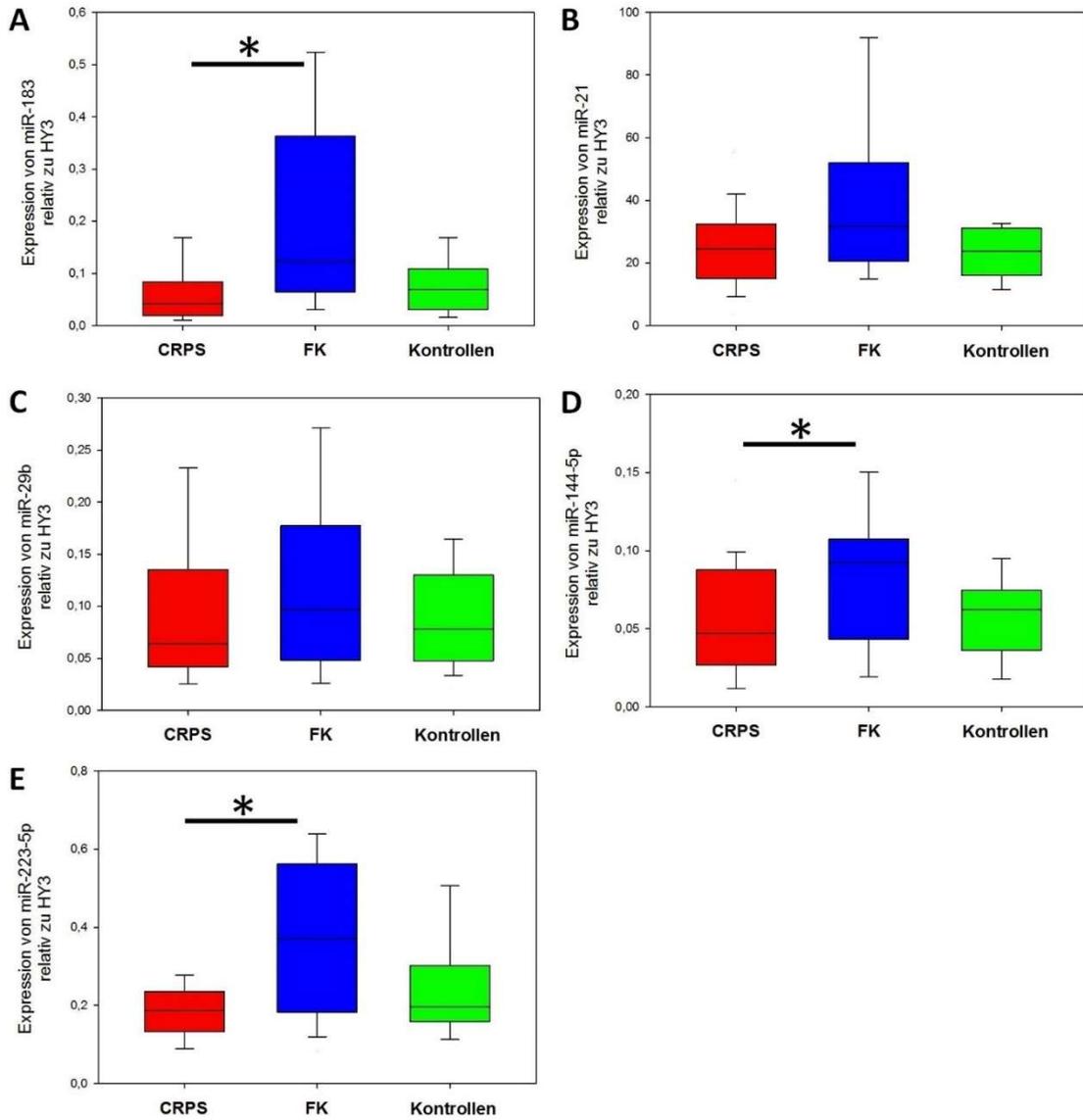


Abbildung 11: Herunterregulation von miR-183, -144-5p und -223-5p in Exosomen bei CRPS-Patienten im Vergleich mit Frakturkontrollen. Kein Unterschied bei miR-21 und -29b. (A) miR-183; CRPS-Patienten (n = 28), FK (n = 20), Kontrollen (n = 16); KWT. (B) miR-21; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 19); KWT. (C) miR-29b; CRPS-Patienten (n = 27), FK (n = 18), Kontrollen (n = 17); KWT. (D) miR-144-5p; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 17); ANOVA. (E) miR-223-5p; CRPS-Patienten (n = 29), FK (n = 20), Kontrollen (n = 18); KWT. (*p < 0.05 signifikant)

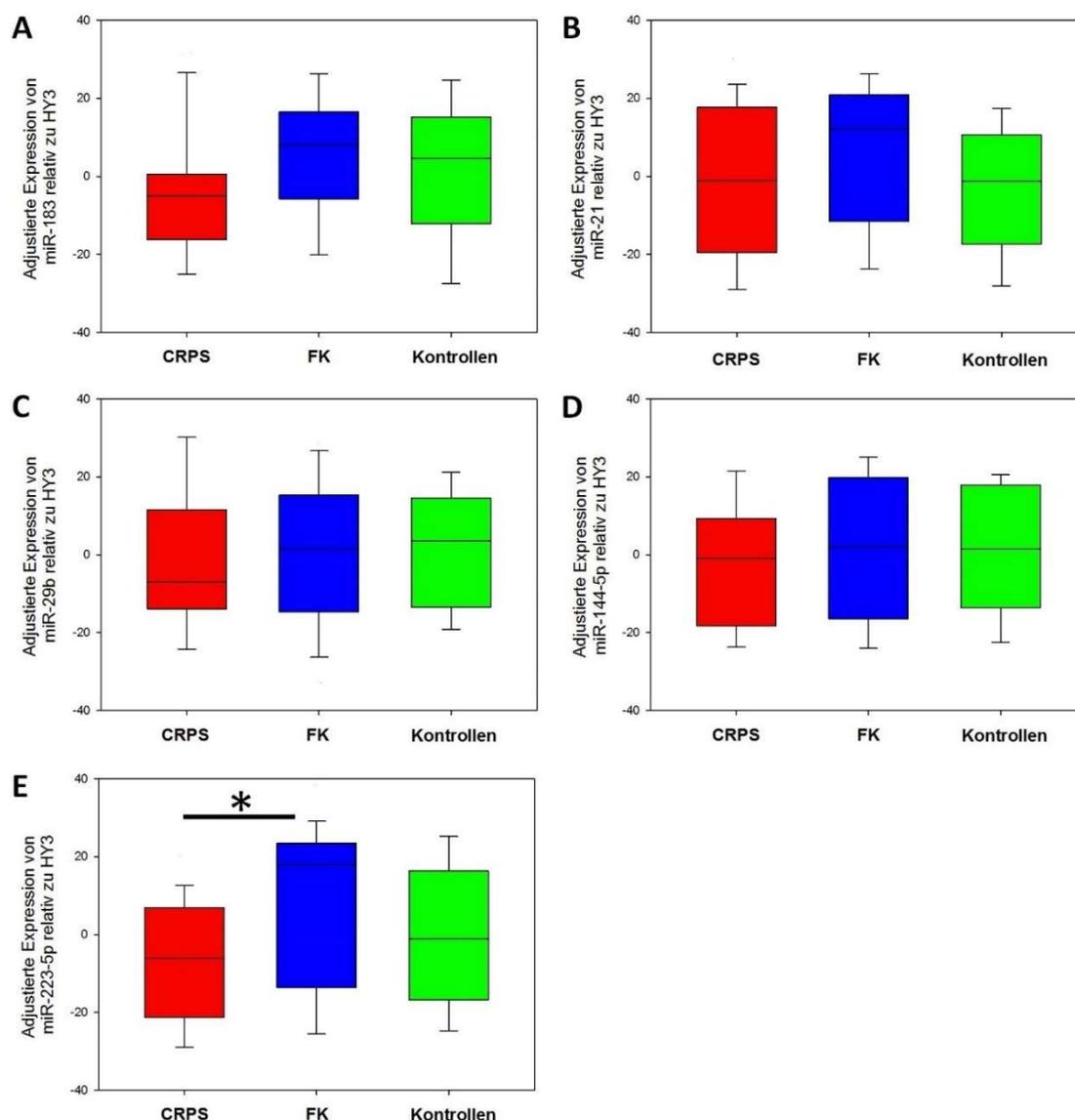


Abbildung 12: Weiterhin Herunterregulation von miR-223-5p bei CRPS-Patienten im Vergleich mit Frakturkontrollen in Exosomen nach Normalisierung für Alter und Geschlecht. Kein Unterschied bei miR-183, -21, -29b und -144-5p. (A) miR183; CRPS-Patienten (n = 28), FK (n = 20), Kontrollen (n = 16); ANOVA. (B) miR-21; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n = 18), Kontrollen (n = 19); KWT. (C) miR-29b; CRPS-Patienten (n = 27), FK (n = 18), Kontrollen (n = 17); ANOVA. (D) miR-144-5p; CRPS-Patienten (n = 30), FK (n=18), Kontrollen (n = 17); KWT. (E) miR-223-5p; CRPS-Patienten (n = 29), FK (n = 20), Kontrollen (n = 18); KWT. (*p < 0.05 signifikant)

miRNA	Alter ¹	Geschlecht ²
miR-183	-0,35*	0,3*
miR-21	-0,23	0,12
miR-29b	-0,27*	0,17
miR-144-5p	-0,42*	0,21
miR-223-5p	-0,2	0,04

Tabelle 4: Korrelation von Alter und Geschlecht mit miRNA-Expression in Exosomen.

¹bivariate Korrelation. ²punktbiseriale Korrelation. (*p < 0.05 signifikant).

3.3 Korrelation

Durch eine Partialkorrelation wurde der Zusammenhang der Expressionsniveaus der untersuchten miRNAs mit ausgewählten klinischen Daten untersucht. Es wurde eine Partialkorrelation durchgeführt, da auch die Daten der FK einbezogen wurden. Eine Partialkorrelation erlaubt dabei, den störenden Einfluss von Kontrollvariablen zu korrigieren. Die Daten wurden für die Kontrollvariablen Alter und Geschlecht adjustiert. Bei mehrfachen Signifikanztests wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt, wodurch ein Signifikanzniveau von 0,0056 festgelegt wurde.

Die Gruppen der CRPS-Patienten und der FK wurden für die Korrelation zunächst zusammengefasst im Sinne einer Kohorte posttraumatischer Patienten. Unter dem neuen Signifikanzniveau bestand eine signifikante negative Korrelation von -0,41 zwischen der mir-223-5p Expression von CRPS-Patienten und FK in Exosomen mit dem CSS (**Tabelle 4**). Somit war eine erhöhte Expression mit einer mildereren Ausprägung der klinischen Symptomatik verbunden. Bei niedrigem Expressionsniveau ergab sich eine verstärkte Streuung der Messpunkte, was einer inhomogeneren Ausprägung der klinischen Symptomatik entspricht (**Abbildung 13**). Dazu passend bestanden Assoziationen von miR-223-5p mit niedrigeren Scores bei Maximalschmerzen und neuropathischen Schmerzen, die allerdings nicht signifikant waren.

Ergebnisse

	Akt. NRS	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	0,09	-0,02	-0,16	-0,16	-0,11	-0,10	-0,12	-0,23	-0,16
P-Wert	0,54	0,91	0,28	0,29	0,48	0,49	0,42	0,12	0,27
n	46	46	46	46	47	47	47	48	48
miR-21	-0,12	-0,11	-0,12	-0,35	-0,17	-0,18	-0,06	-0,15	-0,12^s
P-Wert	0,43	0,47	0,44	0,02	0,26	0,24	0,68	0,31	0,44
n	46	46	46	46	47	47	47	48	48
miR-29b	0,09	0,21	0,15	0,03	0,05	0,14	0,08	0,20	0,16
P-Wert	0,55	0,17	0,33	0,84	0,73	0,38	0,62	0,18	0,28
n	45	45	45	43	45	44	44	45	45
miR-144	0,12	-0,03	-0,17	0,03	-0,02	-0,11	-0,08	-0,02^s	-0,17^s
P-Wert	0,42	0,84	0,25	0,86	0,89	0,45	0,61	0,89	0,25
n	46	46	46	46	47	47	47	48	48
miR-223	-0,3^s	-0,20^s	-0,37^s	-0,28^s	-0,28^s	-0,22^s	-0,20^s	-0,41^s	-0,20^s
P-Wert	0,08	0,19	0,01	0,06	0,05	0,14	0,17	0,003*	0,17
n	47	47	47	47	48	48	48	49	49

Tabelle 5: Ergebnisse der Partialkorrelation von miRNA-Expression in Exosomen mit klinischen Daten von CRPS-Patienten und Frakturkontrollen. Pearson Korrelation (^s Spearman Korrelation). Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. (Signifikanz * bei < 0,0056). ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

Unter dem korrigierten Signifikanzniveau ergaben die Daten der Trauma-Gesamtgruppe im Plasma und in den Leukozyten keine signifikanten Korrelationen. Die Ergebnisse der Korrelation im Plasma und in den Leukozyten können den Tabellen 1 und 2 im Anhang entnommen werden.

