

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Akute Neurodegeneration nach intraventrikulärer Injektion
von synthetisch hergestellter siRNA im Gehirn der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Angermair

aus Altenerding

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling

2. Prof. Dr. med. P. Vajkoczy

3. Priv.-Doz. Dr. med. V. Hans

Datum der Promotion: 19.03.2010

1 Die RNA-Interferenz (RNAi)	1
1.1 Der RNA-Interferenz-Mechanismus	2
1.1.1 Initiationsphase	2
1.1.2 Die Effektorphase	4
1.1.3 Degradation der Ziel-mRNA	5
1.2 Aufbau und Struktur von synthetisierter siRNA	6
1.3 Off-target Effekte von dsRNA	6
1.3.1 Interferonantwort	7
1.3.2 Proteinkinase R	9
1.4 Fragestellung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Rezepte	11
2.2 Versuchstiere	12
2.3 siRNA-Design und -Synthese	12
2.4 Präparation der osmotischen Minipumpen	13
2.4.1 siRNA	13
2.4.2 Polyinosinic:Polycytidylic Acid (polyI:C)	14
2.4.3 NSAIDs	15
2.5 Narkose	15
2.6 Kraniotomie	15
2.7 Hirnentnahme und -asservierung	16
2.8 Proteinextraktion	17
2.8.1 Proteinextraktionsverfahren	17
2.8.2 Proteinkonzentrationsmessung	18
2.9 Western Blot	19
2.9.1 Probenaufbereitung	19
2.9.2 Elektrophorese	20
2.9.3 Membran-Transfer der Proteine („Blotten“)	20
2.9.4 Proteindetektion durch spezifische Antikörper	21
2.10 S ³⁵ -Markierungs-Experimente	21
2.11 Immunhistochemie	22
2.12 Fluoro-Jade B	23
2.13 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	24
2.14 Statistik	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Spezifische Inhibition von β -Tubulin durch siRNA-TUB1	26
3.1.1 Western Blot-Ergebnisse der β -Tubulin-Expression durch siRNA-TUB1	26
3.1.2 Immunhistochemie	27
3.1.3 S ³⁵ -Markierung von siRNA-TUB1	28
3.2 Unspezifische Inhibition von β -Tubulin durch siRNA-TUB2	29
3.2.1 Western Blot-Ergebnis der β -Tubulin-Expression durch siRNA-TUB2	29
3.2.2 Aktivierung einer unspezifischen Interferon-Antwort durch siRNA-TUB2	31

3.3 Akuter neurodegenerativer Zelltod durch off-target-Effekte	33
3.3.1 S ³⁵ -labelling-Transfektionsexperimente von siRNA-TUB2	33
3.3.2 Fluoro-Jade-Färbung und Immunhistochemie	34
4 Diskussion	37
4.1 Spezifische β -Tubulin-Inhibierung durch siRNA-TUB1	37
4.2 Unspezifische Inhibierung von β -Tubulin durch siRNA-TUB2	38
4.2.1 RISC-abhängige off-target-Effekte	39
4.2.2 Interferon-induzierte off-target-Effekte	39
4.3 Akute Neurodegeneration durch siRNA-TUB2	40
4.4 Nichtsteroidale-Antiphlogistika (NSAIDs)	42
5 Zusammenfassung	44
6 Abkürzungen und Akronyme	45
7 Literaturverzeichnis	48
8 Lebenslauf	55
9 Erklärung an Eides Statt	56

1 DIE RNA-INTERFERENZ (RNAi)

Die Grundlagenforschung der Molekularbiologie beginnt mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA), ein in allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül und Trägerin der Erbinformation. Die Ribonukleinsäure (RNA) wird lange Zeit als Molekül ignoriert, bis das immense Regulationspotential erkannt wird. Obwohl die verschiedenen Klassen der RNA nämlich messenger RNA (mRNA), transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA) schon früh identifiziert werden, führt die Entdeckung der sogenannten small RNAs (ca. 19 – 30 Nukleotiden), von denen man zuvor annahm, sie wären Abbauprodukte von größeren RNA-Molekülen, zu einer eigenen unabhängigen Klasse von RNA. Bis jetzt wird vermutet, dass diese Klasse von RNA verschiedene Prozesse in der eukaryotischen Zelle reguliert. Mit der Entdeckung der doppelsträngigen RNA (dsRNA) beginnt die Ära der RNA-Interferenz (RNAi), welche sich seit 1998 als nützliches Verfahren für die *in vitro*-Analyse von Genfunktionen erweist.

Andrew Z. Fire und Mello C. Craig identifizieren doppelsträngige RNA als verantwortliches Molekül, welches die Genunterdrückung bewirkt. Sie injizieren einen sense- und einen antisense-Strang parallel in den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und stellen eine potentere Proteinexpressionsinhibierung fest als bei alleiniger Gabe eines RNA-Stranges (Zamore, 2002). Vorausgegangen waren Versuche von Guo und Kemphues, die bereits mit einzelsträngiger RNA experimentierten (Guo and Kemphues, 1995). In den folgenden Jahren wird das Verfahren der RNA-Interferenz akribisch untersucht, wobei die einzelnen Komponenten erkannt werden. RNAi bewirkt eine sequenzspezifische posttranskriptionale Genunterdrückung, welche durch doppelsträngige RNA ausgelöst wird und die Degeneration von homologer mRNA zur Folge hat (Fire et al., 1998). Dieser angeborene Mechanismus bietet zum einen eine schnelle Immunantwort gegen Viren, welche in ihrer frühen Replikationsphase dsRNA produzieren, zum anderen ist er an der Kontrolle von Transposonen beteiligt (Dykxhoorn et al., 2006).

1.1 DER RNA-INTERFERENZ-MECHANISMUS

Der RNAi-Mechanismus wird durch doppelsträngige RNA initiiert. Es werden zwei Hauptarten von natürlich auftretender kurzer dsRNA beschrieben: short interfering RNAs (siRNA) und microRNAs (miRNAs). siRNAs und miRNAs sind die Spaltprodukte von einer längeren dsRNA und werden von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase prozessiert (Meister and Tuschl, 2004). miRNAs unterscheiden sich lediglich in der Biogenese von den siRNA-Molekülen (Zeng et al., 2003). Das Einbringen von si- und miRNA führt schrittweise zur sequenzabhängigen Degeneration der Ziel-RNA. In der Initiationsphase wird dsRNA in einem katalytischen Prozess durch das Multidomänenenzym Dicer in kurze si/miRNA-Moleküle mit 21 bis 23 Nukleotiden geschnitten (Zhang et al., 2002). Die si/miRNA wird in den Ribonukleinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) überführt und induziert in der Effektorphase die Zerschneidung oder translationale Unterdrückung der komplementären einzelsträngigen RNA wie der messenger RNA oder der viralen RNA (Abb. 1; Whitehead et al, 2009; Tomari et al., 2004).

1.1.1 INITIATIONSPHASE

In der Initiationsphase werden lange dsRNA- oder hairpin RNA-Vorläufermoleküle in kleinere Abschnitte von 21 bis 23 Nukleotiden (nt) prozessiert. Dieser Prozess wird im Zytoplasma von dem Schlüsselenzym Dicer (Dcr), einer RNase Typ III, katalysiert (Robertson et al., 1968; Miller et al., 2005). Das Enzym Dicer ist ein 200-kDa-Multidomänenprotein, welches bis auf eine Ausnahme (*Schizosaccharomyces pombe*) in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Es besitzt eine N-terminale DExH RNA Helikase/ATPase Domäne, eine Domäne mit unbekannter Funktion (DUF283), zwei benachbarte RNaseIII-Domänen (RNase IIIa und IIIb) und eine C-terminale dsRNA-bindende Region (dsRBD) (Elbashir et al., 2002).

In der Zelle liegt Dicer assoziiert mit Proteinen der Argonaut-Familie (Ago) vor. Diese nehmen wichtige Funktionen bei der RNAi ein. Der Komplex aus Dicer und Ago-Proteinen besitzen eine PAZ-Domäne (Piwi, Argonaute und Zwiile Protein) und eine PIWI-Domäne (Abb. 2; Carmell et al., 2002; Carmell and Hannon, 2004).

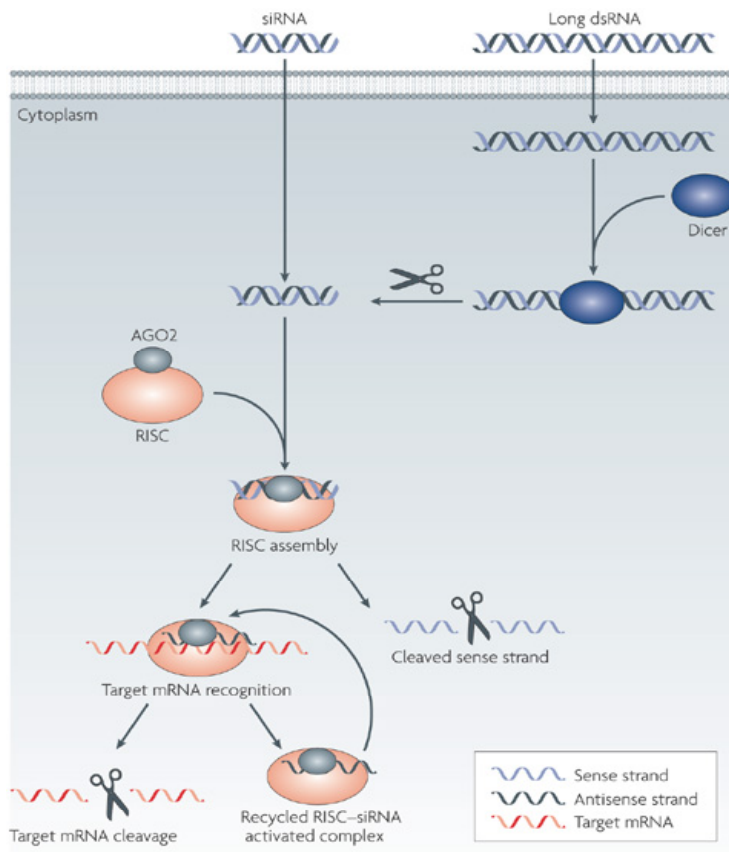


Abb. 1: Mechanismus der RNAi. Lange doppelsträngige RNA (dsRNA) wird in das Zytoplasma eingeführt und verbindet sich mit dem Protein Dicer. Dieses zerlegt die dsRNA in kleinere Fragmente (siRNA). Alternativ kann die siRNA direkt in die Zelle eingebracht werden. Die siRNA wird in den RNA-induced silencing complex (RISC) inkorporiert, wobei der sense-Strang der RNA von dem Argonaute 2-Protein (Ago2) zerteilt wird. Der aktivierte RISC-siRNA-Komplex erkennt die komplementäre Ziel-mRNA, bindet diese durch Basenpaarung und induziert dadurch die Unterdrückung des Zielgens. Der aktivierte RISC-siRNA-Komplex kann für die Destruktion der komplementären mRNA wieder verwendet werden (Whitehead et al, 2009).

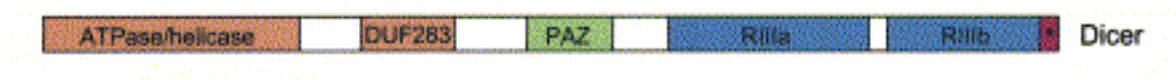


Abb. 2: Schematischer Aufbau von Dicer. Die Endonuklease ist aus einer ATPase/Helikasen-Domäne, einer DUF283-, einer PAZ-Domäne und zwei RNasen aufgebaut (Zhang et al., 2004).

Aufgrund von Untersuchungen mit der RNase III von *E. coli* geht man davon aus, dass die dsRBD von Dicer die dsRNA bindet, und die RNase III-Domäne diese anschließend zerschneidet (Zhang et al., 2004). Jede RNase III-Domäne spaltet einen langen dsRNA-Strang, indem zwei benachbarte Phosphodiesterbindungen getrennt werden. Es entsteht siRNA mit einer Länge von ca. 20 Basenpaaren mit einem 5'-Phosphat/3'-Hydroxylende und einem Überhang von zwei nt an jedem 3'-Ende (Zhang et al., 2004).

1.1.2 DIE EFFEKTORPHASE

In der Effektorphase erkennt die PAZ-Domäne der Endonuklease Dicer die charakteristischen zwei nt 3'-Überhänge der siRNA und führt diese mit Hilfe der PIWI-Domäne dem Effektor-Komplex RISC zu (Meister et al., 2004).

Die Zusammensetzung des RISC-Komplexes ist in den untersuchten Spezies sehr verschieden und am besten an *Drosophila melanogaster* untersucht. *In vitro* besitzt die Fliege zwei verschiedene Dicer-Enzyme, welche jeweils siRNA und miRNA herstellen. *Drosophila* Dcr-1 produziert miRNA. Dcr-2 stellt siRNA her und ist an der Assemblierung der siRNA mit dem RISC-Komplex verantwortlich, welche in mehrere Schritte unterteilt werden kann.

Im ersten Schritt bilden Dcr2, dessen Partner R2D2, die dsRNA und ein oder mehrere unbekannte Proteine den Komplex R1. Dcr2 und R2D2 haben über dsRNA-Bindungsdomänen direkten Kontakt mit der siRNA und dienen als Vorläufermolekül für die Komplexe R2 und R3. Hier wird die doppelsträngige siRNA von der Helikase Armitage mit Hilfe von Ago2-Proteinen entwunden und im zentralen Schritt dem R3-Komplex zugeführt. Der Dcr2-R2D2-Komplex erkennt thermodynamische Unterschiede in der Stabilität der Basenpaarung am 5'-Ende der siRNA und entscheidet, welcher Strang als guide-Strang in den RISC-Komplex eingebaut wird. Der Passanger-Strang wird im Verlauf der RISC-Zusammensetzung aus dem Komplex entfernt und abgebaut (vgl. Abb. 3; Jaronczyk et al., 2005).

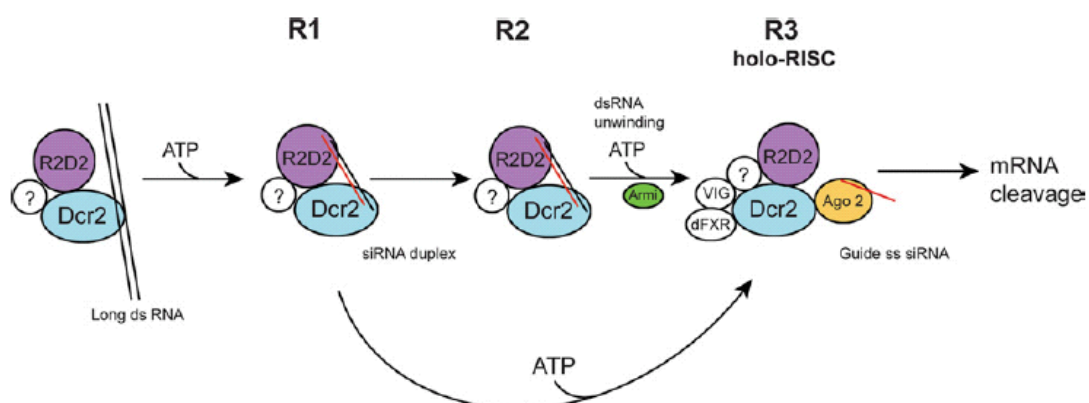


Abb. 3: Modell zur RISC-Zusammensetzung in *D. melanogaster*. Erklärung siehe Text. Das Enzym Dicer2 ist blau, R2D2 violett, die Helikase Armitage grün, das Ago2-Protein gelb und der guide-Strang der siRNA rot dargestellt. (Abb. aus Jaronczyk, K. et al., 2005).

1.1.3 DEGRADATION DER ZIEL-MRNA

Die RNA-Interferenz kann auf unterschiedlichen Ebenen eintreten: auf Chromatin-Ebene, posttranskriptionell und translationell.

Die posttranskriptionale Genunterdrückung ist die sequenzspezifische Degradation der Ziel-RNA, welche zusammen mit dem Argonaute-Protein vonstatten geht. Bei dem Vorgang der Spaltung bindet die im RISC-Komplex inkorporierte guide-RNA an die komplementäre Ziel-RNA. Diese dringt mit dem 5'-Ende in eine Bindungstasche zwischen der PAZ- und der N-terminalen-Domäne ein. Der guide-Strang der siRNA interagiert mit der PAZ-Domäne des RISC-Komplexes. Das katalytische Zentrum der PIWI-Domäne spaltet das Phosphatrückgrat der Ziel-RNA zwischen dem elften und zwölften Nukleotid, gezählt von dem 3'-Ende des guide-Stranges, durch endonukleolytische Spaltung (Abb. 4; Song et al., 2004).

Die Spaltungsprodukte enthalten die gleichen Enden wie bei der RNase H und werden schnell abgebaut. Der Grund für die schnelle Degeneration der RNA ist das Fehlen der stabilisierenden Kappe oder des Poly (A)-Schwanzes (Elbashir et al., 2001). Aus dem Abbau der mRNA resultiert eine Reduktion der Expression des kodierten Proteins und damit eine Stilllegung der Genexpression.