Außerdem wurden auf die gleiche Weise Korrelationen der CRPS-Patienten und FK Einzelgruppen bei allen Blutkomponenten durchgeführt. Nach der Bonferroni-Korrektur bestanden keine signifikanten Assoziationen. Die Ergebnisse sind den Tabellen 3 bis 8 im Anhang zu entnehmen

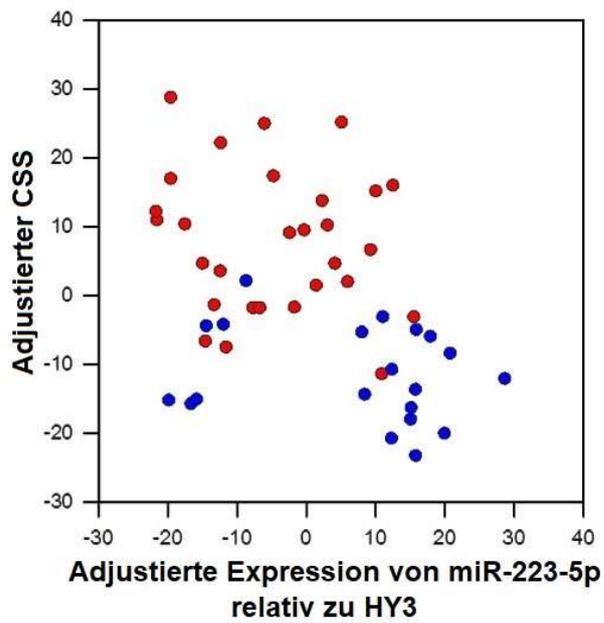


Abbildung 13 Partialkorrelation von miR-223-5p Expression mit CSS bei CRPS-Patienten und Frakturkontrollen. Scatter Plot zeigt CRPS-Patienten in rot und FK in blau. Adjustiert für Alter und Geschlecht. Spearman-Korrelation. $r_s = -0,410$ ($n = 49$).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit sollte prüfen, ob ausgewählte zirkulierende miRNAs, die bereits im Rahmen unterschiedlicher chronischer Schmerzsyndrome beschrieben wurden, eine aberrante Expression beim CRPS aufweisen. Dafür wurde die miRNA-Expression im Blut von CRPS-Patienten mit der von Traumapatienten mit einem regelhaften Heilungsverlauf und von Kontrollen ohne vorangegangenes Trauma verglichen. Die Messungen erfolgten im Plasma, in Leukozyten und Exosomen, um zusätzlich mögliche Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen der jeweiligen Blutkomponenten zu erschließen.

Wegen einer abweichenden Alters- und Geschlechtszusammensetzung der FK-Gruppe musste eine Adjustierung der Ergebnisse an diese Variablen durchgeführt werden. Das Geschlecht zeigte dabei einen signifikanten Einfluss auf die Expression von miR-21 im Plasma und miR-183 in Exosomen. In den Exosomen konnte außerdem ein Rückgang der Expression von miR-183, -29b, und -144-5p Expression mit dem Alter festgestellt werden.

Tatsächlich wiesen die drei untersuchten Blutkomponenten unterschiedliche Expressionsprofile auf. In den Exosomen bestand eine Hochregulation von miR-183, -144-5p und -223-5p bei den FK, allerdings war nach der Adjustierung nur noch der Unterschied bei miR-223-5p signifikant. Im Plasma fanden sich erhöhte Expressionen von miR-21 und -29b bei den CRPS-Patienten im Vergleich mit den FK, die nach Alters- und Geschlechtsadjustierung keine Signifikanz mehr aufwiesen. Die Kontrollen ohne Extremitätentrauma zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber den beiden anderen Gruppen.

Die Partialkorrelation der miRNA-Expression mit den klinischen Daten von Patienten mit zurückliegendem Trauma ergab eine Assoziation der Expression zwischen exosomalem miR-223-5p und niedrigeren Werten im CSS. Bei der Analyse der einzelnen Gruppen wurden mehrere Korrelationen mit ähnlicher oder sogar höherer Stärke gefunden. Wegen der kleineren Gruppengrößen konnten diese Korrelationen allerdings nicht das geforderte Signifikanzniveau erfüllen, sodass ihre Aussagekraft als eingeschränkt zu bewerten ist.

4.2 Diskussion der Methoden

Wie bei den meisten Messungen im menschlichen Blut spielen präanalytische Überlegungen eine wichtige Rolle bei der Quantifizierung zirkulierender miRNAs [179]. Bei der Blutentnahme ist auf eine Vermeidung von Hämolyse zu achten, da sie zu einer artifiziellen Erhöhung einzelner miRNAs und einer Verfälschung der folgenden Arbeitsschritte führen kann [180]. Durch eine Lagerung auf Eis und eine Fraktionierung der Blutproben innerhalb von 12 h wurde versucht, die Degradierung der miRNAs und den Zerfall von zellulären Blutbestandteile zu verringern, die zu einer verfälschenden miRNA-Freisetzung führen könnten [181].

Die fertigen Plasma- und Leukozytenproben wurden wie allgemein üblich bei -80 °C gelagert. Unter diesen Lagerungsbedingungen und bei einer Vermeidung mehrerer Auftau-Gefrier-Zyklen kann der miRNA-Gehalt der Proben auch über Jahre stabil bleiben [182]. Für Isolation der Exosomen wurde in dieser Arbeit eine Präzipitierungsmethode eingesetzt. Die dafür kommerziell erhältlichen Kits sind benutzerfreundlich und mit einem geringeren Zeitaufwand verbunden als alternative Verfahren. Sie erlauben die Untersuchung geringer Probenmengen und erfordern keine zusätzliche spezialisierte Ausrüstung. Diese Eigenschaften sind wichtige Voraussetzungen für die Durchführung möglicher Routinetests, wenn sich exosomale miRNAs zukünftig als diagnostisches Mittel im klinischen Alltag etablieren sollten.

Das hier verwendete miRCURY™-Kit wurde bereits sowohl mit anderen Präzipitierungskits als auch mit der Goldstandardmethode Ultrazentrifugation verglichen [183]. Dabei konnte seine Eignung zur verlässlichen Isolation von Exosomen hinsichtlich der Bestimmung der Größe, der Morphologie und auch des Gehalts von für Exosomen spezifischen Proteinen erfolgreich validiert werden. Während die Mengen der extrahierten exosomalen RNA bei der Präzipitierung und Ultrazentrifugation ähnlich sind, unterscheiden sich die gemessenen miRNA-Profile zwischen den Verfahren [183]. Deshalb sollte beim Vergleich von Studien mit exosomalen miRNAs ein besonderes Augenmerk auf die verwendete Isolationsmethode der Exosomen gerichtet werden. Dabei führt eine Reduktion der Probenmenge nicht zu einer im gleichen Maße verminderten Menge extrahierter exosomaler RNA. Es besteht die Vermutung, dass stets eine geringe Kontamination der Exosomen-Konzentrate mit nicht-exosomalen Partikeln (HDL, AGO) vorliegt [183], welche bei niedrigen Probenmengen zu einer fälschlich erhöhten RNA-Ausbeute führen.

Deshalb sollte eine übermäßige Reduktion der Startmenge bei der Isolation der Exosomen vermieden werden. Die in dieser Arbeit verwendete Startmenge von 1 ml war verhältnismäßig hoch, sodass dieser verfälschende Einflussfaktor dadurch minimiert werden konnte.

Für die Darstellung und Charakterisierung der Exosomen wurde die TEM eingesetzt, die wegen der relativ häufigen Verfügbarkeit von Elektronenmikroskopen weit verbreitet ist. [184, 185]. Bei anderen Verfahren ist hingegen meist eine spezialisierte Ausrüstung erforderlich. Ihr maximales Auflösungsvermögen von bis zu 1 nm erlaubt eine bessere Detektion kleiner Vesikel und bietet die Möglichkeit einer visuellen Darstellung. Durch die Kombination mit einer Immunogold-Markierung bestünde außerdem die Möglichkeit, mit der TEM Informationen zum Proteingehalt der Exosomenmembran zu erhalten. Der hauptsächliche Nachteil der TEM besteht in der technisch sehr anspruchsvollen und zeitaufwendigen Präparierung der Proben. Außerdem können die zahlreichen Fixierungs- und Waschschrte und das beim Mikroskopieren bestehende Vakuum zu einer Verformung oder sogar Zerstörung der Exosomen führen. Deshalb wurden die entsprechenden Schritte von Mitarbeitern des Instituts für Anatomie durchgeführt, welche über die entsprechende Expertise und Erfahrung verfügen. Bei einer zusätzlichen Verwendung von Immunogold erhöht sich sowohl die strukturelle Belastung der Exosomen als auch der technische Aufwand noch weiter. Eine alternative Möglichkeit zur Analyse der exosomalen Proteine wäre die Verwendung von Western Blot. In dieser Arbeit wurde von einer zusätzlichen Proteinanalyse abgesehen, da das verwendete Präzipitierungsverfahren bereits vom Hersteller und extern validiert wurde [183].

Bei der Methode, die zur Isolierung der RNA verwendet wurde, handelt es sich um eine weiterentwickelte Version der single-step Methode nach Chomczynski und Sacchi, die um eine auf einer Silikatmembran basierende Aufreinigung erweitert wurde [161]. Das Verfahren ist bekannt für seine qualitativ hochwertigen Ergebnisse, da während des Lyseprozesses die kritischen RNAsen inaktiviert werden. Das miRNeasy-Verfahren ermöglicht eine zuverlässige Isolation von RNA aus kleinen Probenmengen [186]. Die Volumenreduktion ist grundsätzlich wünschenswert, da im Isolat letztendlich immer minimale Verunreinigungen mit Blutbestandteilen vorliegen (z. B. Lactoferrin und IgG) [180], die als Polymerase-Inhibitoren wirken und dadurch die folgenden Analyseschritte verfälschen können. Mit steigenden Probenvolumina erhöht sich der Anteil der Kontaminanten

bei einer gleichbleibenden RNA-Ausbeute, weshalb eine Startmenge von 200 µl empfohlen wird [182]. Als Weiterentwicklung des Verfahrens wurde mittlerweile eine Version erarbeitet, bei der kein Phenol mehr nötig ist, was vor allem den Arbeitsablauf erleichtert, aber zu keiner Verbesserung der RNA-Isolation führt [186].

Um eine exogene Kontamination der Proben mit RNAsen und eine Verfälschung der Messungen zu vermeiden, wurde der Arbeitsplatz vor jedem Arbeitsgang mit 70 %igem Alkohol und RNaseAWAY™-Reagenz gereinigt. Des Weiteren wurden spezielle Pipettenspitzen, Reagenzgefäße und RNase-freie Reagenzien verwendet.

Zur Quantifizierung mittels PCR wurden die miRNAs nach der Isolation in cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung von stem-loop Primern kann dieser Vorgang mit sehr guter Sensitivität und Spezifität durchgeführt werden. Dennoch handelt es sich weiterhin um einen kritischen Schritt, da die Effizienz der cDNA-Synthese nicht ermittelt werden kann, weshalb Housekeeping-Gene als endogene Kontrollen verwendet wurden. Dabei handelt es sich um Gene, die im untersuchten Gewebe interindividuell auf einem stabilen Niveau exprimiert werden. Da sie bei der cDNA-Synthese derselben Effizienz wie die miRNAs unterliegen, können sie zur Normalisierung verwendet werden.

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine etablierte sensitive und spezifische Methode zur miRNA-Quantifizierung [187]. Für den Einsatz bei miRNAs wurde die Spezifität des Verfahrens durch die Verwendung kürzerer Sonden mit höheren Schmelztemperaturen gesteigert. Da die Proben beim Übertragen auf die PCR-Platte nicht verschlossen werden konnten, wurde dieser Schritt räumlich getrennt von den anderen Schritten durchgeführt, um eine Kontamination der Proben zu vermeiden. Außerdem wurden immer Leerproben ohne cDNA mituntersucht, um eine Kontamination mit externer DNA ausschließen zu können.