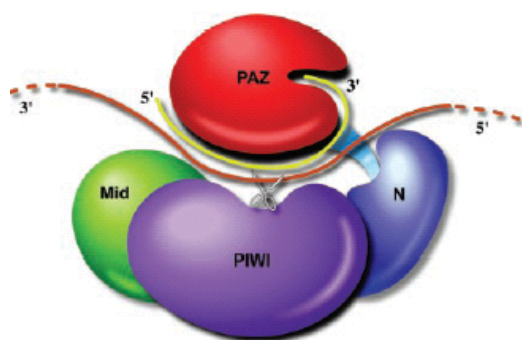


Abb. 4: Die schematische Darstellung einer siRNA vermittelten Spaltung der mRNA. Die Domänen sind farblich abgebildet. Die siRNA (gelb) bindet mit dessen 3'-Ende in einer Bindungstasche der PAZ-Domäne und mit dem 5'-Ende nahe dem anderen Ende der Tasche. Die Ziel-RNA (braun) dringt in eine Bindungstasche zwischen der N-terminalen- und der PAZ-Domäne ein und verlässt den Komplex zwischen der PAZ- und der mittleren Domäne. Das katalytische Zentrum der PIWI-Domäne ist als Schere dargestellt und schneidet die Ziel-RNA in der Mitte von der gegenüberliegenden siRNA (Song et al., 2004).

1.2 AUFBAU UND STRUKTUR VON SYNTHETISIERTER siRNA

Die RNA-Interferenz ist eine effektive Methode zur gezielten Inaktivierung von Genen *in vivo*. Die Methode wird von vielen Forschergruppen in unterschiedlichen Zelllinien von Säugetieren angewandt, um spezifisch definierte mRNA-Moleküle in den Zellen der Organismen zu degenerieren.

Für diese Untersuchungen werden effiziente und spezifische siRNAs benötigt. Die Wahl der siRNA ist durch die Sequenz des Gens festgelegt. Tuschl und Mitarbeiter beschäftigen sich mit der Effizienz von synthetisch hergestellter siRNA (Elbashir et al., 2002). An *Drosophila melanogaster* Lysaten werden die optimale Anzahl der Basenpaarungen, die Länge der 3'-Reste und die Sequenz der Überhänge untersucht. Sie können zeigen, dass bestimmte Bedingungen in dem Design von siRNAs, neben der allgemeinen Formel 5'-AA(N₁₉)TT-3', vorhanden sein müssen, um wirkungsvolle RNAi zu erreichen. Die 3'-Überhänge im antisense-Strang sind für die Erkennung der target-mRNA verantwortlich. Es werden Methoden entwickelt, um die Aktivität der siRNA durch chemische Modifikationen zu verlängern, ohne Spezifität und Wirkung einzuschränken. Desoxythymidin ersetzt ohne Funktionsverlust die ursprünglich vorhandenen Uridinreste am 3'-Ende. Die Wahrscheinlichkeit, dass die siRNA von Nukleasen abgebaut wird, wird reduziert. Untersuchungen zeigen, dass nicht jede siRNA die Expression gleichermaßen inhibiert. Es werden Kriterien für die Wahl effektiver siRNA-Sequenzen postuliert. Der G/C-Anteil soll zwischen 45 und 55 % liegen, die Sequenz mit zwei Adenosinen beginnen und zwischen 50 bp *downstream* vom Startcodon und 50 – 100 bp *upstream* des Terminationcodons liegen. Eine Agglomeratbildung wird vermieden, wenn sich weniger als drei Guanin und Cytosin in Folge befinden (Elbashir et al., 2002).

1.3 OFF-TARGET EFFEKTE VON dsRNA

Säugetiere besitzen die Fähigkeit, virale Infektionen durch eine unabhängige Immunantwort abzuwehren. Viele Viren produzieren während des Replikationszyklus doppelsträngige RNA-Intermediate, welche als zellfremde Nukleinsäure intrazelluläre und extrazelluläre antivirale Mechanismen induzieren (Karpala et al., 2005; siehe Abb. 5). dsRNA führt neben der Induktion

von Interferonen zu einer Aktivierung von Enzymen wie der dsRNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR) und der 2'-5'-Oligoadenylsynthetase (OAS). Extrazellulär bindet dsRNA an den Toll-like-3-Rezeptor (TLR3) und führt über das immun-stimulierende-Gen (ISG) zu einer Hochregulation der PKR und OAS (Karpala et al., 2005).

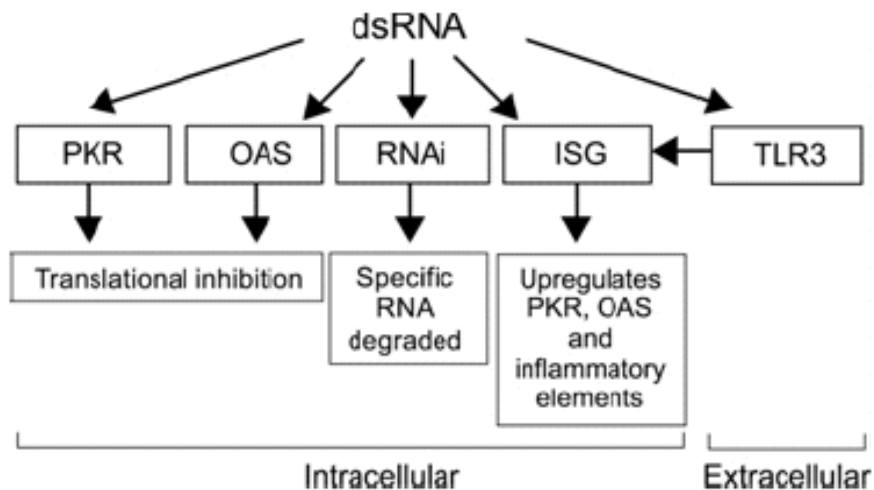


Abb. 5: dsRNA induziert intrazelluläre und extrazelluläre Mechanismen. Intrazellulär wird PKR, OAS oder der RNAi-Mechanismus aktiviert. Die Induktion von IFN durch dsRNA führt zur Hochregulation von ISG. Der extrazelluläre TLR3-Rezeptor bindet dsRNA und führt zur ISG-Aktivierung (Karpala et al., 2005).

1.3.1 INTERFERONANTWORT

Interferone zählen zu den ersten bekannten Vertretern von sezernierten und regulatorisch wirkenden Proteinen, den sog. Zytokinen. 1957 inkubieren Isaacs und Lindenmann Zellen aus befruchteten Hühnereiern mit Influenzaviren und finden im Kulturüberstand eine Substanz, die Ei und Hühnerzellen vor weiteren Virusinfektionen schützt (Isaacs and Lindenmann, 1957). Die Proteinfamilie wird aufgrund der Interferenz mit der Virusreplikation Interferon (IFN) genannt. Zu den Interferonen wird eine Reihe von multifunktionalen Polypeptiden mit verschiedenen biologischen Effekten gezählt. Neben der antiviralen Aktivität vermitteln Interferone antiproliferative Wirkungen und üben Kontrollfunktionen bei der Differenzierung und Proliferation im zellulären Immunsystem aus.

Interferone werden in zwei Klassen eingeteilt, die unterschiedliche Funktionen in der Immunabwehr haben (Samuel, 2001). Die Interferone- α , - β , - ω und - τ werden als Typ I (IFN I) und das Interferon- γ als Typ II (IFN II) bezeichnet. Die Unterscheidung der Interferone basiert auf ihrer Proteinsequenz, ihrer zellulären Herkunft sowie auf unterschiedlichen Rezeptoren. Beide Typen von Interferonen stimulieren einen antiviralen Zustand in der Zelle. Es wird die Replikation von Viren blockiert oder herabgesetzt, und die Synthese von Enzymen aktiviert, die mit viralen Prozessen interferieren (Boehm et al., 1997). Viren aktivieren Interferone der Klasse I direkt (Karpala et al., 2005). In Nachbarzellen induzieren IFN- α/β die Expression antiviraler Faktoren und interferieren mit der Virusvermehrung.

IFN- γ stellt den einzigen Vertreter der Typ-II-IFN dar. Es wird von Zellen des Immunsystems gebildet, wie den NK-Zellen, T-Helfer-Zellen, zytotoxischen Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Neben antiviralen Funktionen beeinflusst IFN- γ die Immunregulation.

Eine gemeinsame Eigenschaft der Interferone des Typ I und II ist die Fähigkeit, über den JAK-STAT-Signalweg eine direkte Signalweiterleitung in den Nukleus zu ermöglichen (Samuel, 2001). STATs (signal transducer and activators of transcription) sind eine Familie von zytoplasmatischen Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Zellwachstums und deren Differenzierung beteiligt sind. Es gibt sieben Mitglieder dieser Familie (STAT 1-7), welche im inaktiven Zustand im Zytoplasma vorliegen. Die Interferone des Typs I binden an den IFN- α -Rezeptor (IFNAR), der aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2 besteht.

An den zytoplasmatischen Domänen befinden sich die Tyrosinkinase der Janusfamilie (JAK), wobei Tyk2 mit IFNAR1 und Jak1 mit IFNAR2 assoziiert ist. Die Bindung eines Interferons des Typs I führt zu einer Heterodimerisierung der Rezeptoren IFNAR1 und IFNAR2 und zu einer Aktivierung der Januskinasen. Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren Tyrosine des Rezeptors, wodurch eine Bindungstasche für STAT2-Moleküle generiert wird. Die gebundenen STAT-Proteine werden phosphoryliert und dissoziieren als STAT1-STAT2-Heterodimere von dem Rezeptor ab. Nach Translokation in den Nukleus verbinden sich die Heterodimere mit ISRE (IFN-stimulated response elements) und beeinflussen die Translation (Imada and Leonard, 2000; Ivashkiv and Hu, 2004).

1.3.2 PROTEINKINASE R

Die dsRNA abhängige Proteinkinase R (PKR) ist eine Serin/Threonin-Kinase, die durch Interferone des Typs I und II induziert und durch dsRNA, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert wird. PKR besteht aus zwei funktionell verschiedenen Domänen: einer N-terminalen dsRNA-bindenden Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne mit Kinaseaktivität. Die zelluläre antivirale Immunantwort wird nach Bindung von dsRNA an PKR induziert. Nach Konformationsänderung der PKR wird die katalytische Domäne freigelegt. Die α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktor 2-alpha (eIF2 α) wird phosphoryliert. Das Ergebnis ist die Inhibierung der Proteinsynthese in virusinfizierten Zellen aufgrund eines Stopps der Translation. Neben der Funktion als Regulator der Proteintranslation ist die PKR bei der Aktivierung der Apoptose und bei der Signaltransduktion beteiligt (Williams, 1999).

1.4 FRAGESTELLUNG

Die RNA-Interferenz ist eine effektive Methode, um eine Genexpressionsinhibierung in der Säugetierzelle zu bewirken. Durch die Analyse der Genexpression im Gehirn zeigt sich eine steigende Anzahl von bisher unbekanntem Genen, welche als potentielle Angriffspunkte für die Behandlung von neurologischen und psychiatrischen Krankheiten verwendet werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wird eine experimentelle Methode beschrieben, die durch Injektion von synthetisch hergestellter siRNA sequenzspezifische Genunterdrückung bzw. off-target-Effekte in dem Gehirn der Ratte erreicht. Als Zielgen wurde β -Tubulin aufgrund seiner disseminierten Verteilung in Zellen des ZNS gewählt. Hierzu haben wir zwei siRNA-Sequenzen verwendet, von denen bereits eine in der Literatur *in vitro* als effektiv beschrieben worden ist. Eine zweite siRNA-Sequenz wurde von uns nach den bekannten Kriterien entwickelt und auf off-target-Effekte in dieser Arbeit *in vivo* getestet. In der Literatur wurden bereits diverse inflammatorische off-target-Effekte von siRNA *in vitro* beschrieben. Wir erwarten nach intrathekalen Gabe von siRNA mögliche neurodegenerative Veränderungen in den ZNS-Zellen der Ratte. Ziel dieser Untersuchungen ist die Erfassung der neuropathologischen Folgen von off-target-Effekten im Sinne einer neuropathologischen Inflammation von siRNAs *in vivo*. Im Falle der unspezifischen Inhibierung von siRNA vermuten wir Auswirkungen auf die Zellmorphologie der Neuronen. Wir versuchen hierbei eine Beteiligung von Enzymen, die bei der Signalvermittlung der Interferon-Antwort involviert sein sollen, nachzuweisen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 REZEPTE

Tab. 1: Lysispuffer		
0,315 g	Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
0,350 g	NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,4 g	Nonidet P40	Boehringer, Mannheim, Deutschland
0,2 g	Deoxycholat	USB, Cleveland, USA
ad 40 ml	Aqua dest.	
1 Tablette	Pi-Cocktail „Complete“	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
2 ml	Aqua bidest.	
Der vorläufige Lysispufferansatz wird zu einer Lösung verrührt. Parallel wird eine Tablette Pi-Cocktail in 2 ml Aqua bidest. aufgelöst und anschließend dem Lysispufferansatz unter Rühren zugefügt. Während der Extraktion wird der Puffer auf Eis gelagert. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20° C		

Tab. 2: 10 x TBS (Tris Buffered Saline)		
80,0 g	NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
12,1 g	Tris Base	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
ad 900 ml	Aqua bidest.	
Mit 2 N HCl pH-Wert auf 7,6 einstellen		

Tab. 3: TBST (Tris Buffered Saline Tween)		
1000 ml	TBS	
0,5 ml	Tween 20	BioRad Laboratories, München, Deutschland

Tab. 4: 10 x MOPS SDS Running Buffer (3-(N-Morpholino)propane sulfonic acid)		
104,6 g	MOPS	USB, Cleveland, USA
60,6 g	Tris Base	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
10 g	SDS	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
3 g	EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
ad 1000 ml	Aqua dest.	

Tab. 5: Transfer-Puffer		
50 ml	NuPage Transfer Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
100 ml	Methanol, acetonfrei	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
1 ml	NuPage Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ad 1000 ml	Aqua dest.	

2.2 VERSUCHSTIERE

Zur Untersuchung wurden 140 erwachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten eines Aufzuchtstammes der Firma Winkelmann (Charles River, Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 250 bis 300 g verwendet. Die experimentellen Versuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit in Berlin, Deutschland, genehmigt.

2.3 siRNA-DESIGN UND -SYNTHESE

Die Auswahl der siRNA-Sequenz erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Truß, Pädiatrische Molekularbiologie der Allgemeinen Kinderheilkunde (Charité, Berlin, Deutschland). Eine von uns benutzte siRNA-Sequenz (siRNA-TUB1) wurde entsprechend einer bereits veröffentlichten Sequenz: 5'-GACAGAGCCAAGUGGACUCAC-3' hergestellt, welche in der 3' untranslatierten Region der mRNA des neuronalen β -Tubulin lokalisiert ist (Gen Bank-Akzessionsnummer AF312873) (Yu et al., 2002). siRNA-TUB2 umfasst die Region 5'-AACGUGCAGAAUAAGAAUAGC-3' der kodierenden neuronalen β -Tubulin-Sequenz der Ratte (GenBank-Akzessionsnummer AF459021). Es wurde eine BLAST-Suche (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt, um die Spezifität sicherzustellen. Es konnten keine weiteren homologen eukaryoten Gensequenzen gefunden werden. Für die S^{35} -labelling-Experimente wurde eine siRNA in Gegenwart von einem S^{35} -markierten Uridin-5'-UTP-Ribonukleotid synthetisiert (1,250 Ci/mmol, New England, Nuclear, Dreieich, Deutschland). Die siRNAs wurden von Dharmacon (Perbio Science GmbH, Bonn, Deutschland) bezogen.