Wegen der Anfälligkeit von Nukleinsäuren für Degeneration wurden die komplette cDNA-Synthese und die PCR-Präparation auf Eis durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C unter Vermeidung mehrfacher Auftau-Gefrier-Zyklen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Expression in den Exosomen

Bei den untersuchten Blutkomponenten ergaben sich jeweils deutlich unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile. Bei den Exosomen wiesen die FK eine signifikante Hochregulation von miR-223-5p im Vergleich mit den CRPS-Patienten auf. Dieser Unterschied blieb auch nach der Adjustierung für Alter und Geschlecht erhalten. McDonald et al. konnten bereits eine Hochregulation von miR-223-5p in den Exosomen im Serum von CRPS-Patienten nachweisen [116], wobei allerdings nur sechs Patienten untersucht wurden. Diese Diskrepanz kann aber auch auf die unterschiedlichen Ausgangsmaterialien zurückgeführt werden. Auch bei der Verwendung identischer Isolationsmethoden können aus dem Plasma mehr Exosomen isoliert werden als aus dem Serum [188]. Außerdem verwendeten McDonald et al. die Ultrazentrifugation zur Isolierung der Exosomen, was zusätzlich zu einem abweichenden miRNA-Profil im Vergleich mit der Präzipitierung führen kann [183]. McDonald et al. beschrieben außerdem eine Hochregulation von miR-144 in den Exosomen von CRPS-Patienten, was in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnte [116]. Als mögliche Erklärungen kann man auch hier auf Unterschiede bei den Ausgangsmaterialien (Plasma vs. Serum) und den Isolationsmethoden (Präzipitierung vs. Ultrazentrifugation) verweisen. Für die Expression von miR-183, -21 und -29b konnten McDonald et al. keine Unterschiede zwischen den Exosomen der CRPS-Patienten und den gesunden Kontrollen nachweisen [116]. Auch in dieser Arbeit konnten keine Abweichungen festgestellt werden. Nach der Adjustierung für Alter und Geschlecht ergaben sich auch gegenüber den FK keine relevanten Unterschiede mehr.

Bei der Zusammenfassung der Daten von CRPS-Patienten mit Frakturkontrollen ergab sich eine signifikante negative Korrelation ($r_s = -0,41$) zwischen der miR-223-5p-Expression und dem CSS, die auch nach der Adjustierung für Alter und Geschlecht erhalten blieb. Erhöhtes miR-223-5p war somit mit einem niedrigeren CSS vergesellschaftet und damit auch einer mildereren klinischen Symptomatik verbunden, was auf einen protektiven Effekt hinsichtlich von miR-223-5p beim Heilungsverlauf hinweist. Eine verminderte Expression war jedoch mit einer variierenden Krankheitsausprägung verbunden, sodass ein Mangel an miR-223-5p nicht unmittelbar zu einer Krankheitsaggravierung zu führen scheint. In der Korrelationsanalyse ergab sich außerdem bei einer zunehmenden Symptombdauer eine Tendenz zu einer abfallenden miR-223-Expression (**Tabelle 5, 5 Anhang,**

8 Anhang), wodurch man auf eine hauptsächliche Bedeutung für die frühe Krankheitsphase schließen kann. Beim Krankheitsbeginn wird das CRPS pathophysiologisch stark durch die Inflammation dominiert [26]. Für miR-223-5p wurde bereits die Fähigkeit zur Inhibierung von Entzündungsreaktionen beschrieben. Zu den bestätigten Zielgenen von miR-223-5p gehören eine Reihe von Zelltod-Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie und der TLR-4 [152, 153, 189]. miR-223-5p ist außerdem ein direkter Regulator von Sema 3A, das TLR-abhängig Inflammationsreaktionen aggraviert [190]. Wang et al. konnten in einem Mausmodell für Sepsis eine reduzierte Entzündungsreaktion durch Makrophagen nach der Aufnahme von mit miR-223 beladenen Exosomen nachweisen, was mit einem reduzierten Zelluntergang verbunden war [152]. Die Applikation von miR-223-5p in Makrophagen führt zu einer Differenzierung in einen antiinflammatorischen Phänotyp, was mit einer erniedrigten Expression von Entzündungsmediatoren, wie TNF α , IL-1 β und IL-6 verbunden ist [157]. Demgegenüber entwickelten miR-223-Knockout-Mäuse eine verstärkte Inflammationsreaktion bei ventilator-assoziiertes Lungenverletzung und MRSA-Pneumonie. [126] Diese war reversibel nach Applikation von miR-223-mimics und einer Supprimierung von Poly-ADP-Polymerase-1 (PARP-1), einem direkten Regulationsziel von miR-223-5p. PARP-1, das bei miR-223-Inhibierung eine erhöhte Aktivität aufweist, ist an unterschiedlichen Prozessen beteiligt, wie der DNA-Reparatur und proteosomalem Abbau. Es wurde bereits mehrfach im Zusammenhang mit Inflammation und Ischämie-Reperfusion-Verletzungen beschrieben [126]. Wegen der mehrfach beschriebenen gleichgerichteten Regulation und Funktion von miR-223-5p mit ihrem Führungsstrang, kann auch über eine funktionelle Beteiligung von miR-223-3p spekuliert werden [153, 191, 192]. Auch für diesen Strang wurden bereits Assoziationen mit regelhaften Heilungsverläufen beschrieben. Bei lumbalem Bandscheibenvorfall wiesen die Patienten mit einer verstärkten Expression von exosomaler miR-223-3p eine niedrigere Rate von persistierenden Schmerzen auf [193]. Bei den schmerzlosen Prolaps-Patienten war miR-223-3p außerdem mit verringertem proinflammatorischen IL-6 assoziiert [193]. In ähnlicher Weise korrelierte extrazelluläres miR-223-3p bei rheumatoider Arthritis mit verminderten inflammatorischen Mediatoren, was mit einem verbesserten Therapieansprechen unter TNF α -Blockade verbunden war [194].

Insgesamt ist somit für miR-223 eine entzündungsmodulierende Wirkung ersichtlich. Die vermehrte Expression bei den FK könnte als eine Reaktion zur Dämpfung der posttraumatischen Inflammationsreaktion verstanden werden. Bei den CRPS-Patienten, die ein ähnliches Expressionsniveau wie die traumanaiven Kontrollen aufwiesen, bestünde demzufolge ein relativer Mangel. Dieser könnte zu einer gesteigerten Anfälligkeit für das Auftreten überschießender Inflammationsreaktionen führen, welche den Ablauf des Heilungsprozesses behindern und somit potenziell zur Entwicklung des CRPS beitragen.

Bei unserer Korrelation ist zu beachten, dass die FK zusätzlich zu der erhöhten miR-223-Expression auch grundsätzlich niedrigere CSS-Werte aufwiesen als die CRPS-Patienten. Bei der Korrelation der Einzelgruppen konnte jeweils keine relevante Assoziation zwischen miR-223 Expression und CSS nachgewiesen werden (**Tabelle 5 Angang, 8 Anhang**), was als Indiz gegen eine kausale Beziehung der Gesamtkorrelation interpretiert werden kann. Die Korrelation scheint vielmehr darauf zu beruhen, dass beide Parameter eine Trennschärfe zwischen den Gruppen aufweisen.

Für eine weiterführende Abklärung der pathophysiologischen Relevanz von miR-223 bei CRPS sind zusätzliche Untersuchungen erforderlich. Dabei wäre es sinnvoll, inflammatorische Mediatoren wie TNF α , IL-1 β und IL-6 im Blut der Patienten zu quantifizieren, um mögliche Korrelationen aufdecken zu können. Man kann annehmen, dass solche Mediatoren bei Patienten mit erniedrigter miR-223-Expression in einem erhöhten Maße vorliegen. Wenn dies der Fall sein sollte, dann könnte in einem weiteren Schritt überprüft werden, ob durch eine Applikation von miR-223-mimics eine Inhibierung des Inflammationsprozesses erreicht werden kann. Des Weiteren wäre eine Aufklärung des Ursprungs der zirkulierenden Exosomen für die Einordnung in den pathophysiologischen Prozess hilfreich. Aktuell ist noch unklar, ob ihre Freisetzung lokal in der betroffenen Extremität oder im Rahmen einer systemischen Reaktion erfolgt. Durch die Analyse ihrer Proteinzusammensetzung kann der zelluläre Ursprung von Exosomen ermittelt werden. Die Raman-Spektroskopie wurde als mögliche Methode zur Bestimmung des zellulären Ursprungs von Exosomen vorgeschlagen, welche die Möglichkeit einer zuverlässigen Analyse größerer Probenanzahlen bieten könnte [195].

4.3.2 Expression im Plasma

Im Plasma war die Expression von miR-21 bei den CRPS-Patienten im Vergleich mit den FK zunächst signifikant erhöht. Nach der Adjustierung für Alter und Geschlecht blieb

dieser Trend erhalten, wenn auch nicht mehr signifikant. Bei der Untersuchung von Orlova et al. konnte keine relevante Hochregulation im Gesamtblut bei CRPS-Patienten nachgewiesen werden [115], wobei die Kontrollgruppe allerdings aus gesunden Individuen bestand. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe ohne ein zurückliegendes Trauma festgestellt werden. Die Hochregulation bei CRPS-Patienten passt gut in den Kontext von der Rolle von miR-21 bei chronischen Schmerzen. So wurde bei schmerzhaften peripheren Neuropathien eine lokale Hochregulation in den *Nervi surales* und zirkulierend in den Leukozyten beschrieben [134]. miR-21 wurde in mehreren Tiermodellen für neuropathischen Schmerz regelmäßig erhöht exprimiert [135-137]. Die Hochregulation wurde in diesen Modellen durch eine Nervenschädigung ausgelöst, die hingegen bei CRPS Typ I Patienten definitionsgemäß nicht vorliegt. Dennoch wird auch bei CRPS I Patienten von einer mikroskopischen Schädigung mit einem selektiven Nervenfaserverlust ausgegangen [51]. Trotz einer mehrfachen Beschreibung bei neuropathischen Schmerzen in der Literatur zeigte die miR-21 Expression in der Korrelationsanalyse keine Assoziation zu den ausgewählten Schmerz-Scores (**Tabelle 3 Anhang**). Auch Orlova et al. fanden keine signifikanten Korrelationen von miR-21 zu klinischen Parametern [115]. Möglicherweise ist miR-21 nur ein Indikator für die Inflammationsreaktion beim CRPS, denn es unterliegt während der Inflammation einer komplexen Regulation. So führen TNF α und NF κ B zu einer Induktion der miR-21 Expression [139]. TNF α ist im Serum und in Hautbiopsien von CRPS-Patienten erhöht messbar [39, 43]. NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der von einer Vielzahl der am CRPS beteiligten Zytokine induziert und aktiviert wird [196]. Deshalb wurde bereits eine positive Korrelation von miR-21 mit dem löslichen TNF α -Rezeptor bei CRPS beschrieben, der als Regulator von Inflammationsprozessen fungiert [115].

miR-29b zeigte im Plasma eine Hochregulation bei den CRPS-Patienten im Vergleich mit den FK. Die Regression ergab keinen signifikanten Einfluss von Alter oder Geschlecht auf miR-29b, allerdings war die Hochregulation nach der Adjustierung nicht mehr signifikant. Orlova et al. fanden eine Hochregulation der pre-miR-29b-2 nach einer Stratifizierung ihrer Population. Die Subgruppe wies außerdem neue positive Korrelationen mit den inflammatorischen Mediatoren IL-4, IL-5 und TNF α auf [115]. Die Hochregulation von miR-29b bei CRPS kann auch als eine Folge des proinflammatorischen Zustands erklärt werden. TNF α besitzt eine induktive Wirkung auf die Expression von miR-

29b [197]. Allerdings weist miR-29b nicht immer einen proportionalen Verlauf zum Entzündungsgeschehen auf [198].

Ohne weiterführende Untersuchungen eignet sich die Untersuchung der Expression zirkulierender miRNAs im Plasma vor allem zur Identifikation von potenziellen Biomarkern. Eine Interpretation aus pathophysiologischer Sicht stellt hingegen eine Herausforderung dar. Anders als bei den Exosomen ist eine definitive Ermittlung des zellulären Ursprungs plasmatischer miRNAs nicht möglich. Der Großteil plasmatischer miRNAs liegt nicht-vesikelgebunden beziehungsweise in einer Verbindung mit AGO-Proteinen vor [96, 97]. Die Zusammensetzung der verschiedenen AGO-Proteine weist darauf hin, dass der Hauptteil der frei zirkulierenden miRNAs aus Zellen verschiedener Körpergewebe stammt, wohingegen Blutzellen eine untergeordnete Rolle einnehmen [199]. Weder der Exportmechanismus noch die Existenz spezifischer Regulationsmechanismen konnten bisher abschließend geklärt werden. Eine wichtige Stellung nehmen vermutlich Apoptoseprozesse bei der Freisetzung freier miRNAs ein [96]. Bei Erkrankungen mit erhöhter entzündlicher Aktivität wie CRPS kann es durch eine verstärkte Apoptose zu einer erhöhten Freisetzung von unspezifischen miRNA kommen. Ein Abgleich zirkulierender miRNAs mit inflammatorischen Mediatoren, wie bei Orlova et al., könnte bei der Interpretation von miRNAs im Rahmen von Entzündungsreaktionen hilfreich sein [115].