2.4 PRÄPARATION DER OSMOTISCHEN MINIPUMPEN

2.4.1 siRNA

Die Füllung und Benutzung der osmotischen Minipumpen (Alzet, Model 2001, Charles River Wiga GmbH, USA) mit einer Fließrate von 1 $\mu\text{l/h}$ wurde durchgeführt nach einem Standardprotokoll (van Landeghem et al., 2003). Die Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen entweder mit siRNA-TUB1, siRNA-TUB2 oder Transfektam (BD Bioscience – Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) gefüllt und mit steriler künstlicher zerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF; Axel Semrau GmbH & Co, Sprockhövel, Deutschland), welche 147 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl, 0,85 mM MgCl bei einem pH von 7,4 enthält, verdünnt. siRNA-TUB1 und siRNA-TUB2 wurden in fünf verschiedenen Konzentrationen (4 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg/d}$; 7 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg/d}$; 10 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg/d}$; 30 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg/d}$; 100 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg/d}$; n = 12 pro Gruppe, total = 60; siehe Schaubild 1 und 2) verwendet. Zur Kontrolle wurden benutzt: Transfektam in aCSF (total = 30; siehe Schaubild 1 und 2) und 4 μg polyI:C (total = 10; siehe Schaubild 2). Die Pumpen wurden für 24 h in einem Inkubator bei 37° C in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt und mit einem Polyethylenschlauch verbunden (innerer Durchmesser: 0,28 mm, äußerer Durchmesser: 0,61 mm). Aufgrund der ungewissen Auswirkung der enthaltenden Flüssigkeit auf die Fließrate wurden diejenigen Pumpen aussortiert, welche Luftblasen enthielten.

siRNA-Tub 1							
Experiment						Anzahl	
siRNA Konzentration in μg	0	4	7	10	30	100	
Transfektam	+	+	+	+	+	+	
Anzahl der Tiere	15	6	6	6	6	11	$\Sigma 50$
Anzahl präp. Hemisphären	15	6	6	6	6	6	$\Sigma 45$
Anzahl präp. Hemisphären	15	6	6	6	6	6+10*	$\Sigma 55$

 Western Blot
 PFA
 * S35-Detektion

Schaubild 1: siRNA-TUB1-Schema für die Anzahl der Tiere bzw. Hemisphären für die Western Blot-Methoden und PFA-Experimente. Es wurden für die Western Blot- und immunhistochemischen Experimente fünf verschiedene Konzentrationen verwendet. Die Anzahl der Hemisphären für die Western Blot-Experimente wurde gelb und für die PFA-Experimente lila hinterlegt. Das Sternchen markiert die Anzahl der Tiere mit S³⁵-markierter siRNA-TUB1.

siRNA-Tub 2											
Experiment #											Anzahl
siRNA Konzentration in μg	0	0	0	0	4	7	10	30	100	100	
Transfektam	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
poly I:C	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
NaCl	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Ibuprofen	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	
Anzahl der Tiere	15	10	10	10	6	6	6	6	11	10	$\Sigma 90$
Anzahl präp. Hemisphären	15	10	10	10	6	6	6	6	6	10	$\Sigma 85$
Anzahl präp. Hemisphären	15	10	10	10	6	6	6	6	6+10*	10	$\Sigma 95$

Western Blot
 PFA
 * S^{35} -Detektion

Schaubild 2: siRNA-TUB2-Schema für die Anzahl der Tiere bzw. Hemisphären für die Western Blot-Methode und PFA-Experimente. Es wurden für die Western Blot- und immunhistochemischen Experimente fünf verschiedene Konzentrationen verwendet. Die Anzahl der Hemisphären für die Western Blot-Experimente wurde gelb und für die PFA-Experimente lila hinterlegt. Das Sternchen markiert die Anzahl der Tiere mit S^{35} -markierter siRNA-TUB2. Die Kontrollexperimente wurden mit alleiniger Gabe von Transfektam, polyI:C, NaCl und Ibuprofen durchgeführt.

2.4.2 POLYINOSINIC:POLYCYTIDYLIC ACID (POLYI:C)

Die Füllung und Benutzung der osmotischen Minipumpen (Alzet, Model 2001) mit einer Fließrate von 1 $\mu\text{l/h}$ wurde durchgeführt wie es der Hersteller empfiehlt. Die Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen mit polyI:C gefüllt und mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Die Pumpen wurden für 24 h in einem Inkubator bei 37° C in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt und mit einem Polyethylenschlauch verbunden (innerer Durchmesser: 0,28 mm, äußerer Durchmesser: 0,61 mm). Polyethylenschläuche, welche Luftblasen enthielten, wurden aussortiert. polyI:C wurde mit einer Konzentration von 4 μg (n = 10) nach einem Standardprotokoll infundiert (Melton et al., 2003). Das Gesamtvolumen betrug 200 μl . Kontrolltiere (n = 10) erhielten die identische Konzentration von NaCl. Die Infusion von polyI:C und NaCl wurde über 14 Tage verabreicht.

2.4.3 NSAIDs

Den Ratten wurde das nichtsteroidale Antirheumatikum (NSAID) Ibuprofen (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) verabreicht, indem 0,5 mg/ml des Medikaments in das Trinkwasser gegeben wurde. Den Tieren wurde 7 Tage lang freier Zugang zu dem Wasser gewährt, bevor die intraventrikuläre Infusion von 100 µg siRNA-TUB2 (n = 10) oder 4 µg polyI:C (n = 10) gestartet wurde.

2.5 NARKOSE

Die Narkoseeinheit (Dräger, Lübeck, Deutschland) setzte sich aus einem Filter, einer modifizierten Frischebox als Narkosetopf in Eigenanfertigung (Emsa, Emsdetten, Deutschland) sowie einem Mischregler zusammen. Die Versuchstiere wurden mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch narkotisiert (2,5 vol% Isofluran mit 0,5 l/min O₂) (van Landeghem et al., 2001). Nach der Einleitung im Narkosetopf wurde das spontan atmende Tier über eine Maske weiter in Narkose gehalten. Die Spontanatmung wurde durch konstante Isoflurankonzentrationen zwischen 1,5 vol% und 1,8 vol% bei unveränderter Sauerstoffzufuhr gewährleistet. Während der Anästhesie wurden der mittlere arterielle Blutdruck und die arteriellen Blutgase (pCO₂, pO₂, pH) gemessen und sowohl bei den Versuchstieren als auch bei den Kontrolltieren im Normalbereich gehalten. Eine selbstregulierende Wärmeplatte hielt die Körpertemperatur der Ratte konstant zwischen 37° C und 38° C. Die Temperatur wurde kontinuierlich rektal mit einer Sonde gemessen.

2.6 KRANIOTOMIE

Nach Befestigung des Kopfes im stereotaktischen Halter (Stoelting, Wood Dale, USA) wurde zunächst das Haarkleid entfernt. Die Kopfhaut wurde in der Sagittalebene über eine Länge von 1,5 cm inzidiert und der Schnitt in der Koronarebene bilateral um 1 cm bis vor die Ohren erweitert. Nach Präparation der Kopfhaut und Blutstillung wurde die Temporalismuskulatur dargestellt. Nach Freipräparation des Schädelknochens wurde die Kraniotomie bei folgenden

Koordinaten unter mikroskopischer Sicht (Operationsmikroskop: Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt: Bregma kaudal -0,8 cm, lateral +1,5 cm. Hierfür wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung gekühlter, hochoberer Bohrer verwendet, um einen möglichen Hitzeschaden des Gehirns zu verhindern. Der Polyethylenschlauch wurde in den rechten Ventrikel mit einer Tiefe von 3 mm eingeführt und dadurch die intraventrikuläre Infusion für 3 Tage gewährleistet. Der rechte Ventrikel wurde mit dem Ziel einer möglichst einseitigen, aber vollständigen Verteilung der siRNA in dem Gehirn gewählt. Eine Schraube (1 mm im Durchmesser) wurde in den Schädelknochen eingebracht, um sicher zu stellen, dass sich die intraventrikuläre Lokalisation des Polyethylenschlauches durch physiologische Bewegungen der Ratte nicht verändert. Mit Klebstoff (Harvard, Berlin, Deutschland) wurde der Schlauch an der Schraube fixiert. Anschließend wurde unter dem Fell eine Nackentasche präpariert, um die osmotische Minipumpe sicher zu deponieren. Die Haut wurde mit einer fortlaufenden Sagittalnaht (3-0 Prolene; Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und die Narkose unter Insufflation von 5 l/min O₂ ausgeleitet. Nach dem Erwachen wurden die Ratten zurück in den Käfig gesetzt und wiederholt auf motorische Auffälligkeiten begutachtet. Die Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum und waren einem 24 h-Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt.

2.7 HIRNENTNAHME UND -ASSERVIERUNG

Zur Hirnentnahme wurden die Tiere erneut mit Isofluran/O₂-Gemisch narkotisiert. Die Tiere wurden in tiefer Narkose auf den Rücken gelegt und unter Durchtrennung der linken Nierenvene vollständig entblutet. Der Schädelknochen wurde mit einer Kornzange entfernt, und die Dura unter Schonung der Hirnoberfläche eröffnet. Unter mikroskopischer Sicht wurde das Großhirn von Riechhirn und Sehnerven mit einem stumpfen Spatel abgesetzt. Für die Immunhistochemie und für die S³⁵-Detektion wurde jeweils eine Hemisphäre (siehe Schaubild 1 und 2) in der 4 %igen PFA fixiert und in 0,5 cm dicke Frontalscheiben zerlegt. Die Gehirnscheiben wurden über Nacht in 4 %iger PFA nachfixiert und in Paraffin eingebettet, um anschließend 4 µm dicke Schnitte anzufertigen. Für den Western Blot wurde eine Hemisphäre (siehe Schaubild 1 und 2) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt. Die Tiere wurden über die tierexperimentelle Einrichtung der Charité entsorgt.

2.8 PROTEINEXTRAKTION

Für die Proteinextraktion, SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese) und Western Blot wurde ein Standardprotokoll verwendet, die nachfolgend näher erläutert werden (van Landeghem et al., 2001). Es wurden monoklonale Antikörper gegen β -Tubulin (Sigma-Aldrich; Verdünnung 1:1000) und α -Aktin (Sigma-Aldrich, Verdünnung 1:1000) sowie polyklonale Antikörper gegen phosphorylierte PKR (pT⁴⁵¹; BioSource, via IBL GmbH, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:750) und phosphorylierten eIF2 α (pS⁵²; BioSource; Verdünnung 1:750) verwendet. Die Immunoblots wurden für jedes Tier in dreifacher Ausführung angefertigt. Die Intensität der Proteinbanden wurden nach Kalibrierung mit α -Aktin (Sigma-Aldrich) durch densitometrische Scans quantitativ mit dem Programm NIH Image Beta 4.02 (Scion Corporation, USA) bestimmt. Zum Einscannen wurde ein Agfa DuoScan T2500 (AgfaPhoto, Leverkusen, Deutschland) verwendet.

2.8.1 PROTEINEXTRAKTIONSVERFAHREN

Die Proteinextraktion wurde nach einem standardisierten Protokoll zur fraktionierten Proteinextraktion durchgeführt (van Landeghem et al., 2001).

Zur Präparation eines Proteinextraktes wurden die gefrorenen Gehirne der Ratten mit Hilfe von Stößel und Mörser pulverisiert. Die Instrumente wurden in einem Stickstoffbad ausgekühlt, um ein Antauen der Proben beim Mörsern zu verhindern. Die Proben wurden mit einem Spatel in 15 ml Falconröhrchen überführt und mit 2 ml frisch angesetzten Lysispuffer homogenisiert. Die entstandene Suspension wurde am Vortex (Reax top; Heidolph Instrument, Schwabach, Deutschland) vermischt und im Wasserbad des Ultraschallhomogenisators (Sonorex RK 31; Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) für 2 min fragmentiert. Nach einer erneuten Vermischung durch den Vortex wurden die Proben bei 4° C mit 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde in 15 ml Falconröhrchen abpipettiert und auf Eis gelagert. Danach wurde das Zellpellet mit 1 ml Lysispuffer resuspendiert. Es folgte die wiederholte Vermischung, Fragmentierung und Zentrifugation unter unveränderten Bedingungen. Das Aliquot wurde zu dem bereits extrahierten Lysat pipettiert. Sowohl das Proteinlysate als auch das Pellet wurden bei -80° C aufbewahrt.

2.8.2 PROTEINKONZENTRATIONSMESSUNG

Zunächst wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe (zwischen 0,1 µg/µl und 1 µg/µl) einer Standardproteinlösung (BSA) einschließlich des Nullwertes (Aqua dest.) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend wurde pro Probe ein Gemisch von insgesamt 5 ml bestehend aus Aqua dest. und Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA) im Verhältnis von 4:1 angesetzt. Nach Filterung wurden in jedes Reaktionsgefäß 100 µl BSA-Verdünnung bzw. Aqua dest. hinzugefügt. Jede Probe wurde gründlich gevortext und in Dunkelheit 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Nullwert kalibriert und jeder Ansatz bei einer Wellenlänge von 595 nm in einer 0,5 mm Einwegküvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) im Spektrophotometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gemessen. Die jeweiligen BSA-Konzentrationen der Verdünnungsreihe und die zugehörigen gemessenen Werte der optischen Dichte wurden in ein Koordinatensystem übertragen. Anhand dieser Werte wurde der Eichgraph interpoliert. Durch Vergleich der Absorption der Proben mit der Standardmessgeraden des BSA-Standards konnte die Proteinkonzentration der Extrakte berechnet werden.

Zur eigentlichen Konzentrationsbestimmung pipettierte man jeweils 100 µl Proteinlysate, bzw. 100 µl Aqua dest.-Standard zu den bereits gefilterten 5 ml Aqua dest.-Protein-Assay-Gemisch, vermischte dieses mittels Vortex und ließ es 15 min inkubieren. Nach der Inkubationszeit wurde je 1 ml des Probengemisches in die Einwegküvetten gefüllt und nach Abgleich des Nullwertes die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. An der zuvor erstellten Eichkurve konnte anhand der gemessenen optischen Dichte die entsprechende Proteinkonzentration der Proteinlysate abgelesen werden.

2.9 WESTERN BLOT

Western Blotting ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern.

2.9.1 PROBENAUFBEREITUNG

Für den Western Blot wurden 12 %ige Bis-Tris-HCl (Bis[2-hydroxyethyl]imino-tris [hydroxymethyl]methan-HCl)-Polyacrylamid-Gele der Firma NuPage (Invitrogen, Kalifornien, USA) verwendet. Ein oder zwei Gele wurden kurz mit Aqua dest. abgespült, der Kamm aus dem Gel entfernt, die Taschen mit MOPS-Running-Puffer dreimal gespült und der Klebestreifen von den Gekassetten abgezogen. Im Anschluss wurden sie in die NuPage-Gelkammer (Invitrogen) eingebaut. Die innere und äußere Kammer wurde mit MOPS-Running-Puffer befüllt, wobei in die innere Kammer zusätzlich 500 µl NuPage-Antioxidans (Invitrogen) hinzugefügt wurde. Da jede Geltasche maximal 20 µl Probenvolumen aufnehmen kann, wurde ein Ladevolumen von 15 µl pro Geltasche festgelegt. Die geeignete Proteinkonzentration in diesem Ladevolumen wurde durch Probelots mit unterschiedlichen Konzentrationen als 1 µg/µl ermittelt, so dass jeweils 15 µg Protein aus jedem Lysat für den Probenansatz benötigt wurden. Anhand der errechneten Proteinkonzentrationen der Probelysate wurde das benötigte Probenvolumen errechnet, um eine Zielgröße von 15 µg Protein pro 15 µl fertig angesetzter Probe zu erreichen.

Für einen Probenansatz von 100 µl wurden 25 µl NuPage LDS sample buffer (4x) (Invitrogen) 10 µl NuPage sample reducing agent (10x) (Invitrogen), 5 µl Proteinlysate, nach jeweiliger Konzentration zusammengemischt und mit Aqua dest. (18 MΩ) auf 100 µl aufgefüllt und bei 70° C für 10 min in einem Heizblock (Bibby Sterilin, Stone, England) erhitzt. Daraufhin wurde die erste Lane mit 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Magic Marker, Invitrogen) beladen, die weiteren Geltaschen mit je 15 µl des jeweiligen Probenansatzes.

2.9.2 ELEKTROPHORESE

Bei der denaturierten Gel-Elektrophorese werden aufgetragene Proteine annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt. SDS-beladene Proteine weisen im Verhältnis zu ihrer Masse fast identische Ladungen auf, liegen in entfalteter Konformation vor und wandern in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße durch die Gelmatrix. Die Kammer wurde an den Electrophoresis Power Supply-EPS 3501XL (Amersham Pharmacia Biotech) angeschlossen und die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 115 mA bei 100 W und 200 V gestartet. Der Lauf wurde nach 30 min beendet.

2.9.3 MEMBRAN-TRANSFER DER PROTEINE („BLOTTEN“)

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proben durch Blotten auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,2 µm (BioRad Laboratories) überführt. Die Gelkassetten wurden aufgebrochen, die Geltaschen entfernt, ein in Transfer-Buffer eingeweichter Filter auf das Gel gelegt, und die Luftblasen mittels einer Pipette durch Rollen entfernt. Auf die andere Seite des Gels wurde die Nitrocellulose-Membran gelegt, gefolgt von einem ebenfalls in Transfer-Buffer eingeweichten Filterpapier. Der Aufbau zwischen den Plattenelektroden sah folgendermaßen aus: Auf die Kathodenplatte (-) wurden vier Blotting-Pads, das Filter-Gel-Membran-Filter-Sandwich und wieder vier Blotting-Pads gelegt. Die Blotting-Pads wurden ebenfalls zuvor in Transfer-Buffer eingeweicht. Die Anodenplatte (+) wurde aufgesetzt und in die mit Transfer-Buffer befüllte Kammer eingebaut. Der Blot-Transfer fand bei einer konstanten Stromstärke von 170 mA bei ca. 30 V und 100 W für 90 min statt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Elektrophorese bzw. des erfolgreichen Blots wurde das Gel mit Coomassie-Blau (Sigma-Aldrich), und die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich) eingefärbt, um die Proteinbanden zu visualisieren. Das Ponceau-Rot wurde anschließend mit TBST abgespült. Zum Absättigen unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran mit den transferierten Proteinen über Nacht bei 4° C in Blockierungslösung geschwenkt. Hierfür wurde 5 % Trockenmilchpulver (Slim Fast, Wiesbaden, Deutschland) in 50 ml TBST verwendet. Am nächsten Tag wurde der Blocking-Buffer abgegossen und die Membran 6 x 5 min in TBST gewaschen.

2.9.4 PROTEINDETEKTION DURCH SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER

Die aufgetrennten Proteine wurden an die Nitrocellulose-Membran gebunden und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert. Nach dem Waschgang wurde die Membran mit dem Primäantikörper, der im geeigneten Verhältnis von 1:1000 mit TBST und 3 % BSA verdünnt wurde, für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Spülschritt mit TBST für 6 x 5 min, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundäantikörper (Verdünnung 1:100) bei Raumtemperatur für weitere 60 min. Erneut wurde die Membran sechsmal für 5 min in Waschlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in 0,1 % ExtrAvidin-POD (Sigma-Aldrich), verdünnt in TBST, inkubiert. Erneut wurde der Blot für 2 x 15 min und dann für 4 x 5 min in TBST gewaschen. Die Membran wurde für eine Minute in frisch angesetzter Detektionslösung (ECL-Reagenz 1 und 2, 1:1 gemischt; Amersham Pharmacia Biotech) gebadet, auf Filterpapier abgetropft und in einer Klarsichtfolie verpackt in eine Filmkassette gelegt. Bei Raumtemperatur erfolgte in der Dunkelkammer die Exposition der Filme (Chemiluminescent Detection Film; Roche Diagnostics) von 10 s bis 20 min.

2.10 S³⁵-MARKIERUNGS-EXPERIMENTE

Für die S³⁵-Kennzeichnung wurden siRNAs in der Gegenwart von S³⁵-gekennzeichneten Uridin-5'-UTP-Resten (1,250 Ci/mmol; New England Nuclear, Dreieich, Germany) hergestellt. Jede der so gekennzeichneten siRNA wurde von Dharmacon (Perbio Science GmbH) bezogen. Wie bereits beschrieben, wurde das Gehirn entnommen und in Scheiben geschnitten. Die Entwachsung und die Dehydrierung der Gehirnscheiben fanden in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen statt. Vor der Autoradiographie wurden sie luftgetrocknet, danach mit Ilford G5 beschichtet (Ilford, Moberly Cheshire, Großbritannien) und in einer lichtundurchlässigen Box für zwei, drei oder vier Wochen bei 4° C aufbewahrt. Die Scheiben wurden in Kodak D19 Entwickler entwickelt (Kodak, Hemel Hempstead, Großbritannien). Nach Spülen, wurden die Scheiben mit Mayers Hämalaun gegengefärbt und mit Kaysers Glycerogelatine geschützt (von Moers et al., 2005).

2.11 IMMUNHISTOCHEMIE

Immunhistochemie bezeichnet die Darstellung immunologisch reaktiver Strukturen in Geweben nach Anwendung immunchemischer Verfahren. Wir verwendeten die im Western Blot-Verfahren benutzten Antikörper gegen α -Aktin (Sigma-Aldrich; Verdünnung 1:100) und β -Tubulin (Sigma-Aldrich; Verdünnung 1:150) für die immunhistochemische Auswertung.

Ein polyklonaler Primärantikörper (DAKO; Verdünnung 1:250) gegen glial fibrillary acidic protein (GFAP) wurde eingesetzt, um Astrozyten zu detektieren. Das saure Gliafaserprotein kommt als Intermediärfilament im Zytoplasma von Astrozyten vor.

Weiterhin verwendeten wir einen monoklonalen Antikörper gegen cluster of differentiation 68 (CD68; Klon: PG-M1; Abcam; Verdünnung 1:20). CD68 ist ein Glykoprotein, welches an Lipoproteinen niederer Dichte bindet. Es wird auf Monozyten/Makrophagen exprimiert.

Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebestücke wurden mit dem Mikrotom (HM 355; Micran, Walldorf, Deutschland) in 4 μ m dicke Scheiben geschnitten und auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen. Zur vollständigen Entfernung des Einbettungsmediums wurden die Objektträger zweimal 5 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in Ethanol in absteigender Konzentration (100 – 100 – 96 – 80 – 70 %) und PBS eingelegt. Im nächsten Schritt erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit 200 ml Methanol und 3 ml Wasserstoffperoxid für 30 min unter dem Abzug. Es folgte ein zweimaliges Spülen in TBS. Die unspezifischen Bindungsstellen werden durch Inkubation mit 200 μ l entsprechendem Normalserum (die Spezies richtete sich nach der Spezies, in der der Sekundärantikörper hergestellt worden ist; DAKO), verdünnt in 5 ml Tris-HCl-Puffer, bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer (Biorad, München) inkubiert. Das Normalserum wurde abgegossen, und die Präparate anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper bei 4° C über Nacht inkubiert. Es erfolgte das Abgießen und das Spülen mit TBS für zweimal 5 min auf dem Schüttler. Auf die Präparate wurden 10 μ l des entsprechenden sekundären Antikörpers (gegen die Spezies gerichtet, in der der Primärantikörper hergestellt worden ist; DAKO) mit 2 ml TBS gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die jeweiligen Lösungen wurden abgegossen, und die Präparate zweimal 5 min auf dem Schüttler gespült. Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen folgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (5 ml TBS mit 50 μ l Avidin und 50 μ l Biotin mit Peroxidase gekoppelt)

für 45 min bei Raumtemperatur mit anschließendem Spülen mit TBS für zweimal 5 min auf dem Schüttler. Zur Entwicklung wurde eine DAB-Tablette (3,3 Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid) unter dem Abzug in 15 ml 0,1 molarer Tris-HCl lichtgeschützt gelöst, um anschließend 12 µl Wasserstoffperoxid hinzuzugeben. Die Flüssigkeit wurde mit einer 5 ml Spritze durch einen Mikrofilter auf die Präparate getropft und 2 bis 3 min inkubiert, bis die erwünschte Braunfärbung erreicht wurde. Die Schnitte wurden für 15 min in Aqua dest. auf dem Schüttler gespült. Es erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 min, und das Dehydrieren der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70 – 80 – 96 – 100 - 100 %). Die Präparate wurden zweimal für je 5 min in Xylol geschwenkt und eingedeckt.

Die Anzahl der GFAP- und CD68- positiven Zellen (periventrikulärer Raum, in einem maximalen periventrikulären Radius von 900 µm) wurde in zehn mikroskopischen Feldern (0,0625 µm²) mit einer 40fachen Vergrößerung, definiert durch ein kalibriertes Okularraster, gezählt. Es wurden nur immunpositive Zellen, welche sich innerhalb, am rechten oder am unteren Rand des Rasters befanden, gezählt. Die morphometrische Analyse wurde von zwei unabhängigen Untersuchern (SA und FvL) durchgeführt und ein Ergebnis im Konsens festgestellt. Die Schnitte wurden mit einem Leica-DMRB-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Bad Bensheim, Deutschland) untersucht.

2.12 FLUORO-JADE B

Fluoro-Jade B ist ein anionisches Fluoreszenzderivat, welches eine bis heute nicht identifizierte Bindungsstelle im Zytoplasma degenerierender Neuronen markiert.

Nach der Anfertigung von 4 µm dicken Schnitten wurden diese typischerweise in 2 % Gelatine ummantelt konserviert und für mindestens eine halbe Stunde auf einem Wärmetrockner bei 50° C luftgetrocknet. Die Schnitte wurden für 5 min in eine Lösung eingetaucht, welches 1 %iges Natriumhydroxid in 80 % Alkohol enthält.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 2 min mit 70 % Alkohol und danach 2 min mit destilliertem Wasser behandelt. Die Schnitte wurden für 10 min auf einem Schütteltisch in eine 0,06 %ige Kaliumpermanganatlösung überführt, die eine kontinuierliche Hintergrundsuppression

zwischen den Schichten sicherstellt. Die Schnitte wurden für 2 min mit destilliertem Wasser gespült. Die Färbelösung wurde aus einer 0,01 % Fluoro-Jade B Stammlösung hergestellt (Histo-Chem. Inc., Jefferson, USA).

In der Fluoro-Jade B Färbung wurde eine 0,0004 %ige Färbekonzentration nach Standardprotokoll verwendet (Schmued and Hopkins, 2000). Um 100 ml einer 4 % Färbelösung herzustellen, wurden 4 ml der Stammlösung zu 96 ml 0,1 % Azetatsäure hinzugefügt. Die Stammlösung war im Kühlfach für mehrere Monate haltbar, während die Färbelösung innerhalb von 10 min aufgebraucht und nach Benutzung nicht mehr verwendet wurde. Nach 20 min in der Färbelösung wurden die Schnitte jeweils für eine Minute in drei Waschgängen mit destilliertem Wasser gespült. Überschüssiges Wasser wurde mit einem Papiertaschentuch entfernt. Die Schnitte wurden in einen Erwärmer gelegt und bei ca. 50° C für ca. 5 - 10 min getrocknet. Die getrockneten Schichten wurden mit einer Xylolimmersion gesäubert, bevor sie mit DPX (Fluka, Milwaukee, USA), einem nicht-wasserhaltigen und nicht-fluoreszierenden Medium konserviert wurden. Das Gewebe wurde mit einem epifluoreszierenden Mikroskop unter Blaulicht (450 - 490 nm) oder blau-violettem Licht (420 - 490 nm) untersucht. Ein Sperrfilter erlaubte das Durchdringen von Wellenlängen über 515 nm, wodurch eine gelblich-grüne Emissionsfarbe auf den Schnitten auftrat. Mit einem Verengungsfilter (notch filter; z. B. von 515 - 565 nm) resultierte eine grünliche Farbe. Die hergestellten Filter sind geeignet, um Fluorescein sichtbar zu machen.

2.13 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (HE-FÄRBUNG)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, welche Zellkerne und das Bindegewebe der Objekte anfärbt, erfolgte nach einem Standardprotokoll von Sigma (Accustain/HE-Färbung): Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe dehydriert (100 - 95 - 90 - 70 % Ethanol, je 5 min). Die Blaufärbung der Kerne erfolgte für 3 min in Hämatoxylin, wobei dieses durch Oxidation in den eigentlichen Farbstoff Hämatein überführt wird. Das Bindegewebe wurde für 3 – 5 min mit Eosin orangerot angefärbt. Anschließend wurden die Präparate wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach dem Xylolschritt mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

2.14 STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SPSS-Software (Version 11.0; SPSS Inc. Chicago, USA). Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichung bei den einzelnen Ergebnissen berechnet. Für die statistische Analyse wurde die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur und Dunns-Test für verschiedene Vergleiche herangezogen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn das Testergebnis einen p-Wert von $< 0,01$ ergab.

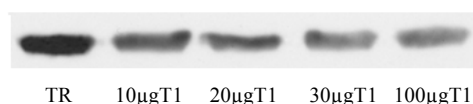
3 ERGEBNISSE

3.1 SPEZIFISCHE INHIBITION VON β -TUBULIN DURCH siRNA-TUB1

3.1.1 WESTERN BLOT-ERGEBNISSE DER β -TUBULIN-EXPRESSION DURCH siRNA-TUB1

Bei Ratten, welche 4, 7, 10, 20, 30 und 100 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg}/\text{Tag}$ siRNA-TUB1 intraventrikulär für drei Tage erhalten (n/group = 6), ist die Expression von β -Tubulin signifikant um 20,5 % \pm 4,1 %, 29,8 % \pm 5,3 %, 48,9 % \pm 5,1 %, 54,4 % \pm 5,8 %, 73,2 % \pm 12,5 % und 73,8 % \pm 8,7 % zur Kontrolle inhibiert ($p = 0,005$). Die Kontrolluntersuchung mit dem Transfektionsreagenz Transfektam allein zeigt im Western Blot keine Inhibition (Abb. 6).

A β -Tubulin



B

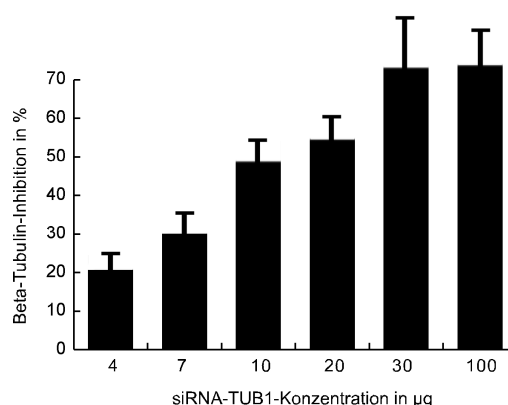
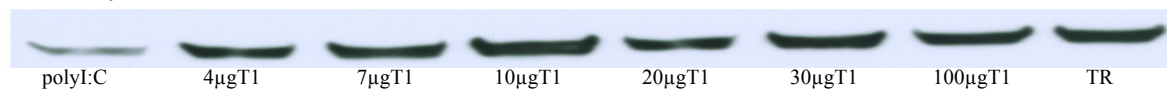


Abb. 6: Western Blot-Ergebnis für siRNA-TUB1 gegen β -Tubulin (A) Die Expression von β -Tubulin ist im Western Blot für Konzentrationen von 10, 20, 30 und 100 μg siRNA-TUB1 (T1) signifikant um 48,9 %, 54,4 %, 73,2 % und 73,8 % (von links nach rechts) inhibiert. Transfektam (TR) dient zur Kontrolluntersuchung und zeigt keine Inhibierung von β -Tubulin. **(B)** Graphische Ansicht der β -Tubulin-Inhibition mit siRNA-TUB1 mit unterschiedlichen Konzentrationen.

Das Zytoskelettprotein α -Aktin wird in einem weiteren Versuch als Kontrollprotein gewählt, um die Spezifität der siRNA-TUB1 zu testen.

Die Untersuchungen mit 4, 7, 10, 20, 30 und 100 $\mu\text{g}/0,3 \text{ kg}/\text{Tag}$ siRNA-TUB1 zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede der Proteinkonzentrationen von α -Aktin in der Western Blot-Auswertung (-9,5 \pm 1,7 %, -10,1 \pm -4,1 %, -7,4 \pm 2,6 %, -6,5 \pm 1,9 %, -6 \pm 2,4 % und -8,8 \pm 2,3 %, siehe Abb. 7 A und 7 B). Transfektam dient zur Negativ- und polyI:C zur Positivkontrolle.

A α -Aktin

B

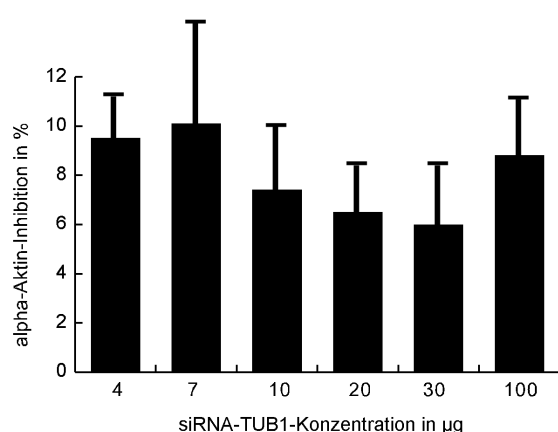


Abb. 7 A (Bild oben): Western Blot-Untersuchung mit unterschiedlichen Konzentrationen in µg von siRNA-TUB1 (T1). Die Proteinkonzentration von α -Aktin nach siRNA-TUB1-Gabe ist im Western Blot nicht signifikant verändert, aufgrund der spezifischen Inhibition von β -Tubulin. PolyI:C dient zur Positivkontrolle, Transfektam (TR) zur Negativkontrolle. Die Kontrolltiere erhalten TR und polyI:C ohne siRNA-TUB1.

Abb. 7 B (Bild links): Graphische Darstellung der α -Aktin-Inhibition mit siRNA-TUB1 bei unterschiedlichen Konzentrationen. Es zeigen sich bei 4, 7, 10, 20, 30 und 100 µg eine Inhibition von 9,5 %, 10,1 %, 7,4 %, 6,5 %, 6 % und 8,8 % (von links nach rechts).

3.1.2 IMMUNHISTOCHEMIE

Die immunhistochemischen Untersuchungen bestätigen die Western Blot-Ergebnisse. Die Expression von β -Tubulin in neuronalen und ependymalen Zellen in den periventriculären Gebieten ist bei Ratten, die 30 µg siRNA-TUB1 intrathekal erhalten, reduziert (Abb. 8 B). Der Abbildung ist zu entnehmen, dass Gliazellen bei dieser siRNA-TUB1-Konzentration noch in der Lage sind, geringe Mengen an β -Tubulin zu exprimieren. Gliazellen, reaktive Astrozyten und Mikrogliazellen sind schwach immunreaktiv für β -Tubulin (Abb. 8 B). Die Kontrolluntersuchung mit Transfektam zeigt in der Immunhistochemie keine Reduktion der β -Tubulin-Expression (Abb. 8 A).