4.3.3 Expression in den Leukozyten

Zuletzt erfolgte die Untersuchung des miRNA-Profiles von Leukozyten, welche bei CRPS bisher noch nicht durchgeführt wurde. Der Stellenwert der Leukozyten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des CRPS konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Während die Gesamtleukozytenzahl im Vergleich mit gesunden Kontrollen nicht abweicht, weisen CRPS-Patienten im peripheren Blut Veränderungen einzelner leukozytärer Subpopulationen und abweichende Zytokinprofile auf [38, 200]. Diese Beobachtungen trugen zur Erwägung einer autoimmunologischen Teilpathologie des CRPS bei. Die Dysregulation des leukozytären miRNA-Profiles ist ein häufiges Merkmal autoimmuner Erkrankungen, sodass eine Dysregulation des leukozytären miRNA-Profiles beim CRPS als denkbar erschien. In unserer Kohorte fanden sich in den Leukozyten bei miR-183, -21 und -29b keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Anders als die meisten

autoimmunologischen Erkrankungen entwickelt sich CRPS hauptsächlich nach einem lokalisierten externen Auslöser. Es gibt allerdings auch mehrere Beispiele für die Dysregulation des miRNA-Profiles zirkulierender Leukozyten als Antwort auf lokalisierte Noxen. Bei akutem Schlaganfall wurde vermindertes let7i in den Leukozyten des peripheren Bluts nachgewiesen [201]. Beim akuten Myokardinfarkt konnte in den Monozyten eine erhöhte Expression einer Reihe von miRNAs festgestellt werden [202]. Dabei sollte allerdings bedacht werden, dass Veränderungen des leukozytären miRNA-Spektrums in diesen Beispielen vor allem in akuten Erkrankungsphasen auftreten. Daher zeigten die CRPS-Patienten in der Korrelation bei allen miRNAs (speziell miR-183) eine Tendenz zur abfallenden Expression mit einer zunehmenden Schmerzdauer (**Tabelle 4 Anhang**). Deshalb kann man eine weitgehende Normalisierung des leukozytären miRNA-Profiles bei Patienten mit einem längeren Krankheitsverlauf annehmen. Weiterhin gilt es zu bedenken, dass die Leukozyten bei CRPS einen Tropismus zur betroffenen Seite aufweisen. So reichern sich die Leukozyten im akuten Stadium unabhängig von der Subpopulation in der betroffenen Extremität an [203]. Makrophagen infiltrieren nach einer Differenzierung in einen proinflammatorischen Phänotyp in DRGs, wo sie zu einer Sensibilisierung und einer gesteigerten Nozizeption beitragen [138]. Deshalb befinden sich die Leukozyten mit dem potenziell am stärksten veränderten miRNA-Gehalt möglicherweise nicht in der freien Zirkulation und können daher eventuell nicht im peripheren Blut erfasst werden.

4.3.4 Einfluss von Alter und Geschlecht

Als Limitation der Arbeit kann man die abweichende Alters- und Geschlechtsverteilung der FK-Gruppe gegenüber den beiden Vergleichsgruppen anführen. Die FK waren im Durchschnitt 9,8 Jahre jünger als die CRPS-Patienten und 10,3 Jahre jünger als die Kontrollen ohne Trauma. Außerdem lag der Anteil der weiblichen Probanden bei den FK bei 45%, während der Frauenanteil in den beiden anderen Gruppen 80% ausmachte.

Diese Unterschiede beruhen auf einer erschwerten Rekrutierbarkeit dieser Patientengruppe. Durch die Einschränkung auf Patienten mit einem vorangegangenen Trauma der oberen Extremität ergibt sich ein reduziertes rekrutierbares Patientenkollektiv. Eine Erweiterung durch die Aufnahme von Patienten mit Verletzungen der unteren Gliedmaßen

ist wegen der niedrigeren Prävalenz des CRPS bei dieser Lokalisation nur in einem eingeschränkten Maße möglich. Hinsichtlich des fehlenden Eigennutzens und der zurückliegenden Krankenhausbindung haben die Patienten oft keine Motivation für weitere Untersuchungen im Rahmen einer Studie. Außerdem weist das Klientel von Universitätskliniken im Vergleich mit gesunden Probanden häufig Vorerkrankungen und eine Polymedikation auf, wodurch eine Einschließung in Studien erschwert wird.

Um dem verfälschenden Einfluss der abweichenden Alters- und Geschlechtszusammensetzung der FK-Gruppe entgegenzuwirken, wurde eine Adjustierung durch multiple lineare Regression on ranks durchgeführt. Dabei konnte für miR-29b, -144 und -183 in den Exosomen eine negative Korrelation mit dem Alter nachgewiesen werden. miR-183 in den Exosomen war außerdem mit einer verstärkten Expression bei Männern assoziiert, während miR-21 im Plasma tendenziell bei Frauen stärker exprimiert wurde.

Die Expression von miRNAs, die auf dem X-Chromosom codiert werden oder einem regulatorischen Einfluss der Sexualhormone unterliegen, kann verstärkt durch das Geschlecht beeinflusst werden. In einer bioinformatischen Studie von Cui et al. wurden in mehreren Geweben jeweils mehr als 500 miRNAs auf geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht [204]. Darunter waren auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten miR-183, -21, -29b, -144-5p und 223-5p eingeschlossen. Dabei zeigte sich nur miR-144 im peripheren Blut der Männer als verstärkt exprimiert. Auch in unserem Kollektiv war in der Regression das männliche Geschlecht mit einer erhöhten Expression von miR-144 assoziiert, allerdings ohne statistische Signifikanz (**Tabelle 4**). Bei den anderen miRNAs konnten Cui et al. im Blut keine geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellen. In dieser Studie wurden allerdings nur Blutproben von gesunden Individuen analysiert. Aber auch im Rahmen von einzelnen Krankheiten wurde bereits eine geschlechtsspezifische Regulation aufgezeigt. So konnte in einem murinen Tiermodell für systemischen *Lupus erythematoses* eine östrogenbedingte Hochregulation bei weiblichen Mäusen nachgewiesen werden [205]. Bei unserer Kohorte waren stattdessen die Männer signifikant mit einer erhöhten Expression in den Exosomen assoziiert (**Tabelle 4**). Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten durch die unterschiedliche Pathophysiologie und durch Speziesunterschiede erklären.

Bei der Expression von miRNAs, die an Wachstums- beziehungsweise an Degenerationsprozessen beteiligt sind, kann das Alter einen verstärkten Einfluss ausüben. Mehrfach

wurden bereits Microarray-basierte Studien zur Identifizierung von miRNAs durchgeführt, die einer solchen Einwirkung unterliegen [206-208]. Dadurch konnte eine Altersabhängigkeit mehrerer miRNAs, wie miR-103, -107 und -24, mehrfach bestätigt werden. Für viele andere miRNA-Spezies konnten einzelne Studien einen Einfluss des Alters auf die Expression nachweisen, der in anderen Studien nicht reproduziert werden konnte. Diese widersprüchliche Datenlage basiert auf Unterschieden bei den untersuchten Geweben, den Gruppengrößen und willkürlich gewählten Altersgrenzen bei den Versuchsgruppen. Von den hier analysierten miRNAs konnten Noren Hooten et al. eine Erhöhung von miR-21 im Serum der älteren Untersuchungsgruppe zeigen [208]. Die Korrelation ergab jedoch keine signifikante Assoziation zwischen der miR-21 Expression und dem Lebensalter. ElSharawy fand demgegenüber eine Herabregulation der Expression von miR-183, -21 und miR-144-5p [207], wobei allerdings die ältere Gruppe einen Altersdurchschnitt von 96 Jahren aufwies. Es handelte sich hier also um ein außergewöhnliches Patientengut, sodass diese Daten nicht ohne weiteres verallgemeinert werden sollten.

miR-183 wurde bereits im Zusammenhang mit Degeneration beschrieben [209], sie galt allerdings im Plasma unabhängig vom Alter als stabil exprimiert [210]. Auch in der vorliegenden Arbeit unterlag miR-183 in den Plasmaproben nur einer geringen Beeinflussung. In den Exosomen zeigte miR-183 hingegen eine mit dem Alter verbundene Herabregulation. Demgegenüber wurde in den Exosomen im höheren Alter bereits eine Hochregulation von miR-183 beschrieben, die mit einer verminderten Differenzierung von Knochenmarksstammzellen und einer Knochendemineralisierung verbunden war [211]. Diese widersprüchliche Tendenz kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass die Analyse an Exosomen zellulären Ursprungs von Mäusen durchgeführt wurde. So wurde bei Mäusen eine altersbedingte Hochregulation von miR-29b in Exosomen aus Knochenmarksstammzellen beschrieben, während in unserer Kohorte die Expression mit dem Alter abnahm [212]. Untersuchungen von miR-144 im Plasma konnten wiederholt keine relevanten Auswirkungen des Alters auf die Expression aufzeigen [213, 214]. In Exosomen konnte später, ähnlich wie in dieser Arbeit, eine altersbedingte Herabregulation in einer Kohorte gesunder Probandinnen nachweisen werden [215].

Beim CRPS bestehen eine erheblich ungleiche Geschlechterverteilung und eine steigende Erkrankungswahrscheinlichkeit im höheren Alter [19, 20]. Eine alters- oder geschlechts-

abhängige miRNA-Expression könnte eine mögliche Erklärung für diese Phänomene liefern. Allerdings kann keine einheitliche Aussage über den Einfluss von Alter und Geschlecht auf die miRNA-Expression gemacht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die seither veröffentlichten Studien weisen darauf hin, dass diese Beeinflussung sehr viel komplexer ist als ursprünglich angenommen wurde. Denn neben der Art der miRNA hängt das Ausmaß des Effekts von Alter und Geschlecht u. a. auch vom untersuchten Gewebe und der Pathophysiologie von zugrundeliegenden Erkrankungen ab. Bei den Exosomen kann man annehmen, dass der Einfluss zusätzlich erhöht wird, da Alters- und Geschlechtsunterschiede auf die vielfältigen Regulationsmechanismen für Biogenese und Beladung einwirken können. Dadurch ergeben sich Implikationen hinsichtlich des Studiendesigns und der Interpretation der Ergebnisse. Da Frauen wegen ihrer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit in Studienkohorten meist stark überrepräsentiert sind, können die Ergebnisse womöglich nicht ohne weiteres auf männliche Patienten übertragen werden. Außerdem könnte bei der zukünftigen Etablierung von auf miRNAs basierenden Biomarkern für CRPS die Implementierung alters- oder geschlechtsspezifischer Grenzwerte erforderlich sein.

5 Zusammenfassung

CRPS ist eine anhaltende Schmerzerkrankung, die nach Verletzungen auftritt und mit einer variierenden Kombination von Symptomen aus den Bereichen Sensorik, Vasomotorik, Sudomotorik/Ödemen und Motorik verbunden ist. Die Physiologie des Krankheitsbildes ist nicht abschließend geklärt, allerdings wird eine komplexe Interaktion mehrerer Pathomechanismen als Ursache angenommen. Deshalb stellt das CRPS sowohl eine diagnostische als auch eine therapeutische Herausforderung dar. miRNAs sind kurze, einsträngige und nicht-codierende RNAs, die durch Inhibierung der Translation und Degradierung von mRNAs an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt sind. Sie werden auch von den Zellen durch Exosomen, Mikrovesikel, Lipoproteine und Apoptose freigesetzt, sodass sie in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können. Bei vielen Erkrankungen kann eine Dysregulation der miRNA-Expression festgestellt werden, weshalb großes Interesse daran besteht, sie als Biomarker oder für therapeutische Ansätze nutzbar zu machen. Die miRNAs miR-183, -21, -29b, -144, -223 wurden bereits im Zusammenhang mit entzündlichen und neuropathischen Prozessen und der Disruption von Immunbarrieren beschrieben. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bei der Expression dieser miRNAs im Blut von CRPS-Patienten, Patienten mit einem komplikationslosen posttraumatischen Heilungsverlauf und von Kontrollen ohne ein vorangegangenes Trauma Unterschiede bestehen. Die Messungen erfolgten im Plasma, in Leukozyten und Exosomen, um dadurch auch die Regulation in den einzelnen Blutkomponenten vergleichen zu können.