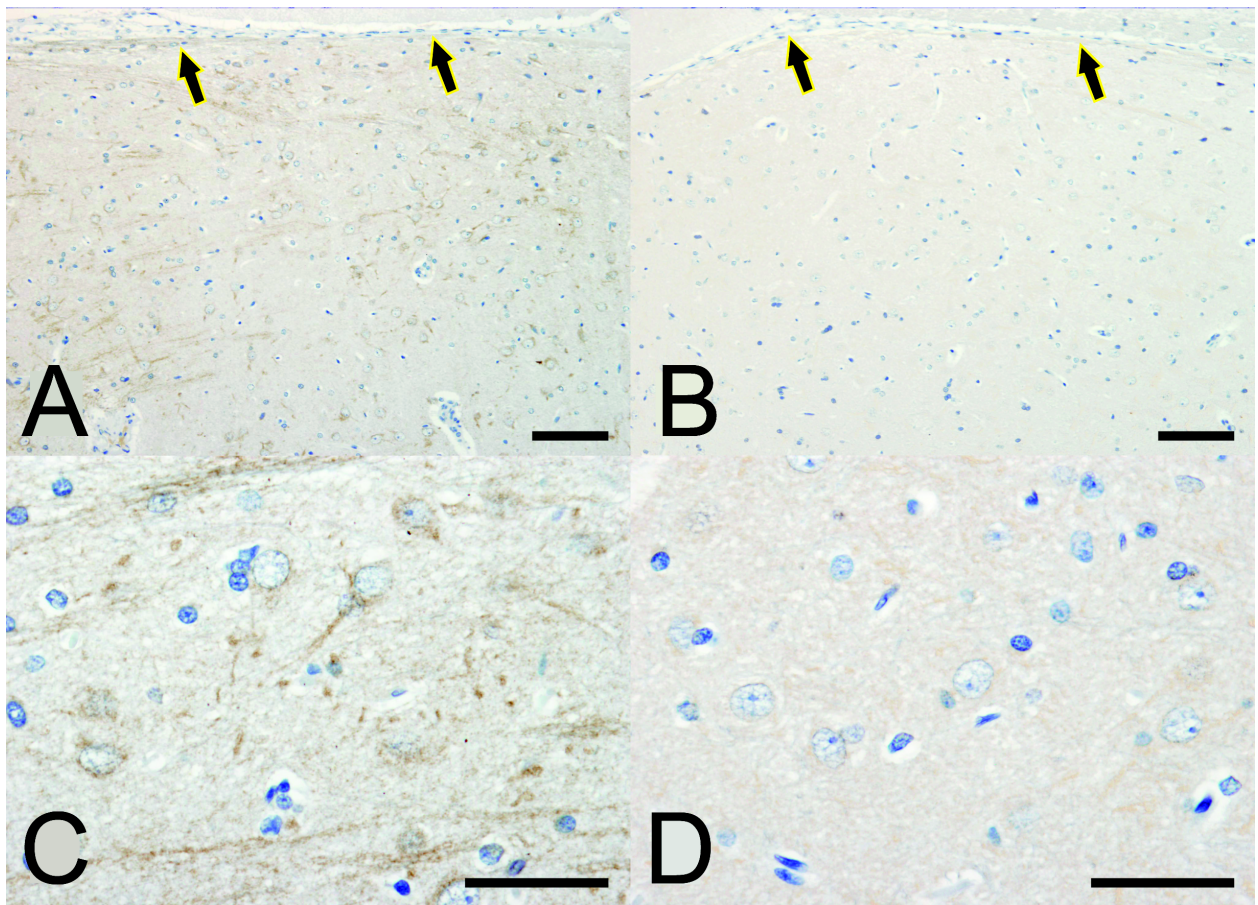


Abb. 8: β -Tubulin-Expression in Gliazellen nach Gabe von Transfektam (A, C) und nach Gabe von 30 μg siRNA-TUB1 (B, D).

(A) Die immunhistochemische Untersuchung von β -Tubulin zeigt eine deutliche Expression in periventriculär gelegenen Neuronen und Gliazellen; schwarze Pfeile zeigen Leptomeningen; Balken: 25 μm . (C) als 100 x Vergrößerung von A. (B) 30 μg siRNA-TUB1 führt zu einer verminderten β -Tubulin-Expression. Die neuronale β -Tubulin-Immunreaktion ist verringert. Gliazellen, reaktive Astrozyten und Mikrogliazellen sind schwach immunreaktiv für β -Tubulin; schwarze Pfeile zeigen Leptomeningen (D) 100 x Vergrößerung von B.

3.1.3 S^{35} -MARKIERUNG VON siRNA-TUB1

Zur Beurteilung der Transfektion und der Verteilung der siRNA-TUB1 nach intrathekalen Gabe markieren wir siRNA-TUB1 mit einem S^{35} -Uridin-5'-UTP-Ribonukleotid. Wir verwenden eine Konzentration von 100 μg siRNA-TUB1. In den S^{35} -markierten Transfektionsexperimenten können radioaktive Granula oberhalb der ependymalen und periventriculären neuronalen Zellen und Gliazellen in einem maximalen periventriculären Radius von 900 μm ausgemacht werden. In vereinzelt Zellen wird innerhalb der Leptomeningen und des Plexus choroideus Aktivität detektiert (vgl. Abb. 9).

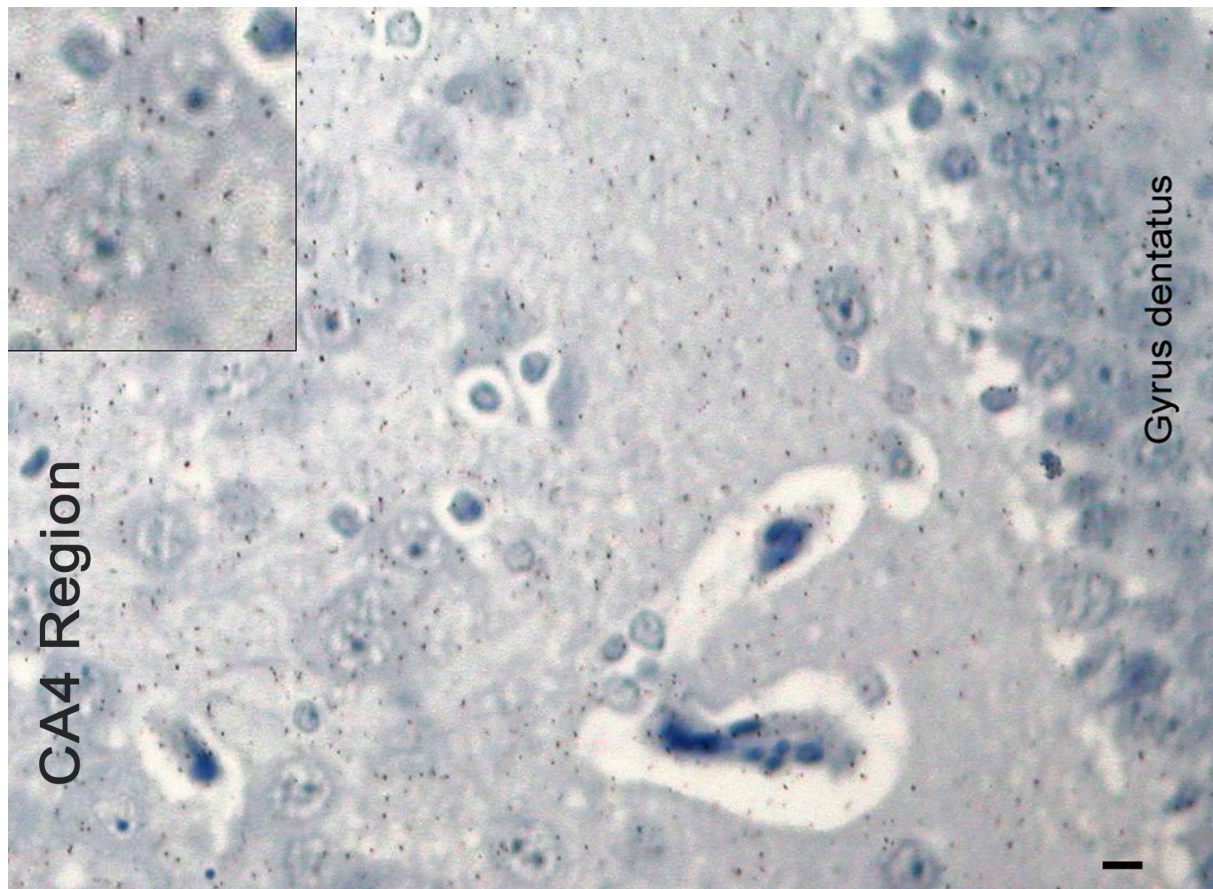


Abb. 9: Verteilung der S^{35} -markierten Granula nach intraventrikulärer Applikation von $100 \mu\text{g}$ siRNA-TUB1 innerhalb des Neuopils. Die Granula können oberhalb der Neuronen und Gliazellen der CA4-Region und der Hippokampusformation detektiert werden. Balken: $25 \mu\text{m}$. Vergrößerung: Zwei Neurone mit Granula und morphologisch intaktem Zytoplasma und Nukleus.

3.2 UNSPEZIFISCHE INHIBITION VON β -TUBULIN DURCH siRNA-TUB2

3.2.1 WESTERN BLOT-ERGEBNIS DER β -TUBULIN-EXPRESSION DURCH siRNA-TUB2

Zur Bestätigung unserer Ergebnisse mit siRNA-TUB1 verwenden wir eine zweite siRNA gegen β -Tubulin. Eine nichtsignifikante Veränderung der β -Tubulin-Expression kann bei geringen Konzentrationen von siRNA-TUB2 behandelten Ratten beobachtet werden. Es werden 4, 7, 10, 30 oder $100 \mu\text{g}/0,3 \text{ kg}/\text{Tag}$ ($n/\text{group} = 6$) siRNA-TUB2 intraventrikulär für 36 h infundiert. Es zeigt sich eine Inhibition der β -Tubulin-Expression von $8 \% \pm 1,2 \%$, $3,5 \% \pm 0,6 \%$, $8,6 \% \pm$

2,1 % und 12,8 % \pm 3,5 %. Bei 100 μ g siRNA-TUB2 wird eine signifikante Inhibition der β -Tubulinproduktion von 74,6 % \pm 12,9 % (siehe Abb. 10) beobachtet.

Die Kontrolluntersuchung mit Transfektam ergibt im Western Blot keine Veränderung der β -Tubulin-Konzentration. Das Zytoskelettprotein α -Aktin wird als Kontrollprotein gewählt, um festzustellen, ob siRNA-TUB2 spezifisch gegen β -Tubulin gerichtet ist. Die α -Aktin-Proteinkonzentration wird signifikant um 46,7 % \pm 6,4 % bei 30 μ g siRNA-TUB2 und 77,1 % \pm 14,7 % bei 100 μ g siRNA-TUB2 verringert (Abb. 11).

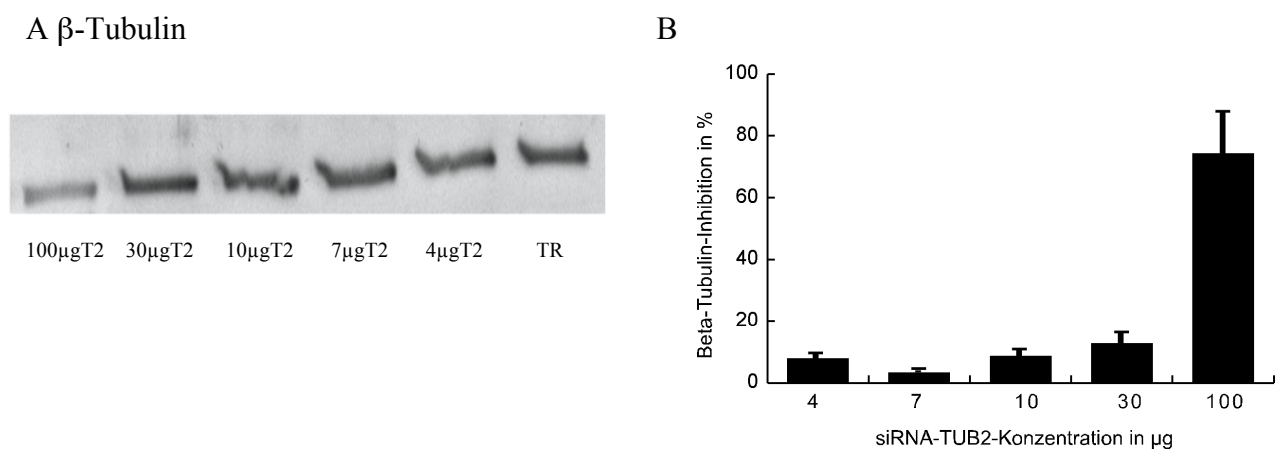


Abb. 10: (A) Western Blot-Ergebnis der β -Tubulininhibition mit 4 μ g, 7 μ g, 10 μ g, 30 μ g und 100 μ g siRNA-TUB2 (T2), im Vergleich mit Transfektam (TR) (von rechts nach links). Die intraventrikuläre Applikation von 100 μ g siRNA-TUB2 (100 μ gT2) zeigt eine deutliche Inhibition von β -Tubulin. Niedrigere Konzentrationen von siRNA-TUB2 zeigen keine signifikante Inhibition von β -Tubulin. Die Kontrolluntersuchung mit Transfektam (TR) zeigt im keine Veränderung der β -Tubulin-Konzentration (B) Graphische Ansicht der β -Tubulin-Inhibition mit verschiedenen Konzentrationen von siRNA-TUB2.

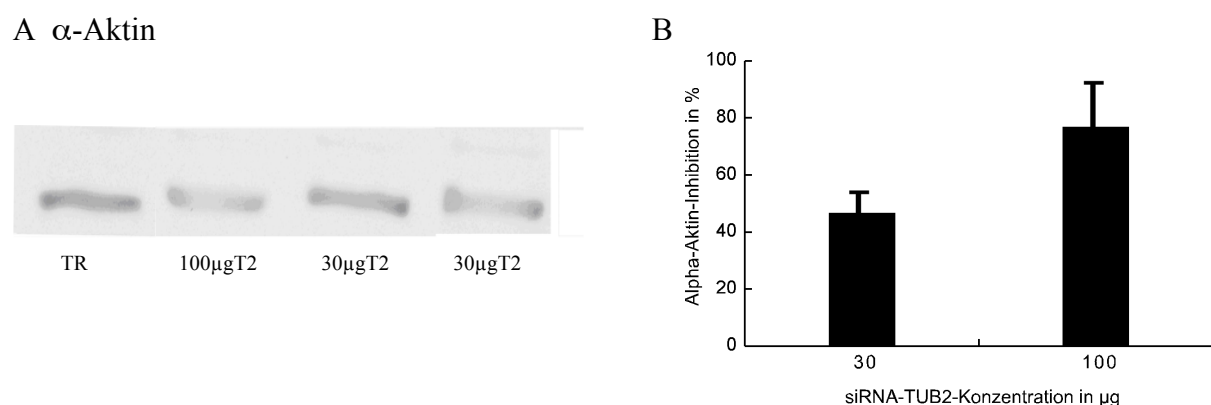


Abb. 11: (A) Western Blot-Ergebnis für α -Aktin bei 30 und 100 μ g siRNA-TUB2 (T2). Die Konzentration von 100 μ g siRNA-TUB2 (100 μ gT2) resultiert in einer deutlichen Inhibition von α -Aktin im Vergleich zu Tieren, die Transfektam (TR) ohne siRNA-TUB2 erhielten. (B) Graphische Ansicht der α -Aktin-Inhibition mit siRNA-TUB2 mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen.

3.2.2 AKTIVIERUNG EINER UNSPEZIFISCHEN INTERFERON-ANTWORT DURCH siRNA-TUB2

Eine mögliche Erklärung für die unspezifische Inhibierung von α -Aktin durch siRNA-TUB2 ist eine Aktivierung der allgemeinen Interferonantwort.

Die Proteinkinase R (PKR) und der eukaryotische Initiationsfaktor 2-alpha (eIF2 α) sind Proteine, die bei der Signalvermittlung der Interferon-Antwort beteiligt sind. Bei Ratten, die 100 μ g siRNA-TUB2 erhalten, wird die Expression von beiden Proteinen signifikant gesteigert. Für phosphoryliertes PKR ergibt sich eine Steigerung von 189,4 % \pm 17,3 % (Abb. 12 A) und für phosphoryliertes eIF2 α eine Steigerung von 48,7 % \pm 8,8 % (Abb. 12 B) im Western Blot. Bei den Kontrolluntersuchungen mit Transfektam lässt sich keine Steigerung von PKR und eIF2 α (Abb. 12) im Western Blot nachweisen. Die Ergebnisse sprechen für eine Aktivierung der allgemeinen Interferonantwort, welche durch siRNA-TUB2 induziert wird.

Polyinosinic Polycytidylic Acid (polyI:C) ist ein potenter Induktor der Interferonantwort. Die Abbildung 12 zeigt die Western Blot-Ergebnisse der PKR- und eIF2 α -Protein-Expressionssteigerung nach intrathekaler Applikation von 4 μ g polyI:C. Die Gabe von 4 μ g polyI:C bewirkt eine erwartete Steigerung der PKR-Konzentration um 58,4 % \pm 12,2 % (Abb. 12 A) und eine Steigerung von eIF2 α um 42,3 % \pm 16,2 % (Abb. 15 B).

Wir untersuchen die β -Tubulin- und α -Aktin-Konzentrationen nach intrathekaler Gabe von 4 μ g polyI:C. Der Western Blot weist eine Inhibierung von β -Tubulin (Abb. 13 A) und α -Aktin (Abb. 13 B) nach. Es zeigt sich eine unspezifische Inhibition von 90 % \pm 8,4 % für beide Proteine. Transfektam dient zur Kontrolluntersuchung.

Nach intrathekaler Gabe von 100 μ g siRNA-TUB2 erhalten die Tiere Zugang zu 0,5 mg Ibuprofen/ml Trinkwasser. Ibuprofen als gut untersuchtes nichtsteroidales antientzündliches Medikament und Interferonantagonist unterdrückt die PKR- und eIF2 α -Expression. Die Proteinexpression von PKR (9,2 % \pm 1,2 %, Abb. 12 A) und eIF2 α (5,3 % \pm 2,7 %, Abb. 12 B) sind in der Western Blot-Auswertung nicht signifikant verändert im Vergleich zu den Kontrolltieren mit Transfektam.

In einer weiteren Versuchsreihe werden im Western Blot die Proteinkonzentrationen von β -Tubulin untersucht. Den Tieren wird 100 μ g siRNA-TUB2 intrathekal verabreicht und erhalten Zugang zu 0,5 mg Ibuprofen/ml Trinkwasser. Die Western Blot-Auswertung zeigt im Vergleich mit Transfektam eine geringe β -Tubulininhibition von $13,8 \% \pm 4,2 \%$ (Abb. 14).

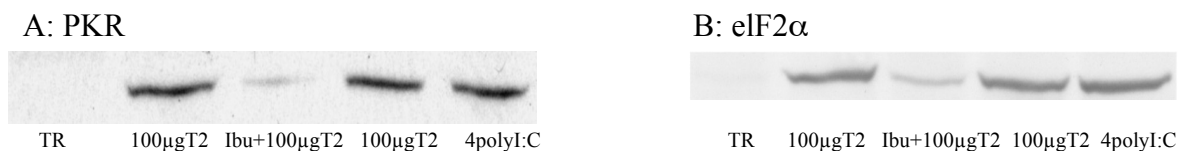


Abb. 12: Western Blot-Ergebnisse für PKR (A) und für eIF2 α (B) nach intrathekaler Gabe von 100 μ g siRNA-TUB2 (100 μ gT2), verglichen mit einem Kontrolltier, welches Transfektam (TR) ohne siRNA-TUB2 erhält. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass siRNA-TUB2 eine Interferon-Antwort indiziert und eine unspezifische translationale Inhibition von verschiedenen Proteinen verursacht. polyI:C bewirkt als potenter Induktor der Interferonantwort ebenfalls eine Steigerung von PKR und eIF2 α , während die gleichzeitige Gabe von 100 μ g siRNA-TUB2 und Ibuprofen (Ibu+100 μ gT2) keine Steigerung von PKR und eIF2 α zeigen (Erklärung im Text).

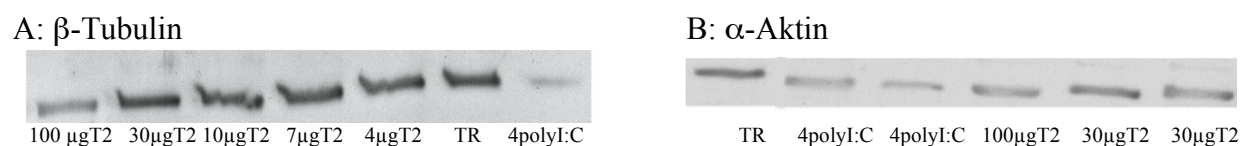


Abb. 13: Western Blot-Ergebnisse für die β -Tubulin-Inhibition (A) und α -Aktin-Inhibition (B) nach intrathekaler Gabe von 4 μ g polyI:C (4polyI:C) im Vergleich mit Transfektam (TR) und verschiedenen siRNA-TUB2-Konzentrationen (T2) in μ g. β -Tubulin und α -Aktin werden sowohl von 100 μ g siRNA-TUB2 (100 μ gT2) als auch von 4 μ g polyI:C inhibiert.

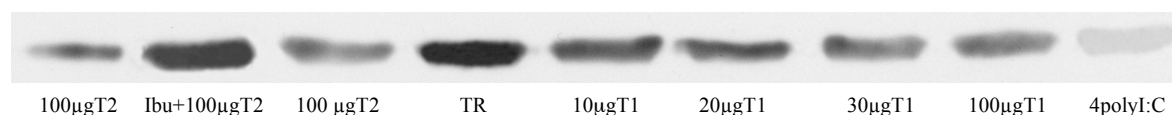


Abb. 14: Western Blot-Untersuchung der β -Tubulin-Konzentration nach intrathekaler Gabe von 100 μ g siRNA-TUB2 (100 μ gT2) und nach Gabe von 100 μ g siRNA-TUB2 und Ibuprofen (Ibu+100 μ gT2) im Vergleich mit Transfektam (TR).

3.3 AKUTER NEURODEGENERATIVER ZELLTOD DURCH OFF-TARGET-EFFEKTE

Durch die signifikante Inhibition von α -Aktin in den Western Blot-Ergebnissen nach Gabe von siRNA-TUB2 vermuten wir unspezifische Auswirkungen auf die Zellmorphologie von Neuronen.

3.3.1 S^{35} -LABELLING-TRANSFEKTIONSEXPERIMENTE VON siRNA-TUB2

Zur Beurteilung der Transfektion und der Verteilung von siRNA-TUB2 nach intrathekaler Injektion wird siRNA-TUB2 in Gegenwart von einem S^{35} -markierten Uridin-5'-UTP-Ribonukleotid synthetisiert.

In den S^{35} -markierten Transfektionsexperimenten haben die radioaktiv gekennzeichneten Neuronen häufig eine andere Morphologie. Viele markierte Neuronen des periventrikulären Gebietes und des Thalamus erscheinen geschädigt. Es zeigen sich ein pyknotischer Nukleus und ein geschrumpftes Zytoplasma (Abb. 15). Vergleichbare Ergebnisse zeigen die Zeichen der eosinophilen Degeneration der Neuronen in der HE-Färbung (Abb. 16).

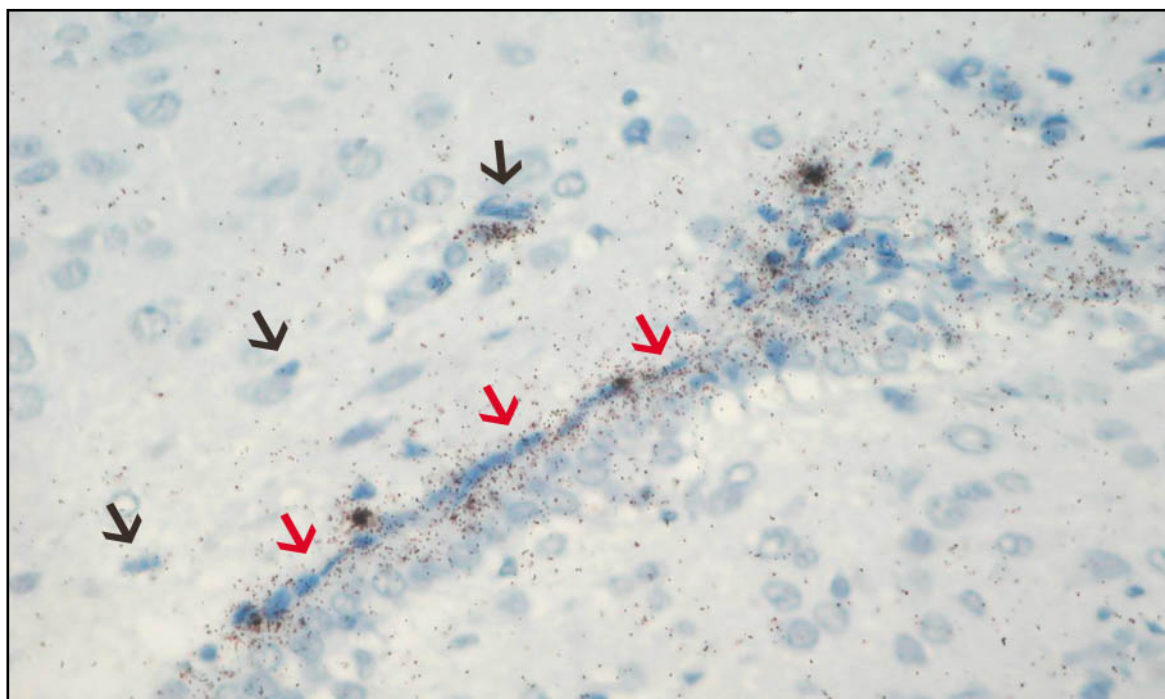


Abb. 15: Verteilung der S^{35} -markierten siRNA-TUB2-Granula. Die S^{35} -gekennzeichnete Granula wird oberhalb der Ependymzellen (rote Pfeile), Neuronen und Gliazellen periventrikulär detektiert. Das Zytoplasma einiger Ependymzellen und neuronaler Zellen (schwarze Pfeile) erscheint geschrumpft und deren Nuklei pyknotisch.

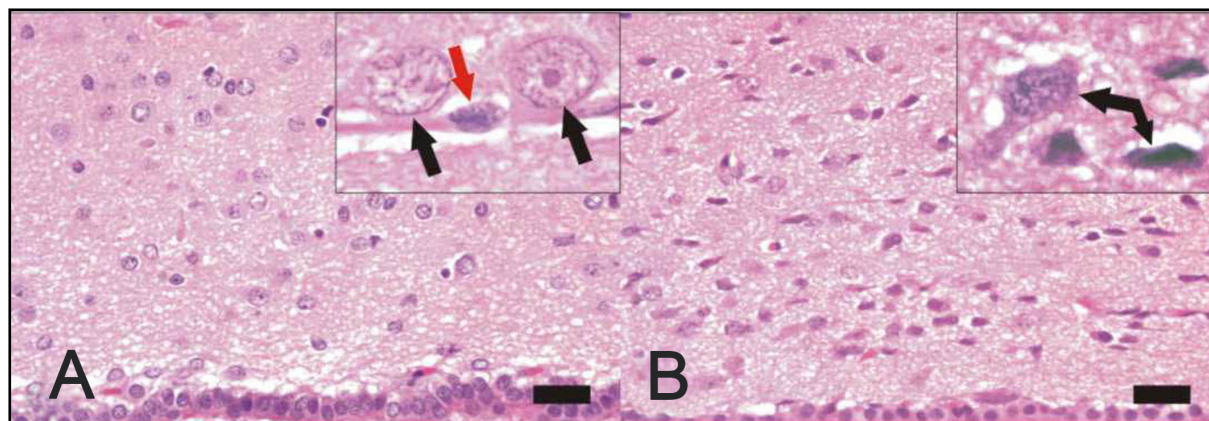


Abb. 16: HE-Färbungen: (A) Periventriculäre Neuronen mit einem regelrechten morphologischen Erscheinungsbild bei den Kontrolltieren mit Transfektam. Vergrößerung: Die schwarzen Pfeile zeigen zwei Neurone, der rote Pfeil eine Endothelzelle. (B) Periventriculäre Neuronen mit Zeichen einer Neurodegeneration bei Tieren, welche siRNA-TUB2 erhalten. Vergrößerung: Die schwarzen Pfeile markieren ein geschrumpftes eosinophiles Neuron.

3.3.2 FLUORO-JADE-FÄRBUNG UND IMMUNHISTOCHEMIE

Fluoro-Jade B (FJ) ist ein anionisches Fluoreszenzderivat, welches eine nicht identifizierte Bindungsstelle im Zytoplasma degenerierender Neuronen markiert.

Die mit 100 µg siRNA-TUB2 transfizierten Nervenzellen sind mit Fluoro-Jade B anfärbbar ($10,8 \pm 2,4$ Zellen/ $0,625 \mu\text{m}^2$, Abb. 17 A). FJ-positive Zellen können innerhalb eines Radius von 800 µm beobachtet werden. Die morphologischen Veränderungen wie auch die zytoplasmatische Bindung von FJ sprechen für eine ausgeprägte Nervenzellschädigung.

Bei den Kontrolluntersuchung mit Transfektam konstatieren wir eine unveränderte Zellmorphologie ohne wesentliche Zunahme FJ-positiver Neurone ($0,4 \pm 0,7$ Zellen/ $0,625 \mu\text{m}^2$, Abb. 17 B). Die Kontrolle mit 4 µg polyI:C ($12,3 \pm 2,7$ Zellen/ $0,625 \mu\text{m}^2$, Abb. 17 C) zeigt eine vergleichbare Anzahl von periventriculären FJ-positiven Neuronen im Vergleich zu siRNA-TUB2 (Abb. 17 A). Die Zunahme der FJ-positiven Zellen in der siRNA-TUB2- und in der polyI:C-Gruppe ist signifikant.

Die Fluoro-Jade-Färbung zeigt bei Tieren, welche 100 µg siRNA-TUB2 und 0,5 mg Ibuprofen/ml Trinkwasser erhalten, eine regelrechte Zellmorphologie von Glia- und Nervenzellen.

FJ-positive Zellen sind nicht vermehrt nachweisbar zu den Kontrollen ($0,6 \pm 0,7$ Zellen/ $0,625 \mu\text{m}^2$, Abb. 17 D). Ibuprofen scheint die Induktion der allgemeinen Interferon-Antwort zu unterbinden.

In der Immunhistochemie lassen sich vermehrt Mikrogliazellen (61 Zellen/ $0,625 \mu\text{m}^2$) in der siRNA-TUB2-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Transfektam feststellen ($36 \pm 3,2$ Zellen/ $0,625 \mu\text{m}^2$). Zur Detektion von Mikrogliazellen und von Makrophagen im Gehirn der Ratte verwenden wir CD68-Antikörper (Abb. 18). Nach Gabe von $100 \mu\text{g}$ siRNA verändert sich die Morphologie der Mikrogliazelle. Das Zytoplasma erscheint geschrumpft.

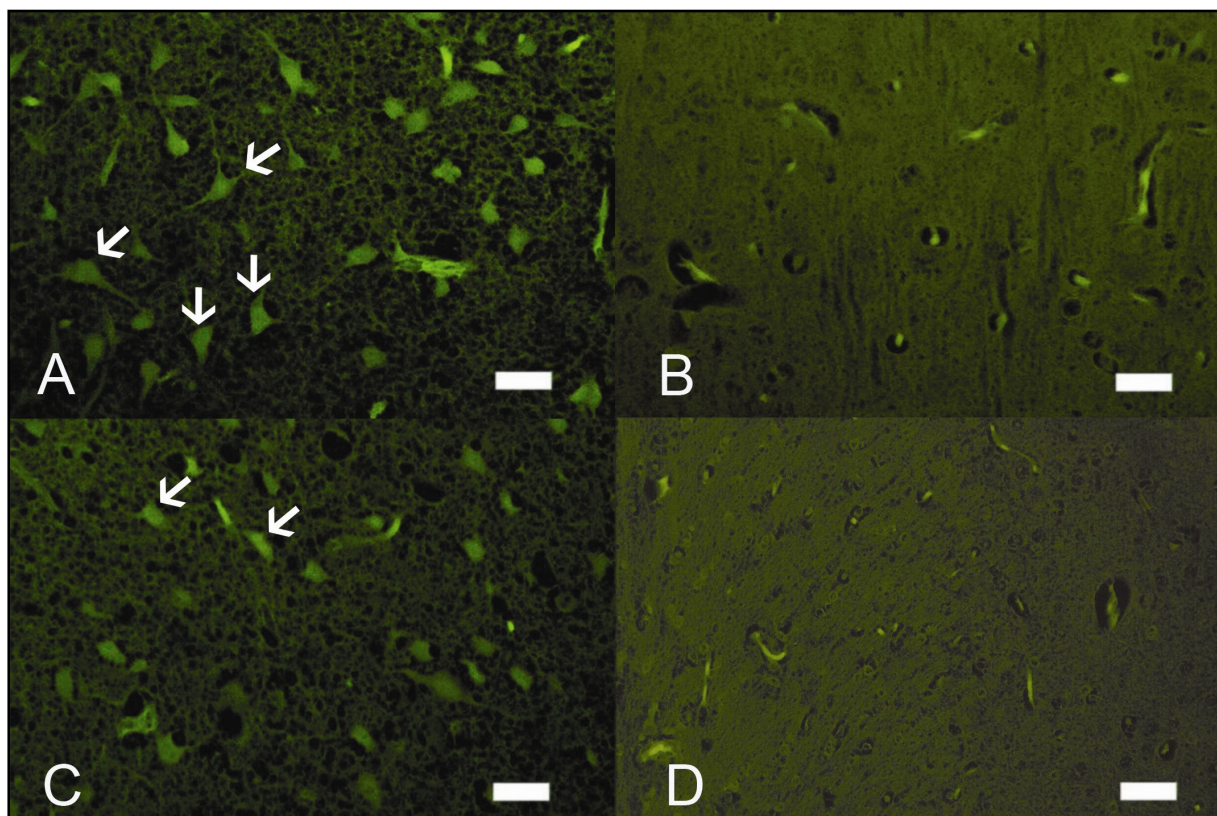


Abb. 17 A - D: Fluoro-Jade B-Färbungen (FJ). (A): Fluoro-Jade B-Färbung nach intraventrikulärer Gabe von $100 \mu\text{g}$ siRNA-TUB2. In den periventrikulären Gebieten wird das Zytoplasma von vielen Neuronen als Zeichen degenerierender Prozesse mit FJ angefärbt (weißer Pfeil). (B) Bei den Kontrolltieren mit Transfektam lassen sich nur vereinzelte FJ-positive Zellen nachweisen. (C) Viele periventrikuläre FJ-positive Zellen sind nach $4 \mu\text{g}$ polyI:C zu detektieren (weißer Pfeil), die Anzahl ist mit der siRNA-TUB2-Gruppe zu vergleichen. (D) Nach Applikation von siRNA-TUB2 und Ibuprofen ist die Anzahl der FJ-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (B) nicht erhöht. Ibuprofen scheint die Induktion der Interferonantwort zu unterdrücken. Balken $25 \mu\text{m}$.