Tatsächlich fanden sich unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile bei den verschiedenen Biomaterialien. Außerdem konnte bei einzelnen miRNAs ein Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Expression nachgewiesen werden. Diese Beeinflussung war darüber hinaus auch abhängig vom untersuchten Biomaterial und vor allem bei den Exosomen besonders ausgeprägt. In den Exosomen ergab sich eine signifikante Hochregulation von miR-223-5p bei den FK im Vergleich mit den CRPS-Patienten. Bei der Zusammenfassung der Daten von CRPS und FK fand sich außerdem eine negative Korrelation zwischen der miR-223-5p-Expression und dem CSS, sodass ein erhöhtes Expressionsniveau mit einer mildereren Krankheitsausbildung verbunden war. Hinsichtlich der traumanaiven Kontrollen war das Expressionsniveau der CRPS-Patienten hingegen unverändert. Diese

Ergebnisse weisen darauf hin, dass beim CRPS im Vergleich mit einem regelrechten Heilungsverlauf eine insuffiziente beziehungsweise ausbleibende posttraumatische Anpassung des miRNA-Spektrums vorliegt. Diese posttraumatische Regulation stellt eventuell eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf eines komplikationslosen Heilungsprozesses dar. Für miR-223-5p wurde bereits mehrfach eine antiinflammatorische Wirkung durch die Regulation von proinflammatorischen Rezeptoren und die Beeinflussung der Differenzierung von Makrophagen beschrieben. Eine verminderte Expression könnte somit zu einer Disposition für überschießende Entzündungsreaktionen führen und dadurch zur Entwicklung von CRPS beitragen.

Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung zirkulierender und vor allem exosomaler miRNAs bei der Pathophysiologie des CRPS hin. Zur weiterführenden Abklärung der pathophysiologischen Relevanz von miR-223-5p sind jedoch zusätzliche Untersuchungen erforderlich. Dabei bleibt es zu prüfen, ob eine verminderte miR-223-5p-Expression mit verstärkten Entzündungsmarkern und einer verstärkten proinflammatorischen Differenzierung von Makrophagen verbunden ist. Eine Abklärung der Herkunft der Exosomen könnte dabei helfen, zwischen einer lokalen und einer systemischen Reaktion zu unterscheiden. Die Beantwortung dieser Fragen könnte zu einem besseren Verständnis beitragen, warum manche Patienten nach einem Extremitätentrauma ein CRPS entwickeln und keinen normalen Heilungsverlauf erfahren.

6 Summary

CRPS is a lasting pain condition, which appears after an injury and manifests as a varying combination of sensoric, vasomotoric, sudomotoric/edema and motoric symptoms. The physiology of CRPS is not fully understood since there is a complex interaction of several possible underlying pathomechanisms. Therefore, CRPS presents a diagnostic as well as a therapeutic challenge. miRNAs are short, single-stranded, non-coding RNAs, which are involved in the posttranscriptional regulation of gene expression by inhibiting the translation and causing the degradation of mRNA. They can be exported by the cells using exosomes, microvesicles, lipoproteins and apoptosis. Extracellular miRNAs can be found in several in different body fluids. Dysregulation of miRNA-expression has been found in several diseases, causing an interest to utilize them as biomarkers or for therapeutic applications. The miRNAs miR-183, -21, -29b, -144 and -223 have been described in inflammatory and neuropathic processes as well as disruption of immunobarriers. This work investigated, if there is a difference in the expression of these miRNAs in the blood of CRPS patients, patients with a normal posttraumatic recovery and controls without trauma. miRNAs were measured in plasma, leukocytes and exosomes to additionally compare these blood components.

Indeed, the biomaterials showed differing miRNA-expression profiles. The expression also showed to be influenced by age and gender, especially in exosomes. In exosomes upregulation of miR-223-5p was found in fracture controls compared to CRPS patients. When combining the data of CRPS patients and fracture controls there was a negative correlation between miR-223-5p-expression and the CSS, associating higher expression with a less severe presentation of CRPS. Compared to controls without preceding injury, there was no difference in expression levels. This suggests an insufficient or missing posttraumatic adaptation of miRNA-expression in CRPS compared to normal healing. This adaptation might be an important prerequisite for a regular recovery process. miR-223-5p has been described to elicit anti-inflammatory effects by regulating proinflammatory receptors and promoting macrophage polarisation. A reduced expression might therefore lead to a susceptibility to excessive inflammatory and thereby facilitate the development of CRPS.

These findings point to contribution of especially exosomal miRNAs to the pathophysiology of CRPS. To further examine the pathophysiological relevance of miR-223-5p additional investigations are required. Measuring inflammatory mediators could show, if reduced miR-223-5p is associated with a heightened inflammatory state. Determining the origin of the blood-borne exosomes would help in differentiating between a local or systemic response. Answering those questions might help in understanding, why some people develop CRPS instead of experiencing a normal healing process.

7 Literaturverzeichnis

1. Merskey, H. and N. Bogduk, *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*. 1994: IASP Press.
2. Mitchell, S.W., G.R. Morehouse, and W.W. Keen, *Gunshot wounds and other injuries of nerves. 1864*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **458**: p. 35-9.
3. Sudeck, P., *On acute inflammatory bone atrophy*. J Hand Surg Br, 1900. **30**(5): p. 477-81.
4. Leriche, R., *De la causalgie envisagée comme une névrite du sympathique et de son traitement par la dénudation et l'excision des plexus nerveux péri-artériels* Presse Med, 1916. **24**: p. 178-80.
5. Evans, J.A., *Reflex sympathetic dystrophy; report on 57 cases*. Ann Intern Med, 1947. **26**(3): p. 417-26.
6. Galer, B.S., S. Bruehl, and R.N. Harden, *IASP diagnostic criteria for complex regional pain syndrome: a preliminary empirical validation study*. International Association for the Study of Pain. Clin J Pain, 1998. **14**(1): p. 48-54.
7. Bruehl, S., et al., *External validation of IASP diagnostic criteria for Complex Regional Pain Syndrome and proposed research diagnostic criteria*. International Association for the Study of Pain. Pain, 1999. **81**(1-2): p. 147-54.
8. Harden, R.N., et al., *Development of a severity score for CRPS*. Pain, 2010. **151**(3): p. 870-6.
9. Harden, R.N., et al., *Validation of proposed diagnostic criteria (the "Budapest Criteria") for Complex Regional Pain Syndrome*. Pain, 2010. **150**(2): p. 268-74.
10. Birklein, F., *Diagnostik und Therapie komplexer regionaler Schmerzsyndrome (CRPS), S1-Leitlinie, 2018*, in *Deutsche Gesellschaft für Neurologie*. 2018: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (zugegriffen am 22.11.2018).
11. Veldman, P.H., et al., *Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients*. Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1012-6.
12. Wuppenhorst, N., et al., *Sensitivity and specificity of 3-phase bone scintigraphy in the diagnosis of complex regional pain syndrome of the upper extremity*. Clin J Pain, 2010. **26**(3): p. 182-9.
13. Wertli, M.M., et al., *Usefulness of bone scintigraphy for the diagnosis of Complex Regional Pain Syndrome 1: A systematic review and Bayesian meta-analysis*. PLoS One, 2017. **12**(3): p. e0173688.
14. Krumova, E.K., et al., *Long-term skin temperature measurements - a practical diagnostic tool in complex regional pain syndrome*. Pain, 2008. **140**(1): p. 8-22.
15. Maihöfner, C. and F. Birklein, *Komplex regionale Schmerzsyndrome: Neues zu Pathophysiologie und Therapie*. Fortschr Neurol Psychiatr, 2007. **75**(06): p. 331-342.
16. Borchers, A.T. and M.E. Gershwin, *Complex regional pain syndrome: a comprehensive and critical review*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(3): p. 242-65.
17. Birklein, F., et al., *Complex regional pain syndrome - phenotypic characteristics and potential biomarkers*. Nat Rev Neurol, 2018. **14**(5): p. 272-284.
18. Sandroni, P., et al., *Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study*. Pain, 2003. **103**(1-2): p. 199-207.
19. de Mos, M., et al., *The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study*. Pain, 2007. **129**(1-2): p. 12-20.
20. Beerthuizen, A., et al., *Demographic and medical parameters in the development of complex regional pain syndrome type I (CRPSI): prospective study on 596 patients with a fracture*. Pain, 2012. **153**(6): p. 1187-92.
21. Shariatzadeh, H. and M. Mujeb Mohseni, *Incidence of Complex Regional Pain Syndrome Following the Carpal Tunnel Release Surgery*. Shafa Ortho J, 2017. **4**(4): p. e61152.

22. de Rooij, A.M., et al., *Spontaneous onset of complex regional pain syndrome*. Eur J Pain, 2010. **14**(5): p. 510-3.
23. Allen, G., B.S. Galer, and L. Schwartz, *Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients*. Pain, 1999. **80**(3): p. 539-44.
24. Birklein, F., et al., *Neurological findings in complex regional pain syndromes--analysis of 145 cases*. Acta Neurol Scand, 2000. **101**(4): p. 262-9.
25. Gierthmuhlen, J., et al., *Sensory signs in complex regional pain syndrome and peripheral nerve injury*. Pain, 2012. **153**(4): p. 765-74.
26. Bruehl, S., et al., *Complex regional pain syndrome: evidence for warm and cold subtypes in a large prospective clinical sample*. Pain, 2016. **157**(8): p. 1674-81.
27. Birklein, F., et al., *Pattern of autonomic dysfunction in time course of complex regional pain syndrome*. Clin Auton Res, 1998. **8**(2): p. 79-85.
28. Moseley, G.L., *Distorted body image in complex regional pain syndrome*. Neurology, 2005. **65**(5): p. 773.
29. Frettlöh, J., M. Huppe, and C. Maier, *Severity and specificity of neglect-like symptoms in patients with complex regional pain syndrome (CRPS) compared to chronic limb pain of other origins*. Pain, 2006. **124**(1-2): p. 184-9.
30. Parkitny, L., et al., *Inflammation in complex regional pain syndrome: a systematic review and meta-analysis*. Neurology, 2013. **80**(1): p. 106-17.
31. Grossman, R.M., et al., *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6367-71.
32. Kingery, W.S., *Role of neuropeptide, cytokine, and growth factor signaling in complex regional pain syndrome*. Pain Med, 2010. **11**(8): p. 1239-50.
33. Postlethwaite, A.E., L.B. Lachman, and A.H. Kang, *Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(9): p. 995-1001.
34. Kramer, H.H., et al., *Osteoprotegerin: a new biomarker for impaired bone metabolism in complex regional pain syndrome?* Pain, 2014. **155**(5): p. 889-95.
35. Schlereth, T., et al., *Peripheral amplification of sweating--a role for calcitonin gene-related peptide*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 3): p. 823-32.
36. Ribbers, G.M., et al., *Reflex sympathetic dystrophy: is the immune system involved?* Arch Phys Med Rehabil, 1998. **79**(12): p. 1549-52.
37. van de Beek, W.J., et al., *Innate cytokine profile in patients with complex regional pain syndrome is normal*. Pain, 2001. **91**(3): p. 259-61.
38. Ritz, B.W., et al., *Elevated blood levels of inflammatory monocytes (CD14+ CD16+) in patients with complex regional pain syndrome*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(1): p. 108-17.
39. Uceyler, N., et al., *Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome*. Pain, 2007. **132**(1-2): p. 195-205.
40. Blair, S.J., et al., *Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy*. Acta Orthop Belg, 1998. **64**(4): p. 448-51.
41. Schinkel, C., et al., *Systemic inflammatory mediators in post-traumatic complex regional pain syndrome (CRPS I) - longitudinal investigations and differences to control groups*. Eur J Med Res, 2009. **14**(3): p. 130-5.
42. Birklein, F., et al., *Activation of cutaneous immune responses in complex regional pain syndrome*. J Pain, 2014. **15**(5): p. 485-95.
43. Kramer, H.H., et al., *TNF-alpha in CRPS and 'normal' trauma--significant differences between tissue and serum*. Pain, 2011. **152**(2): p. 285-90.
44. Lenz, M., et al., *Local cytokine changes in complex regional pain syndrome type I (CRPS I) resolve after 6 months*. Pain, 2013. **154**(10): p. 2142-9.