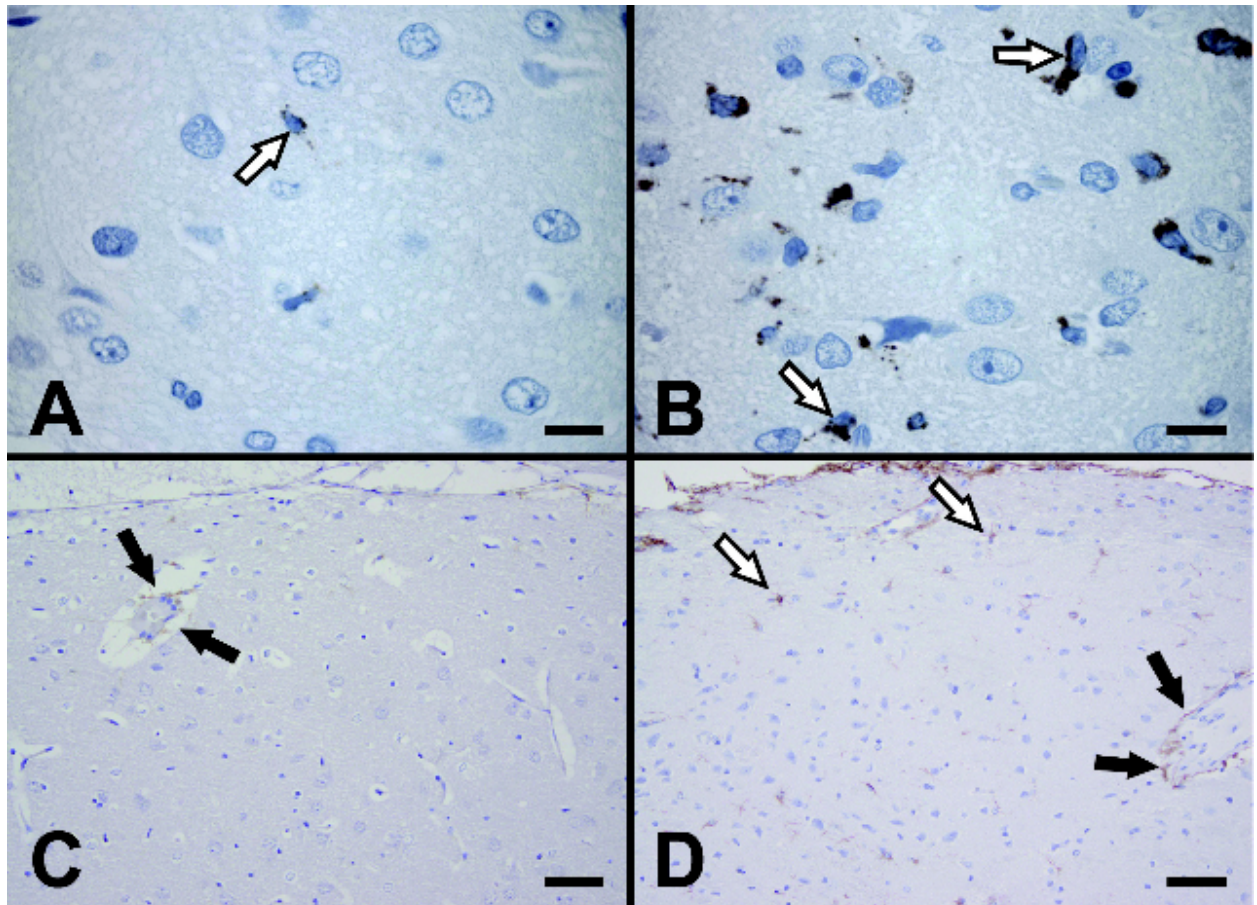


Abb. 18 A – D Immunhistochemie: Abb. (A) und (B) zeigen immunhistochemische Ergebnisse mit CD68. (A) Kontrolle mit Transfektam. (B) Deutliche Zunahme der aktivierten Mikrogliazellen nach Gabe von 100 μg siRNA-TUB2; die weißen Pfeile kennzeichnen aktivierte Mikrogliazellen. Abb. (C) und (D) immunhistochemische Ergebnisse mit GFAP; die schwarzen Pfeile zeigen aktivierte Astrozyten um ein Blutgefäß; oberer Schnitttrand subpial gelegen. (C) Kontrolle mit Transfektam. (D) Nach Gabe von 100 μg siRNA-TUB2 gegen β -Tubulin nimmt die Anzahl der aktivierten Astrozyten als Zeichen der Immunabwehr deutlich zu; die weißen Pfeile kennzeichnen reaktive Astrozyten.

4 DISKUSSION

RNA-Interferenz ist ein evolutionär konservierter Prozess, bei dem die Expression eines spezifischen Gens posttranskriptionell inhibiert wird, indem komplementäre mRNA erkannt und dessen Degeneration induziert wird. Im Labor wird die Inhibierung eines spezifischen Gens durch RNA-Interferenz für experimentelle Zwecke verwendet und ist ein viel versprechendes Verfahren für die Analyse von Genfunktionen. Für die Applikation in Säugetierzellen wird siRNA hergestellt, welche kleiner als 30 Basenpaare sind, um unspezifische Effekte zu vermeiden (Holen and Mobbs, 2004; Persengiev et al., 2004).

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene siRNA-Sequenzen gegen endogenes β -Tubulin eingesetzt, um dessen mögliche neuropathische Auswirkungen von off target-Effekten *in vivo* zu untersuchen.

4.1 SPEZIFISCHE β -TUBULIN-INHIBIERUNG DURCH siRNA-TUB1

Intraventrikulär applizierte siRNA-TUB1 überquert effektiv die Liquor-Hirnschranke, transfiziert Neuronen und Gliazellen und bewirkt eine lokale Inhibierung der β -Tubulin-Konzentration in der rechten Gehirnhälfte. Die Western Blot-Untersuchungen ergeben eine eindeutige Inhibierung des endogenen Gens β -Tubulin, welche sich konzentrationsabhängig steigern lässt. Bei 4 μ g siRNA-TUB1 zeigt sich eine Inhibierung von ca. 20 % der β -Tubulinexpression. Bei einer Maximalkonzentration von 100 μ g siRNA-TUB1 reduziert sich die Proteinkonzentration von β -Tubulin bis zu 70 %.

Die siRNA-Konzentrationen für unsere Versuche werden nach einer bereits veröffentlichten Publikation (Schwarz et al., 2002) ausgewählt, wonach effektive siRNA-Duplexe in Konzentrationen von ein bis zehn nM eine potente Unterdrückung der Genexpression bewirken. Die Arbeitsgruppe von Semizarov zeigt in Untersuchungen, dass die Spezifität der siRNA konzentrationsabhängig ist. Bei einer Konzentration von 100 nM induziert siRNA eine signifikante Anzahl von unspezifischen Genen, welche bei der Apoptose und bei einer Stressantwort eine Rolle spielen (Semizarov et al., 2003). Die lokale Inhibition der β -Tubulin-Konzentration ist übereinstimmend mit einer veröffentlichten Studie, welche die Verteilung nach intraventrikulärer Verabreichung von siRNA bei Mäusen zeigt (Thakker et al., 2004).

In unseren Versuchsreihen ist die Morphologie der neuronalen Zellen bei einer maximalen Konzentration von 100 μg siRNA-TUB1 nicht betroffen. Die S^{35} -markierten Transfektionsexperimente zeigen eine zelluläre Aktivität der Granula in neuronalen Zellen und Gliazellen. Wie Kontrolluntersuchungen zeigen, wird die Expression von α -Aktin nicht unterdrückt, was für eine sequenzspezifische Inhibierung des β -Tubulins durch siRNA-TUB1 spricht. Die Inhibition von β -Tubulin durch siRNA-TUB1 bewirkt keine Aktivierung der Interferonantwort, keine Neurodegeneration oder Aktivierung von Gliazellen und bestätigt die bereits veröffentlichten Ergebnisse.

4.2 UNSPEZIFISCHE INHIBIERUNG VON β -TUBULIN DURCH siRNA-TUB2

Während siRNA-TUB1 eine spezifische Inhibition von β -Tubulin bewirkt, löst siRNA-TUB2 in höheren Konzentrationen unspezifische Inhibitionseffekte aus. Wir demonstrieren, dass synthetisch hergestellte siRNA-TUB2 gegen β -Tubulin in einer unspezifischen Inhibition *in vivo* resultiert. Die Verringerung der β -Tubulin-Konzentration ist assoziiert mit einer Inhibierung von α -Aktin. Beide Proteinkonzentrationen sind bei Kontrolltieren nach alleiniger Applikation des Transfektion-Agens unverändert. Die beobachtete translationale Inhibition ist in unserer Studie am ehesten auf off-target-Effekte zurückzuführen, welche durch siRNA-TUB2 vermittelt wird.

In vitro wurde gezeigt, dass RISC-induzierte Antworten (Jackson et al., 2003; Semizarov et al., 2003; Jackson and Linsley, 2004; Scacheri et al., 2004; Snove and Holen, 2004) und die Induktion einer Interferon-Antwort mit der Expression von inflammatorischen Zytokinen (Sledz et al., 2003) off-target-Effekte induzieren.

4.2.1 RISC-ABHÄNGIGE OFF-TARGET-EFFEKTE

Mehrere Studien zeigen RISC-abhängige off-target-Effekte, welche aus einem Mismatch zwischen siRNA und mRNA resultieren (Jackson et al., 2003; Semizarov et al., 2003; Jackson & Linsley, 2004; Persengiev et al., 2004; Scacheri et al., 2004; Snove & Holen, 2004; Fedorov et al., 2006). Untersuchungen von Elbashir und Mitarbeitern weisen nach, dass ein Mismatch von wenigen Basen Auswirkungen auf die mRNA-Expression hat (Elbashir et al., 2001). Eine weitere Studie beschreibt, dass ca. 20 % von 359 untersuchten und veröffentlichten siRNA-Sequenzen off-target-Effekte induzieren, wenn ein Mismatch von zwei Basen toleriert wird (Snove & Holen, 2004). Die Arbeitsgruppe von Saxena zeigt, dass eine fehlende Komplementarität zwischen siRNA und mRNA von drei bis fünf Basen toleriert werden kann (Saxena et al., 2003), dann jedoch bis zu 75 % der untersuchten siRNA nicht spezifisch ist (Snove and Holen, 2004). Von diesen Ergebnissen ausgehend, werden lokale Alignment-Methoden wie Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) oder Smith-Waterman-Algorithmen entwickelt, um die siRNA-Spezifität vorauszusagen (Birmingham et al., 2006). In der Studie von Birmingham wird demonstriert, dass, mit Ausnahme der identischen Übereinstimmung von siRNA mit der Zielsequenz, durch Alignment-Methoden allein keine sicheren Rückschlüsse auf off-target-Effekte getroffen werden können (Birmingham et al., 2006).

4.2.2 INTERFERON-INDUZIERTE OFF-TARGET-EFFEKTE

In unserer Versuchsreihe zeigen wir, dass Komponenten der Interferon-Antwort off-target-Effekte induzieren. In der vorliegenden Arbeit ist die siRNA-TUB2-Gabe mit einer Expressionszunahme der phosphorylierten PKR und eIF2 α und einer anschließenden unspezifischen translationalen Inhibition assoziiert. Die PKR wird konzentrationsabhängig durch Autophosphorylierung aktiviert, woraus die Phosphorylierung des Substrates eIF2 α resultiert (Williams et al., 1979; Sledz et al., 2003) und die Interferon-Antwort induziert wird. Die Aktivierung der Interferon-Antwort wird nicht bei den Ergebnissen mit siRNA-TUB1 beobachtet, welches als siRNA-Molekül in derselben Größe vorliegt und mit einer identischen Konzentration appliziert wird. Zur Positivkontrolle verabreichen wir *in vivo* intraventrikulär polyI:C, ein langes synthetisches dsRNA Homopolymer, welches eine obligate Steigerung der PKR-Konzentration bewirkt (Yang et al., 1995).

Unsere Beobachtungen sind vergleichbar mit einer Studie von Judge et al. (2005). Nach systemischer Verabreichung von synthetischer siRNA, die gegen β -Galactosidase gerichtet ist, lässt sich eine angeborene Immunantwort nachweisen. Diese ist abhängig von einer spezifischen Sequenz der siRNA (5'-UGUGU-3'; Judge et al., 2005). 5'-GUCCUCAA-3' ist eine weitere Sequenz, die in der Lage ist, eine Interferon-Antwort durch die Aktivierung des TLR3 (toll-like-Receptor-3) und/oder TLR7 zu induzieren (Hornung et al., 2005). Zytotoxische Effekte, welche unabhängig von einer Stress-Antwort sind, werden durch die Sequenz 5'-UGGC-3' induziert (Fedorov et al., 2006). Frühere Studien zeigen eine Abhängigkeit der Interferonantwort von der siRNA-Sequenz, der Sequenzlänge und des Zelltyps (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003; Lin et al., 2005). siRNA-TUB2 konnte in unserer Studie eine Interferon-Antwort induzieren, ohne dass eine der beschriebenen Sequenzen in der siRNA enthalten ist. Dies lässt vermuten, dass ein weiteres, bisher unbekanntes Motiv, off-target-Effekte induziert.

4.3 AKUTE NEURODEGENERATION DURCH siRNA-TUB2

Während bisher die off-target-Effekte auf Ebene der Genmodulierung gut dokumentiert ist (Lin et al., 2005), ist wenig bekannt über die Auswirkungen auf die Zellphysiologie. Wir untersuchen die Zellmorphologie der Neuronen nach Gabe von siRNA-TUB2. *In vivo* sind die neurodegenerativen Veränderungen nach siRNA-TUB2-Applikation vergleichbar mit den Ergebnissen nach polyI:C-Gabe.

Nach Applikation von siRNA-TUB2 oder polyI:C finden wir nach 72 Stunden signifikante Zeichen eines neuronalen Zelluntergangs. Nach intraventrikulärer Applikation von polyI:C stellt Melton in einer Säurefuchsin-Färbung nach sieben Tagen nekrotische Neuronen fest (Melton et al., 2003).

In den S^{35} -Transfektionsexperimenten haben die radioaktiv gekennzeichneten Neuronen einen pyknotisch erscheinenden Nukleus und ein geschrumpftes Zytoplasma. Der neuronale Zelluntergang ist assoziiert mit morphologischen Zeichen einer eosinophilen Degeneration in der HE-Färbung sowie der zytoplasmatischen Bindung von Fluoro-Jade (FJ). FJ ist ein anionisches Fluoresceinderivat, welches spezifisch an unbekannte Bindungsstellen von degenerativen

Neuronen bindet (Schmued and Hopkins, 2000). In der Fluoro-Jade-Färbung zeigen sich degenerative Nervenzellen in den periventriculären Arealen und belegen die zellulären Auswirkungen nach Gabe von siRNA-TUB2.