45. Wesseldijk, F., et al., *Six years follow-up of the levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with complex regional pain syndrome type I*. Mediators Inflamm, 2008. **2008**: p. 469439.
46. Munnikes, R.J., et al., *Intermediate stage complex regional pain syndrome type I is unrelated to proinflammatory cytokines*. Mediators Inflamm, 2005. **2005**(6): p. 366-72.
47. Birklein, F., D. O'Neill, and T. Schlereth, *Complex regional pain syndrome: An optimistic perspective*. Neurology, 2015. **84**(1): p. 89-96.
48. David Clark, J., et al., *Autoinflammatory and autoimmune contributions to complex regional pain syndrome*. Mol Pain, 2018. **14**: p. 1744806918799127.
49. Cuhadar, U., et al., *Autoantibodies produce pain in complex regional pain syndrome by sensitizing nociceptors*. Pain, 2019.
50. Helyes, Z., et al., *Transfer of complex regional pain syndrome to mice via human autoantibodies is mediated by interleukin-1-induced mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(26): p. 13067-13076.
51. Oaklander, A.L., *Role of minimal distal nerve injury in complex regional pain syndrome-I*. Pain Med, 2010. **11**(8): p. 1251-6.
52. Huge, V., et al., *Complex Interaction of Sensory and Motor Signs and Symptoms in Chronic CRPS*. PLOS ONE, 2011. **6**(4): p. e18775.
53. Knudsen, L.F., et al., *Complex regional pain syndrome: a focus on the autonomic nervous system*. Clin Auton Res, 2019. **29**(4): p. 457-467.
54. Finch, P.M., et al., *Up-regulation of cutaneous alpha1-adrenoceptors in complex regional pain syndrome type I*. Pain Med, 2014. **15**(11): p. 1945-56.
55. Arnold, J.M., et al., *Increased venous alpha-adrenoceptor responsiveness in patients with reflex sympathetic dystrophy*. Ann Intern Med, 1993. **118**(8): p. 619-21.
56. Drummond, P.D., et al., *Complex regional pain syndrome: intradermal injection of phenylephrine evokes pain and hyperalgesia in a subgroup of patients with upregulated alpha1-adrenoceptors on dermal nerves*. Pain, 2018. **159**(11): p. 2296-2305.
57. Punt, T.D., et al., *Neglect-like symptoms in complex regional pain syndrome: learned nonuse by another name?* Pain, 2013. **154**(2): p. 200-3.
58. Maihöfner, C., et al., *Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome*. Neurology, 2003. **61**(12): p. 1707-1715.
59. Geha, P.Y., et al., *The brain in chronic CRPS pain: abnormal gray-white matter interactions in emotional and autonomic regions*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 570-81.
60. de Rooij, A.M., et al., *Familial occurrence of complex regional pain syndrome*. Eur J Pain, 2009. **13**(2): p. 171-7.
61. Shirani, P., et al., *Familial occurrence of complex regional pain syndrome*. Can J Neurol Sci, 2010. **37**(3): p. 389-94.
62. van Hilten, J.J., W.J. van de Beek, and B.O. Roep, *Multifocal or generalized tonic dystonia of complex regional pain syndrome: a distinct clinical entity associated with HLA-DR13*. Ann Neurol, 2000. **48**(1): p. 113-6.
63. de Rooij, A.M., et al., *HLA-B62 and HLA-DQ8 are associated with Complex Regional Pain Syndrome with fixed dystonia*. Pain, 2009. **145**(1-2): p. 82-5.
64. Beerthuisen, A., et al., *Is there an association between psychological factors and the Complex Regional Pain Syndrome type I (CRPS1) in adults? A systematic review*. Pain, 2009. **145**(1-2): p. 52-9.
65. Speck, V., et al., *Increased prevalence of posttraumatic stress disorder in CRPS*. Eur J Pain, 2017. **21**(3): p. 466-473.
66. Margalit, D., et al., *Complex regional pain syndrome, alexithymia, and psychological distress*. J Psychosom Res, 2014. **77**(4): p. 273-7.
67. Bean, D.J., et al., *Do psychological factors influence recovery from complex regional pain syndrome type I? A prospective study*. Pain, 2015. **156**(11): p. 2310-8.

68. Oerlemans, H.M., et al., *Pain and reduced mobility in complex regional pain syndrome I: outcome of a prospective randomised controlled clinical trial of adjuvant physical therapy versus occupational therapy*. Pain, 1999. **83**(1): p. 77-83.
69. den Hollander, M., et al., *Expose or protect? A randomized controlled trial of exposure in vivo vs pain-contingent treatment as usual in patients with complex regional pain syndrome type I*. Pain, 2016. **157**(10): p. 2318-29.
70. McCabe, C.S., et al., *A controlled pilot study of the utility of mirror visual feedback in the treatment of complex regional pain syndrome (type I)*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(1): p. 97-101.
71. Kumowski, N., et al., *Short-Term Glucocorticoid Treatment Normalizes the Microcirculatory Response to Remote Ischemic Conditioning in Early Complex Regional Pain Syndrome*. Pain Pract, 2019. **19**(2): p. 168-175.
72. Sigtermans, M.J., et al., *Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type I*. Pain, 2009. **145**(3): p. 304-11.
73. van de Vusse, A.C., et al., *Randomised controlled trial of gabapentin in Complex Regional Pain Syndrome type I [ISRCTN84121379]*. BMC Neurol, 2004. **4**: p. 13.
74. Schlereth, T., *Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie, 2019*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2019.
75. Varenna, M., et al., *Treatment of complex regional pain syndrome type I with neridronate: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Rheumatology, 2012. **52**(3): p. 534-542.
76. O'Connell, N.E., et al., *Local anaesthetic sympathetic blockade for complex regional pain syndrome*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **7**: p. Cd004598.
77. Deer, T.R., et al., *Dorsal root ganglion stimulation yielded higher treatment success rate for complex regional pain syndrome and causalgia at 3 and 12 months: a randomized comparative trial*. PAIN, 2017. **158**(4): p. 669-681.
78. Bodde, M.I., et al., *Therapy-resistant complex regional pain syndrome type I: to amputate or not?* J Bone Joint Surg Am, 2011. **93**(19): p. 1799-805.
79. Bruehl, S. and O.Y. Chung, *Psychological and behavioral aspects of complex regional pain syndrome management*. Clin J Pain, 2006. **22**(5): p. 430-7.
80. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
81. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
82. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
83. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-524.
84. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
85. Ji, Y., J.D. Hocker, and L. Gattinoni, *Enhancing adoptive T cell immunotherapy with microRNA therapeutics*. Semin Immunol, 2016. **28**(1): p. 45-53.
86. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
87. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
88. Jonas, S. and E. Izaurralde, *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(7): p. 421-33.
89. Kulkarni, M., S. Ozgur, and G. Stoecklin, *On track with P-bodies*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 242-51.
90. Vasudevan, S., *Posttranscriptional upregulation by microRNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(3): p. 311-30.

91. Thery, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 569-79.
92. Vickers, K.C. and A.T. Remaley, *Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(2): p. 91-7.
93. Mause, S.F. and C. Weber, *Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange*. Circ Res, 2010. **107**(9): p. 1047-57.
94. Zerneck, A., et al., *Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection*. Sci Signal, 2009. **2**(100): p. ra81.
95. Tabet, F., et al., *HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3292.
96. Turchinovich, A., et al., *Characterization of extracellular circulating microRNA*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(16): p. 7223-33.
97. Wang, K., et al., *Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(20): p. 7248-59.
98. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
99. Boon, R.A. and K.C. Vickers, *Intercellular transport of microRNAs*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(2): p. 186-92.
100. Trams, E.G., et al., *Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1981. **645**(1): p. 63-70.
101. Johnstone, R.M., et al., *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J Biol Chem, 1987. **262**(19): p. 9412-20.
102. Groot, M. and H. Lee, *Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases*. Cells, 2020. **9**(4).
103. Villarroya-Beltri, C., et al., *Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2980.
104. McKenzie, A.J., et al., *KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes*. Cell Rep, 2016. **15**(5): p. 978-987.
105. Khan, A.Q., et al., *Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies*. Cells, 2019. **8**(8).
106. Chakraborty, C., et al., *Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update*. J Adv Res, 2021. **28**: p. 127-138.
107. Janssen, H.L., et al., *Treatment of HCV infection by targeting microRNA*. N Engl J Med, 2013. **368**(18): p. 1685-94.
108. Beg, M.S., et al., *Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors*. Invest New Drugs, 2017. **35**(2): p. 180-188.
109. Bai, G., et al., *Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain*. Mol Pain, 2007. **3**: p. 15.
110. Zhao, J., et al., *Small RNAs control sodium channel expression, nociceptor excitability, and pain thresholds*. J Neurosci, 2010. **30**(32): p. 10860-71.
111. Dai, Z., et al., *The Regulatory Mechanisms and Therapeutic Potential of MicroRNAs: From Chronic Pain to Morphine Tolerance*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2018. **11**(80).
112. Sakai, A. and H. Suzuki, *Emerging roles of microRNAs in chronic pain*. Neurochem Int, 2014. **77**: p. 58-67.
113. Andersen, H.H., M. Duroux, and P. Gazerani, *MicroRNAs as modulators and biomarkers of inflammatory and neuropathic pain conditions*. Neurobiol Dis, 2014. **71**: p. 159-68.
114. Park, C.K., et al., *Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1*. Neuron, 2014. **82**(1): p. 47-54.

115. Orlova, I.A., et al., *MicroRNA modulation in complex regional pain syndrome*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 195.
116. McDonald, M.K., et al., *Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain*. Pain, 2014. **155**(8): p. 1527-39.
117. Ramanathan, S., et al., *Inflammation potentiates miR-939 expression and packaging into small extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2019. **8**(1): p. 1650595.
118. Douglas, S.R., et al., *Analgesic Response to Intravenous Ketamine Is Linked to a Circulating microRNA Signature in Female Patients With Complex Regional Pain Syndrome*. J Pain, 2015. **16**(9): p. 814-24.
119. Shenoda, B.B., G.M. Alexander, and S.K. Ajit, *Hsa-miR-34a mediated repression of corticotrophin releasing hormone receptor 1 regulates pro-opiomelanocortin expression in patients with complex regional pain syndrome*. J Transl Med, 2016. **14**: p. 64.
120. Ramanathan, S., et al., *Exosome microRNA signatures in patients with complex regional pain syndrome undergoing plasma exchange*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 81.
121. Yang, S., et al., *Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier*. Biomaterials, 2016. **82**: p. 20-33.
122. Ge, X., et al., *MiR-21 alleviates secondary blood-brain barrier damage after traumatic brain injury in rats*. Brain Res, 2015. **1603**: p. 150-7.
123. Zhou, Q., et al., *MicroRNA 29 targets nuclear factor-kappaB-repressing factor and Claudin 1 to increase intestinal permeability*. Gastroenterology, 2015. **148**(1): p. 158-169.e8.
124. Reinhold, A.K. and H.L. Rittner, *Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review*. Pflugers Arch, 2017. **469**(1): p. 123-134.
125. Cai, H., et al., *The long noncoding RNA TUG1 regulates blood-tumor barrier permeability by targeting miR-144*. Oncotarget, 2015. **6**(23): p. 19759-79.
126. Neudecker, V., et al., *Neutrophil transfer of miR-223 to lung epithelial cells dampens acute lung injury in mice*. Sci Transl Med, 2017. **9**(408).
127. Banks, S.A., M.L. Pierce, and G.A. Soukup, *Sensational MicroRNAs: Neurosensory Roles of the MicroRNA-183 Family*. Mol Neurobiol, 2020. **57**(1): p. 358-371.
128. Aldrich, B.T., et al., *Changes in expression of sensory organ-specific microRNAs in rat dorsal root ganglia in association with mechanical hypersensitivity induced by spinal nerve ligation*. Neuroscience, 2009. **164**(2): p. 711-23.
129. Peng, C., et al., *miR-183 cluster scales mechanical pain sensitivity by regulating basal and neuropathic pain genes*. Science, 2017. **356**(6343): p. 1168-1171.
130. Lin, C.R., et al., *Intrathecal miR-183 delivery suppresses mechanical allodynia in mononeuropathic rats*. Eur J Neurosci, 2014. **39**(10): p. 1682-9.
131. Xie, X., et al., *MicroRNA-183 Suppresses Neuropathic Pain and Expression of AMPA Receptors by Targeting mTOR/VEGF Signaling Pathway*. Cell Physiol Biochem, 2017. **41**(1): p. 181-192.
132. Kumarswamy, R., I. Volkmann, and T. Thum, *Regulation and function of miRNA-21 in health and disease*. RNA Biol, 2011. **8**(5): p. 706-13.
133. Feng, Y.H. and C.J. Tsao, *Emerging role of microRNA-21 in cancer*. Biomed Rep, 2016. **5**(4): p. 395-402.
134. Leinders, M., et al., *Aberrant microRNA expression in patients with painful peripheral neuropathies*. J Neurol Sci, 2017. **380**: p. 242-249.
135. Yu, B., et al., *Profile of MicroRNAs following Rat Sciatic Nerve Injury by Deep Sequencing: Implication for Mechanisms of Nerve Regeneration*. PLOS ONE, 2011. **6**(9): p. e24612.
136. Sakai, A. and H. Suzuki, *Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **435**(2): p. 176-81.

137. Karl, F., et al., *Differential Impact of miR-21 on Pain and Associated Affective and Cognitive Behavior after Spared Nerve Injury in B7-H1 ko Mouse*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 219.
138. Simeoli, R., et al., *Exosomal cargo including microRNA regulates sensory neuron to macrophage communication after nerve trauma*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1778.
139. Sheedy, F.J., *Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**(19).
140. Amodio, N., et al., *miR-29s: a family of epi-miRNAs with therapeutic implications in hematologic malignancies*. Oncotarget, 2015. **6**(15): p. 12837-61.
141. Yuan, H., et al., *Hypomethylation of nerve growth factor (NGF) promotes binding of C/EBP α and contributes to inflammatory hyperalgesia in rats*. J Neuroinflammation, 2020. **17**(1): p. 34.
142. Wang, Y., S. Wang, and J.H. He, *Transcriptomic analysis reveals essential microRNAs after peripheral nerve injury*. Neural Regen Res, 2021. **16**(9): p. 1865-1870.
143. Fuller-Carter, P.I., et al., *Integrated analyses of zebrafish miRNA and mRNA expression profiles identify miR-29b and miR-223 as potential regulators of optic nerve regeneration*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 591.
144. Zhang, X., et al., *MiR-29b protects dorsal root ganglia neurons from diabetic rat*. Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(2): p. 1105-11.
145. Rasmussen, K.D., et al., *The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis*. J Exp Med, 2010. **207**(7): p. 1351-8.
146. Zhang, H.Y., et al., *MicroRNAs 144, 145, and 214 are down-regulated in primary neurons responding to sciatic nerve transection*. Brain Res, 2011. **1383**: p. 62-70.
147. Rau, C.S., et al., *Entrapment neuropathy results in different microRNA expression patterns from denervation injury in rats*. BMC Musculoskelet Disord, 2010. **11**: p. 181.
148. Li, J.A., et al., *Key genes expressed in different stages of spinal cord ischemia/reperfusion injury*. Neural Regen Res, 2016. **11**(11): p. 1824-1829.
149. Zhou, G., et al., *Role and mechanism of miR-144-5p in LPS-induced macrophages*. Exp Ther Med, 2020. **19**(1): p. 241-247.
150. Liu, Y., et al., *Modulation of T cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis*. Mol Immunol, 2011. **48**(9-10): p. 1084-90.
151. Johnnidis, J.B., et al., *Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1125-9.
152. Wang, X., et al., *Exosomal miR-223 Contributes to Mesenchymal Stem Cell-Elicited Cardioprotection in Polymicrobial Sepsis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13721.
153. Wang, X., et al., *Loss of duplex miR-223 (5p and 3p) aggravates myocardial depression and mortality in polymicrobial sepsis*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(5): p. 701-11.
154. Gharagozloo, M., et al., *NLR-Dependent Regulation of Inflammation in Multiple Sclerosis*. Frontiers in Immunology, 2018. **8**(2012).
155. Zhan, C., et al., *Macrophage-derived microvesicles promote proliferation and migration of Schwann cell on peripheral nerve repair*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **468**(1-2): p. 343-8.
156. Kaneko, S., et al., *A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord*. Nat Med, 2006. **12**(12): p. 1380-9.
157. Saleh, B., et al., *Local Immunomodulation Using an Adhesive Hydrogel Loaded with miRNA-Laden Nanoparticles Promotes Wound Healing*. Small, 2019. **15**(36): p. e1902232.
158. Yamamoto, K.R., et al., *Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification*. Virology, 1970. **40**(3): p. 734-44.

159. Lewis, G.D. and T.G. Metcalf, *Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples*. Appl Environ Microbiol, 1988. **54**(8): p. 1983-8.
160. Thomas, J. and T. Gemming, *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie - Eine Einführung für den Praktiker*. 2013.
161. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
162. Tan, S.C. and B.C. Yiap, *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 574398.
163. Biosciences, A., *TaqMan® MicroRNA Assays*, A. Biosciences, Editor. 2006.
164. Rice, J., et al., *Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization*. Surgery, 2015. **158**(5): p. 1345-51.
165. Li, Y., et al., *Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma*. Dis Markers, 2015. **2015**: p. 893594.
166. Bliss, S.A., et al., *Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow*. Cancer Research, 2016. **76**(19): p. 5832-5844.
167. Quade, D., *Rank Analysis of Covariance*. Journal of the American Statistical Association, 1967. **62**(320): p. 1187-1200.
168. Rasch, B.H., W.; Naumann, E. *SPSS-Ergänzungen Quantitative Methoden. Band 1 (2. Auflage)*. 2006 08.03.10 [cited 2018 12.12.18].
169. Tukey, J., *Exploratory Data Analysis*. 1977, Reading, Mass. : Addison-Wesley Publishing Company. 688.
170. Williamson, A. and B. Hoggart, *Pain: a review of three commonly used pain rating scales*. J Clin Nurs, 2005. **14**(7): p. 798-804.
171. Bouhassira, D., et al., *Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory*. Pain, 2004. **108**(3): p. 248-57.
172. Sommer, C., et al., *A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI)*. BMC Neurol, 2011. **11**: p. 104.
173. Rocha Rde, O., et al., *Thoracic sympathetic block for the treatment of complex regional pain syndrome type I: a double-blind randomized controlled study*. Pain, 2014. **155**(11): p. 2274-81.
174. Klasen, B.W., et al., *Validation and reliability of the German version of the Chronic Pain Grade questionnaire in primary care back pain patients*. Psychosoc Med, 2004. **1**: p. Doc07.
175. Harden, R.N., et al., *Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome*. Pain Med, 2007. **8**(4): p. 326-31.
176. Harden, R.N., et al., *A prospective, multisite, international validation of the Complex Regional Pain Syndrome Severity Score*. Pain, 2017. **158**(8): p. 1430-1436.
177. Hautzinger, M., F. Keller, and C. Kühner, *BDI II Beck Depressions-Inventar Revision*. 2006, Germany: Pearson.
178. Dietz, C., et al., *What is normal trauma healing and what is complex regional pain syndrome I? An analysis of clinical and experimental biomarkers*. Pain, 2019. **160**(10): p. 2278-2289.
179. McDonald, J.S., et al., *Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges*. Clin Chem, 2011. **57**(6): p. 833-40.
180. Kim, D.J., et al., *Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation*. J Mol Diagn, 2012. **14**(1): p. 71-80.
181. Rice, J., et al., *Assay reproducibility in clinical studies of plasma miRNA*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0121948.

182. Page, K., et al., *Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77963.
183. Helwa, I., et al., *A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0170628.
184. Zhang, M., et al., *Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization*. Small Methods, 2018. **2**(9): p. 1800021.
185. Szatanek, R., et al., *The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
186. Wright, K., et al., *Comparison of methods for miRNA isolation and quantification from ovine plasma*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 825.
187. Pritchard, C.C., H.H. Cheng, and M. Tewari, *MicroRNA profiling: approaches and considerations*. Nature Reviews Genetics, 2012. **13**: p. 358.
188. Soares Martins, T., et al., *Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches*. PLoS One, 2018. **13**(6): p. e0198820.
189. Qu, H., et al., *Aerobic Exercise Inhibits CUMS-Depressed Mice Hippocampal Inflammatory Response via Activating Hippocampal miR-223/TLR4/MyD88-NF- κ B Pathway*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(8).
190. Wen, H., et al., *Plexin-A4-semaphorin 3A signaling is required for Toll-like receptor- and sepsis-induced cytokine storm*. J Exp Med, 2010. **207**(13): p. 2943-57.
191. Sugawara, S., et al., *Dual strands of the miR-223 duplex (miR-223-5p and miR-223-3p) inhibit cancer cell aggressiveness: targeted genes are involved in bladder cancer pathogenesis*. J Hum Genet, 2018. **63**(5): p. 657-668.
192. Qin, D., et al., *MicroRNA-223-5p and -3p Cooperatively Suppress Necroptosis in Ischemic/Reperfused Hearts*. J Biol Chem, 2016. **291**(38): p. 20247-59.
193. Moen, A., et al., *MicroRNA-223 demonstrated experimentally in exosome-like vesicles is associated with decreased risk of persistent pain after lumbar disc herniation*. J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 89.
194. Castro-Villegas, C., et al., *Circulating miRNAs as potential biomarkers of therapy effectiveness in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNFalpha*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 49.
195. Gualerzi, A., et al., *Raman spectroscopy uncovers biochemical tissue-related features of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 9820.
196. Hettne, K.M., et al., *Applied information retrieval and multidisciplinary research: new mechanistic hypotheses in Complex Regional Pain Syndrome*. Journal of Biomedical Discovery and Collaboration, 2007. **2**(1): p. 2.
197. Bu, Y.M., et al., *Abrasive Endoprosthetic Wear Particles Inhibit IFN-gamma Secretion in Human Monocytes Via Upregulating TNF-alpha-Induced miR-29b*. Inflammation, 2017. **40**(1): p. 166-173.
198. Xiao, J., et al., *miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Mol Ther, 2012. **20**(6): p. 1251-60.
199. Turchinovich, A. and B. Burwinkel, *Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma*. RNA Biol, 2012. **9**(8): p. 1066-75.
200. Kaufmann, I., et al., *Lymphocyte Subsets and the Role of Th1/Th2 Balance in Stressed Chronic Pain Patients*. Neuroimmunomodulation, 2007. **14**(5): p. 272-280.
201. Jickling, G.C., et al., *Leukocyte response is regulated by microRNA let7i in patients with acute ischemic stroke*. Neurology, 2016. **87**(21): p. 2198-2205.
202. Li, X.D., et al., *Elevated plasma miRNA-122, -140-3p, -720, -2861, and -3149 during early period of acute coronary syndrome are derived from peripheral blood mononuclear cells*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0184256.
203. Tan, E.C., W.J. Oyen, and R.J. Goris, *Leukocytes in Complex Regional Pain Syndrome type I*. Inflammation, 2005. **29**(4-6): p. 182-6.

204. Cui, C., et al., *Identification and Analysis of Human Sex-biased MicroRNAs*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2018. **16**(3): p. 200-211.
205. Sharma, S. and M. Eghbali, *Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease*. Biol Sex Differ, 2014. **5**(1): p. 3.
206. Noren Hooten, N., et al., *microRNA Expression Patterns Reveal Differential Expression of Target Genes with Age*. PLOS ONE, 2010. **5**(5): p. e10724.
207. ElSharawy, A., et al., *Genome-wide miRNA signatures of human longevity*. Aging Cell, 2012. **11**(4): p. 607-16.
208. Noren Hooten, N., et al., *Age-related changes in microRNA levels in serum*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(10): p. 725-40.
209. Zhang, Q., et al., *Identifying microRNAs involved in degeneration of the organ of corti during age-related hearing loss*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e62786.
210. Zaporozhchenko, I.A., et al., *Plasma miR-19b and miR-183 as Potential Biomarkers of Lung Cancer*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0165261.
211. Davis, C., et al., *MicroRNA-183-5p Increases with Age in Bone-Derived Extracellular Vesicles, Suppresses Bone Marrow Stromal (Stem) Cell Proliferation, and Induces Stem Cell Senescence*. Tissue Eng Part A, 2017. **23**(21-22): p. 1231-1240.
212. Su, T., et al., *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomal MiR-29b-3p Regulates Aging-Associated Insulin Resistance*. ACS Nano, 2019. **13**(2): p. 2450-2462.
213. Meder, B., et al., *Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood*. Clin Chem, 2014. **60**(9): p. 1200-8.
214. Wang, X., et al., *Circulating microRNA-144-5p is associated with depressive disorders*. Clinical Epigenetics, 2015. **7**(1): p. 69.
215. Kangas, R., et al., *Aging and serum exomiR content in women-effects of estrogenic hormone replacement therapy*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42702.

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Demographie und klinische Scores der Gruppen.....	48
Tabelle 2: Korrelation von Alter und Geschlecht mit miRNA-Expression im Plasma.....	51
Tabelle 3: Korrelation von Alter und Geschlecht mit miRNA-Expression in Leukozyten.....	53
Tabelle 4: Korrelation von Alter und Geschlecht mit miRNA-Expression in Exosomen... 	57
Tabelle 5: Ergebnisse der Partialkorrelation von miRNA-Expression in Exosomen mit klinischen Daten von CRPS-Patienten und Frakturkontrollen.	59
Abbildung 1: Biogenese und Funktion von miRNAs	17
Abbildung 2: Freisetzung von miRNAs in den Extrazellulärraum [99].	20
Abbildung 3: Polymerisation des komplementären Strangs.....	38
Abbildung 4: Freisetzung des Reporter-Farbstoffs.	39
Abbildung 5: Ausreißer-Definition.....	42
Abbildung 6: Hochregulation von miR-21 und miR-29b bei CRPS-Patienten im Vergleich zu Frakturkontrollen und keine Unterschiede bei miR-183 im Plasma.....	50
Abbildung 7: Kein signifikanter Unterschied von miR-183, miR-29b und miR-183 im Plasma nach Normalisierung für Alter und Geschlecht.....	51
Abbildung 8: Keine signifikanten Unterschiede bei miR-183, -21 und -29b in Leukozyten.	52
Abbildung 9: Keine Unterschiede bei miR-183, -21 und -29b in Leukozyten nach Adjustierung für Alter und Geschlecht.....	53
Abbildung 10: Exosomen in der TEM.....	54
Abbildung 11: Herunterregulation von mir-183, -144-5p und -223-5p in Exosomen bei CRPS-Patienten im Vergleich mit Frakturkontrollen. Kein Unterschied bei miR-21 und -29b.	56
Abbildung 12: Weiterhin Herunterregulation von miR-223-5p bei CRPS-Patienten im Vergleich mit Frakturkontrollen in Exosomen nach Normalisierung für Alter und Geschlecht. Kein Unterschied bei miR-183, -21, -29b und -144-5p.	57
Abbildung 13 Partialkorrelation von miR-223-5p Expression mit CSS bei CRPS-Patienten und Frakturkontrollen.....	60

Die Abruckgenehmigung für Abbildung 1 wurde vom Elsevier Verlag eingeholt

(Lizenz-Nummer 4877541180049).

Die Abruckgenehmigung für Abbildung 2 wurde vom Wolters Kluwer Health, Inc. eingeholt

(Lizenz-Nummer 4878670809448).

9 Abkürzungsverzeichnis

AGO	Argonaute
BDI II	Beck Depression Inventory II
cDNA	complementary DNA
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CRPS	Complex regional Pain Syndrome
CSS	CRPS Severity Score
CT	Threshold Cycle
DR6	Death Receptor 6
FK	Frakturkontrollen
GCPS	Graded Chronic Pain Scale
HDL	High-density lipoprotein
HKG	Housekeeping-Gene
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IASP	International Association of the Study of Pain
IL	Interleukin
KWT	Kruskal-Wallis-Test
LDL	Low-density lipoprotein
miRNA	microRNA
MVB	Multivesikulärer Körper
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne
NPSI	Neuropathic Pain Symptom Inventory
NRS	Numeric Rating Scale
nt	Nukleotide
PARP-1	Poly-ADP-Polymerase-1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RSD	Reflex Sympathetic Dystrophy
RT	Reverse Transkriptase
Sema 3a	Semaphorin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	Tumor Groth factor β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor

10 Anhang

10.1 Korrelation von CRPS-Patienten und Frakturkontrollen

10.1.1 Plasma

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	-0,15	-0,22	-0,29	-0,17	-0,23	-0,17	-0,15	-0,27	-0,33^S
P Wert	0,34	0,15	0,06	0,27	0,12	0,26	0,34	0,07	0,03
n	44	44	44	44	45	45	45	46	46
miR-21	0,07	0,07	0,06	-0,13	-0,14	0,08	0,16	0,11	0,04^S
P Wert	0,67	0,65	0,71	0,41	0,35	0,58	0,30	0,47	0,77
n	44	44	44	44	45	46	46	46	46
miR-29b	0,06^S	0,07^S	-0,02^S	0,03^S	-0,05^S	0,03^S	0,17^S	0,16^S	0,04^S
P Wert	0,69	0,64	0,90	0,86	0,76	0,85	0,26	0,29	0,77
n	43	43	43	43	44	45	45	45	45

Tabelle 1 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Plasma mit klinischen Daten von CRPS-Patienten und Frakturkontrollen. Pearson Korrelation (^S Spearman Korrelation). Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.1.2 Leukozyten

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	-0,09	-0,18	-0,15	-0,24	-0,27	-0,25	-0,05	-0,22	-0,38
P Wert	0,57	0,26	0,34	0,13	0,08	0,11	0,75	0,15	0,01
n	43	43	43	43	44	44	44	45	45
miR-21	-0,09	-0,08	-0,05	-0,25^s	-0,32	-0,09	-0,09	-0,33	-0,31
P Wert	0,54	0,60	0,75	0,09	0,03	0,57	0,56	0,02	0,03
n	46	46	46	46	47	47	47	48	48
miR-29b	-0,08	-0,15	-0,08	-0,18	-0,23	-0,12^s	-0,18^s	-0,34	-0,13
P Wert	0,58	0,31	0,59	0,22	0,12	0,42	0,26	0,02	0,37
n	46	46	46	46	47	47	47	48	48

Tabelle 2 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Leukozyten mit klinischen Daten von CRPS-Patienten und Frakturkontrollen. Pearson Korrelation (^s Spearman Korrelation). Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.2 Korrelation der CRPS-Patienten der Einzelgruppe

10.2.1 Plasma

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	-0,02	-0,06	-0,28	-0,14	-0,14	-0,21	-0,15	-0,42	-0,39
P Wert	0,94	0,78	0,16	0,49	0,48	0,31	0,45	0,03	0,04
n	26	26	26	26	27	27	27	27	27
miR-21	-0,09	-0,06	-0,13	-0,21	-0,47	-0,18	-0,08	-0,44	-0,20
P wert	0,66	0,78	0,51	0,29	0,01	0,36	0,69	0,02	0,29
n	28	28	28	28	29	29	29	29	29
miR-29b	-0,14	-0,06	-0,20	-0,10	-0,36	-0,26	-0,06	-0,35	-0,14
P Wert	0,49	0,78	0,31	0,64	0,06	0,19	0,75	0,07	0,48
n	27	27	27	27	28	28	28	28	28

Tabelle 3 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Plasma von CRPS-Patienten mit klinischen Daten von CRPS-Patienten. Pearson Korrelation. Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.2.2 Leukozyten

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	0,05	-0,06	-0,06	-0,46	-0,42	-0,13	-0,09	-0,17	-0,41
P Wert	0,82	0,77	0,78	0,02	0,03	0,51	0,66	0,41	0,04
n	26	26	26	26	27	27	27	27	27
miR-21	-0,01	0,04	0,07	-0,25	-0,48	-0,04	-0,09	-0,40	-0,21
P Wert	0,95	0,83	0,71	0,20	0,01	0,84	0,65	0,03	0,28
n	29	29	29	29	30	30	30	30	30
miR-29b	-0,13	-0,25	-0,17	-0,23	-0,48	-0,11	-0,19	-0,26	-0,11
P Wert	0,49	0,20	0,37	0,24	0,01	0,56	0,31	0,17	0,55
n	29	29	29	29	30	30	30	30	30

Tabelle 4 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Leukozyten von CRPS-Patienten mit klinischen Daten von CRPS-Patienten. Pearson Korrelation. Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.2.3 Exosomen

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	0,38	0,03	-0,05	-0,30	0,03	0,22	0,18	-0,09	-0,05
P Wert	0,05	0,89	0,80	0,13	0,87	0,27	0,36	0,63	0,80
n	27	27	27	27	28	28	28	28	28
miR-21	0,06	0,02	0,04	-0,48	-0,16	-0,05	0,09	0,01	-0,14
P Wert	0,77	0,91	0,84	0,01	0,41	0,78	0,63	0,94	0,45
n	29	29	29	29	30	30	30	30	30
miR-29b	0,19	0,15	0,24	0,10	0,06	0,28	0,30	0,40	0,32
P Wert	0,34	0,44	0,23	0,63	0,78	0,15	0,14	0,04	0,10
n	27	27	27	26	27	27	27	27	27
miR-144	0,32	0,03	-0,03	-0,18	0,04	0,06	0,16	0,03	-0,06
P Wert	0,09	0,86	0,87	0,36	0,82	0,74	0,40	0,89	0,77
n	29	29	29	29	30	30	30	30	30
miR-223	0,19	0,11	-0,02	-0,36	0,04	0,18	0,26	0,02	-0,04
P Wert	0,35	0,59	0,90	0,06	0,84	0,35	0,17	0,94	0,83
n	28	28	28	28	29	29	29	29	29

Tabelle 5 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Exosomen von CRPS-Patienten mit klinischen Daten von CRPS-Patienten. Pearson Korrelation. Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.3 Korrelation der Frakturkontrollen der Einzelgruppe

10.3.1 Plasma

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	-0,46	-0,07	-0,21	-0,37^S	-0,53	-0,40	-0,45	-0,53	-0,41
P Wert	0,05	0,80	0,40	0,13	0,02	0,10	0,06	0,02	0,09
n	18	18	18	18	18	18	18	19	19
miR-21	-0,19	0,23	0,59	-0,26	-0,26	-0,20	-0,12	-0,08	-0,31
P Wert	0,49	0,38	0,01	0,34	0,34	0,47	0,64	0,76	0,24
n	16	16	16	16	16	17	17	17	17
miR-29b	-0,34	-0,17	0,35	-0,41	-0,38	-0,38	-0,48	-0,05	-0,08
P Wert	0,19	0,53	0,16	0,11	0,15	0,15	0,05	0,84	0,77
n	16	16	16	16	16	17	17	17	17

Tabelle 6 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Plasma von Frakturkontrollen mit klinischen Daten. Pearson Korrelation (^S Spearman Korrelation). Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.3.2 Leukozyten

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	-0,35	-0,42	-0,10	-0,26	-0,31	-0,23	-0,59	-0,22^S	-0,16
P Wert	0,17	0,09	0,69	0,31	0,23	0,37	0,01	0,37	0,55
n	17	17	17	17	17	17	17	18	18
miR-21	0,14	0,24	-0,04	0,12	-0,03	0,03	-0,53	-0,09^S	-0,38
P Wert	0,60	0,35	0,89	0,65	0,92	0,92	0,03	0,71	0,13
n	17	17	17	17	17	17	17	18	18
miR-29b	0,62	0,30	0,16	0,40	0,42	0,54	-0,02	-0,14^S	0,20
P Wert	0,01	0,24	0,54	0,11	0,09	0,02	0,94	0,58	0,44
n	17	17	17	17	17	17	17	18	18

Tabelle 7 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Leukozyten von Frakturkontrollen mit klinischen Daten. Pearson Korrelation (^S Spearman Korrelation). Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

10.3.3 Exosomen

	Akt. NRS ¹	Ø NRS ²	Max. NRS ³	Dauer	NPSI	GCPS Int. ⁴	GCPS Dis. ⁵	CSS	BDI II
miR-183	0,17	0,12	-0,24	0,29	0,30	0,16	0,16	0,06^S	0,43
P Wert	0,49	0,63	0,33	0,23	0,22	0,53	0,49	0,81	0,07
n	19	19	19	19	19	19	19	20	20
miR-21	-0,29^S	-0,01^S	-0,11^S	-0,63^S	-0,40^S	-0,42^S	-0,03^S	-0,3^S	-0,07^S
P Wert	0,25	0,95	0,67	0,01	0,11	0,09	0,90	0,21	0,78
n	17	17	17	17	17	17	17	18	18
miR-29b	0,08	0,15	0,05	0,01	0,33	0,06	-0,03	0,57	-0,13
P Wert	0,75	0,56	0,84	0,95	0,18	0,81	0,90	0,01	0,62
n	18	18	18	17	18	17	17	18	18
miR-144	-0,09	0,04	-0,08	-0,30^S	0,00^S	-0,29^S	-0,19	0,15	0,54
P Wert	0,73	0,89	0,78	0,23	0,98	0,25	0,45	0,56	0,02
n	17	17	17	17	17	17	17	18	18
miR-223	0,00	0,16	0,05	-0,27	0,01	-0,21	0,11	-0,04^S	0,17
P Wert	0,99	0,52	0,84	0,26	0,96	0,39	0,65	0,85	0,49
n	19	19	19	19	19	19	19	20	20

Tabelle 8 Anhang: Ergebnisse der Partialkorrelation der miRNA-Expression in Exosomen von Frakturkontrollen mit klinischen Daten. Pearson Korrelation (^S Spearman Korrelation). Daten adjustiert für Alter und Geschlecht. ¹Aktueller NRS; ²Durchschnittliche NRS letzte Woche; ³Maximale NRS letzte Woche; ⁴GCPS Schmerzintensität; ⁵GCPS Einschränkung.

11 Danksagung

Diese Arbeit konnte nur entstehen durch die Leitung und Unterstützung einer Vielzahl von Menschen, denen ich an dieser Stelle gerne herzlich danken möchte.

Ich möchte mich zunächst bei Frau Professor Heike Rittner bedanken, die mir die Gelegenheit gab, dieses Thema zu bearbeiten und diese Doktorarbeit zu verfassen. Darüber hinaus hat Sie mich hervorragend betreut und gab mir viele wertvolle Anregungen und stetige Ermutigung.

Ebenso gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau Dr. Ann-Kristin Reinhold, die mir im Rahmen meiner Arbeit ein wertvoller Ansprechpartner war und mich stets unterstützt hat. Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe molekulare Schmerzforschung und den Mitarbeitern im Labor für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau Dr. Nicole Wagner vom Institut für Anatomie für ihre große Hilfe bei der Arbeit mit der Transmissionselektronenmikroskopie.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in dieser Zeit und vor allem in schweren Momenten begleitet und unterstützt haben.