Untersuchungen mit Fluoro-Jade B belegen, dass sich nicht nur degenerative Neuronen, sondern auch Astrozyten im Gehirn eines Primaten anfärben lassen (Colombo and Puissant, 2002). Die Autoren zeigen, dass FJ Astrozyten-ähnliche Strukturen um Amyloid-Plaques in Gehirnen bei der Alzheimer Erkrankung anfärbt, und die FJ-Färbung nicht spezifisch für degenerative Neuronen ist. Eine andere Arbeitsgruppe konnte reaktive Astrozyten nach mechanischem Trauma im Rückenmark von Ratten nachweisen (Anderson et al., 2003) oder nach einer chronischen Prionen-Infektion (Schmued and Hopkins, 2000). In den Untersuchungen mit siRNA-TUB2 benutzen wir Fluoro-Jade B als Färbemethode zum Nachweis von degenerativen Neuronen im Gehirn, da weder traumatische, chronisch degenerative noch Prionen-Erkrankungen vorliegen. Es sollte dennoch bedacht werden, dass FJ nach Gabe von siRNA nicht als spezifischer Marker vorliegen muss.

In unseren Versuchen ist die akute Neurodegeneration assoziiert mit einer Vermehrung der Mikrogliazellen und der Astrozyten. Beide Zelltypen erkennen dsRNA über TLR3 und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNFalpha und Interleukin 6 (Bsibsi et al., 2002; Carpentier et al., 2005; Farina et al., 2005; Town et al., 2006).

Zahlreiche Studien zeigen, wie dsRNA akute Mikroglia-Aktivität induziert (Jacobs and Langland, 1996). Die Überproduktion von Interferon kann im ZNS, bei dem Vorhandensein einer Läsion, zu einer Neurodegeneration und zu einer Entzündungsreaktion führen (Renno et al., 1998; Jensen et al., 2000). Eine anschließende Induktion von weiteren Zytokinen könnte auch bei der akuten Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen, da diese bei der Aufrechterhaltung der chronischen Reaktion mitverantwortlich sind (Melton et al., 2003).

4.4 NICHTSTEROIDALE-ANTIPHLOGISTIKA (NSAIDs)

Bei unseren Versuchen reduziert die Verabreichung des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Ibuprofen die neurodegenerativen off-target-Effekte der siRNA-TUB2 nahezu vollständig.

Die Fluoro-Jade-Färbung zeigt nach der Gabe von Ibuprofen eine regelrechte Zellmorphologie von Glia- und Nervenzellen. Ibuprofen scheint keine Reduktion der Gliazellen zu bewirken. NSAIDs beeinflussen nicht direkt die Gliaaktivität (Melton et al., 2003). Der exakte Mechanismus des protektiven Effekts von NSAIDs ist noch ungeklärt (Blasko et al., 2001). Die nichtsteroidalen Antiphlogistika sind bei der Cyclooxygenase (COX)-Inhibition beteiligt. Es scheint, dass COX-2 für die Prostaglandinproduktion verantwortlich ist. Ibuprofen kann die Prostaglandinproduktion *in vivo* inhibieren (Yaksh et al., 2001). Prostaglandine können zu einer Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren aus Astrozyten führen (Malmberg and Yaksh, 1995; Bezzi et al., 1998). Die Inhibition von COX-2 durch Ibuprofen beeinflusst die Produktion von mehreren neurotoxischen Verbindungen und führt zur Reduktion der Neurotoxizität (Melton et al., 2003).

4.5 PRÄVENTION VON OFF-TARGET-EFFEKTEN

Off-target-Effekte werden zuerst von Jackson et al. beschrieben (Jackson et al., 2003) und können durch Genregulierung, die Induktion einer Interferon-Antwort, durch eine miRNA ähnliche Translationsinhibierung oder durch eine mRNA-Degeneration gekennzeichnet sein (Lin et al., 2005).

Die Reduktion der siRNA-Konzentration, die chemische Modifikation und die Veränderung des Designs der siRNA-Moleküle sind Ansätze, off-target-Effekte zu verringern.

Beobachtungen von Semizarov und Jackson weisen einen Zusammenhang der siRNA-Konzentration mit dem Auftreten von off-target-Effekten nach (Jackson et al., 2003; Semizarov et al., 2003). Bei einer siRNA-Konzentration von 100 nM wird in Mikroarray-Analysen eine vier- bis achtfache Erhöhung der unspezifischen Induktion von Genen registriert, welche die Aktivierung von Apoptosegenen beinhaltet. Nach einer Reduktion der siRNA-Konzentration auf 5 - 20 nM nehmen die off-target-Effekte ab (Semizarov et al., 2003).

In unserem Studiendesign ist die Effektivität der siRNA abhängig von deren Konzentration. Um einerseits eine optimale Effektivität der siRNA zu erreichen und andererseits off-target-Effekte zu vermeiden, könnten mehrere unterschiedliche siRNA-Sequenzen einer Zielsequenz mit jeweils einer Konzentration von 5 - 20 nM hergestellt und gleichzeitig appliziert werden (Semizarov et al., 2003).

Die chemische Modifikation des Strang- und Gegenstrangs der siRNA ist eine weitere Möglichkeit, off-target-Effekte zu minimieren (Jackson et al., 2006). O-Methyl-Gruppen, welche an der 2'-Position des Ribosyl-Ringes hinzugefügt werden, verändern die thermodynamischen und die Bindungseigenschaften der modifizierten Duplexe (Monia et al., 1993). Durch die 2'-Methyl-Substitution an drei Nukleotiden werden RISC-mRNA-Interaktionen geschwächt, dessen Basenpaarungen nur teilweise komplementär sind. Diese minimalen Modifikationen bewirken eine Reduktion der off-target-Effekte (Jackson et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit off-target-Effekte zu minimieren, wird durch die Veränderung des siRNA-Designs erreicht. Birmingham und Lin beobachten, dass off-target-Gene oft komplementäre Basenpaarungen zwischen der seed-Region der siRNA und der 3'-UTR (untranslated region) des off-target-Gens aufweisen (Birmingham et al., 2006). Bei dem Design der siRNA sollten möglichst wenige Basen mit der 3'-UTR-Region aller Gene komplementär sein, um die Spezifität der siRNA zu erhöhen (Lin et al., 2005).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die RNA-Interferenz ist eine effektive Methode zur gezielten Inaktivierung von Genen *in vivo*. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die intraventrikuläre Verabreichung von synthetisch hergestellter siRNA, welche gegen β -Tubulin gerichtet ist, konzentrationsabhängig eine Interferon-Antwort im zentralen Nervensystem der Ratte induziert. Es werden neurodegenerative Veränderungen *in vivo* hervorgerufen.

Nach der intrathekalen Gabe von siRNA oder von Polyinosinic Polycytidylic Acid (polyI:C) werden die Proteinlevel der Proteinkinase R (PKR) und des eukaryotischen Initiationsfaktors 2-alpha ($eIF2\alpha$) erhöht. polyI:C wird als potenter Induktor der Interferonantwort als Positivkontrolle verwendet und bewirkt eine obligate Steigerung der PKR-Konzentration. PKR und $eIF2\alpha$ sind beides Proteine, die bei der Signalvermittlung der Interferon-Antwort beteiligt sind. Die Interferon-Antwort steht in Verbindung mit einem neuronalen Zelluntergang in den periventrikulären Gebieten. Der neuronale Zelluntergang ist assoziiert mit morphologischen Zeichen einer eosinophilen Degeneration in der HE-Färbung sowie der zytoplasmatischen Bindung von Fluoro-Jade B (FJ). FJ bindet als anionisches Fluoresceinderivat spezifisch an unbekannte Bindungsstellen von degenerativen Neuronen. In den FJ-Färbungen zeigen sich die degenerativen Nervenzellen in den periventrikulären Arealen und belegen die zellulären Auswirkungen von siRNA.

Der erhöhte Proteingehalt der PKR und von $eIF2\alpha$ sowie die neurodegenerativen Veränderungen sind nach Gabe des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Ibuprofen rückläufig. Ibuprofen scheint die Induktion der allgemeinen Interferon-Antwort zu unterdrücken. Es wird eine regelrechte Zellmorphologie von Glia- und Nervenzellen nachgewiesen.

Die Beobachtung, dass siRNA neurodegenerative off-target-Effekte *in vivo* hervorruft, unterstreicht die Wichtigkeit eines effektiven Designs von siRNA-Sequenzen.

Insgesamt ist die RNA-Interferenz eine schnelle, kostengünstige und effektive Möglichkeit eine spezifische Inhibierung von neuronalen Genen *in vivo* zu erreichen. Durch die Inhibierung einzelner Gene ist es möglich, die Funktion dieser Gene besser zu verstehen, Therapiekonzepte zu entwickeln und Rückschlüsse auf die Bedeutung beim Menschen zu ziehen.

6 ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME

A	Ampere
Abb.	Abbildung
aCSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
Ago	Agoprotein
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AS-ODN	Antisense-Oligodesoxynukleotid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diamino-Benzidin-Tetrachlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dcr	Dicer
dsRBD	doppelsträngige Ribonukleinsäure-bindende Region
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
et al.	et alia
FJ	Fluoro-Jade B
Fmr	Fragiles-x-Mental Retardations-Protein
FvL	Frank van Landeghem
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
H1	Histon 1
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α -Rezeptor

ISG	Immunstimulierendes Gen
ISRE	Interferon-stimulated response elements
JAK	Janusfamilie
kg	Kilogramm
l	Liter
μ	Mikro
M	Mol
m	Meter
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
miRNA	micro-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
NSAID	Nichtsteroidales Antirheumatikum
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
OAS	Oligoadenylatsynthetase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PFA	Paraformaldehyd
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
polyI:C	Polyinosinic:Polycytidylic Acid
PKR	Proteinkinase R
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase H	Ribonuklease H
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SA	Stefan Angermair

SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
shRNA	short-hairpin-RNA
siRNA	short interference RNA
STAT	signal transducer and activators of transcription
Tab.	Tabelle
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure

7 LITERATURVERZEICHNIS

Anderson, K. J., I. Fugaccia, et al. (2003). "Fluoro-jade B stains quiescent and reactive astrocytes in the rodent spinal cord." J Neurotrauma **20**(11): 1223-31.

Bezzi, P., G. Carmignoto, et al. (1998). "Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes." Nature **391**(6664): 281-5.

Birmingham, A., E. M. Anderson, et al. (2006). "3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets." Nat Methods **3**(3): 199-204.

Blasko, I., A. Apochal, et al. (2001). "Ibuprofen decreases cytokine-induced amyloid beta production in neuronal cells." Neurobiol Dis **8**(6): 1094-101.

Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-95.

Bridge, A. J., S. Pebernard, et al. (2003). "Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells." Nat Genet **34**(3): 263-4.

Bsibsi, M., R. Ravid, et al. (2002). "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system." J Neuropathol Exp Neurol **61**(11): 1013-21.

Carmell, M. A. and G. J. Hannon (2004). "RNase III enzymes and the initiation of gene silencing." Nat Struct Mol Biol **11**(3): 214-8.

Carpentier, P. A., W. S. Begolka, et al. (2005). "Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli." Glia **49**(3): 360-74.

Carmell, M. A., Z. Xuan, et al. (2002). "The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis." Genes Dev **16**(21): 2733-42.

Colombo, J. A. and V. I. Puissant (2002). "Fluoro Jade stains early and reactive astroglia in the primate cerebral cortex." J Histochem Cytochem **50**(8): 1135-7.

- Damjanov, I. (1987). "Lectin cytochemistry and histochemistry." Lab Invest **57**(1): 5-20.
- Doi, N., S. Zenno, et al. (2003). "Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors." Curr Biol **13**(1): 41-6.
- Dykxhoorn, D. M., D. Palliser, et al. (2006). "The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs." Gene Ther **13**(6): 541-52.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2002). "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." Methods **26**(2): 199-213.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, et al. (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." Embo J **20**(23): 6877-88.
- Farina, C., M. Krumbholz, et al. (2005). "Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes." J Neuroimmunol **159**(1-2): 12-9.
- Fedorov, Y., E. M. Anderson, et al. (2006). "Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype." Rna **12**(7): 1188-96.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Guo, S. and K. J. Kemphues (1995). "par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed." Cell **81**(4): 611-20.
- Holen, T. and C. V. Mobbs (2004). "Lobotomy of genes: use of RNA interference in neuroscience." Neuroscience **126**(1): 1-7.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, et al. (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.

- Imada, K. and W. J. Leonard (2000). "The Jak-STAT pathway." Mol Immunol **37**(1-2): 1-11.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.
- Ivashkiv, L. B. and X. Hu (2004). "Signaling by STATs." Arthritis Res Ther **6**(4): 159-68.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, et al. (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." Nat Biotechnol **21**(6): 635-7.
- Jackson, A. L., J. Burchard, et al. (2006). "Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing." Rna **12**(7): 1197-205.
- Jackson, A. L. and P. S. Linsley (2004). "Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs?" Trends Genet **20**(11): 521-4.
- Jacobs, B. L. and J. O. Langland (1996). "When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA." Virology **219**(2): 339-49.
- Jaronczyk, K., J. B. Carmichael, et al. (2005). "Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others?" Biochem J **387**(Pt 3): 561-71.
- Jensen, M. B., I. V. Hegelund, et al. (2000). "IFN γ enhances microglial reactions to hippocampal axonal degeneration." J Neurosci **20**(10): 3612-21.
- Judge, A. D., V. Sood, et al. (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." Nat Biotechnol **23**(4): 457-62.
- Karpala, A. J., T. J. Doran, et al. (2005). "Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies." Immunol Cell Biol **83**(3): 211-6.
- Lin, X., X. Ruan, et al. (2005). "siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation." Nucleic Acids Res **33**(14): 4527-35.

- Malmberg, A. B. and T. L. Yaksh (1995). "Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats." J Neurosci **15**(4): 2768-76.
- Melton, L. M., A. B. Keith, et al. (2003). "Chronic glial activation, neurodegeneration, and APP immunoreactive deposits following acute administration of double-stranded RNA." Glia **44**(1): 1-12.
- Meister, G., M. Landthaler, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell **15**(2): 185-97.
- Meister, G. and T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." Nature **431**(7006): 343-9.
- Miller, V. M., H. L. Paulson, et al. (2005). "RNA interference in neuroscience: progress and challenges." Cell Mol Neurobiol **25**(8): 1195-207.
- Monia, B. P., E. A. Lesnik, et al. (1993). "Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression." J Biol Chem **268**(19): 14514-22.
- Persengiev, S. P., X. Zhu, et al. (2004). "Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)." Rna **10**(1): 12-8.
- Renno, T., V. Taupin, et al. (1998). "Interferon-gamma in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute EAE." Mol Cell Neurosci **12**(6): 376-89.
- Robertson, H. D., R. E. Webster, et al. (1968). "Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*." J Biol Chem **243**(1): 82-91.
- Samuel, C. E. (2001). "Antiviral actions of interferons." Clin Microbiol Rev **14**(4): 778-809, table of contents.

Saxena, S., Z. O. Jonsson, et al. (2003). "Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells." J Biol Chem **278**(45): 44312-9.

Scacheri, P. C., O. Rozenblatt-Rosen, et al. (2004). "Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 1892-7.

Schmued, L. C. and K. J. Hopkins (2000). "Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration." Brain Res **874**(2): 123-30.

Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2002). "Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways." Mol Cell **10**(3): 537-48.

Semizarov, D., L. Frost, et al. (2003). "Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6347-52.

Sledz, C. A., M. Holko, et al. (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." Nat Cell Biol **5**(9): 834-9.

Snove, O., Jr. and T. Holen (2004). "Many commonly used siRNAs risk off-target activity." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 256-63.

Song, J. J., S. K. Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science **305**(5689): 1434-7.

Thakker, D. R., F. Natt, et al. (2004). "Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17270-5.

Tolia, N. H. and L. Joshua-Tor (2007). "Slicer and the argonautes." Nat Chem Biol **3**(1): 36-43.

Tomari, Y., T. Du, et al. (2004). "RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage." Cell **116**(6): 831-41.

Town, T., D. Jeng, et al. (2006). "Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3." J Immunol **176**(6): 3804-12.

van Landeghem, F. K., S. Schreiber, et al. (2003). "Differential Concentration-Dependent Effects of Prolonged Norepinephrine Infusion on Intraparenchymal Hemorrhage and Cortical Contusion in Brain-Injured Rats." J. Neurotrauma **20**(12): 1327-37.

van Landeghem, F. K., J. F. Stover, et al. (2001). "Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat." Glia **35**(3): 167-79.

von Moers, A., A. Zwirner, et al. (2005). "Increased mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in Duchenne muscular dystrophy." Acta Neuropathol (Berl) **109**(3): 285-93.

Williams, B. R. (1999). "PKR; a sentinel kinase for cellular stress." Oncogene **18**(45): 6112-20.

Williams, B. R., C. S. Gilbert, et al. (1979). "The respective roles of the protein kinase and pppA2' p5' A2' p5 A-activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by double stranded RNA in rabbit reticulocyte lysates." Nucleic Acids Res **6**(4): 1335-50.

Whitehead, K. A., L. Langer, et al. (2009). "Knocking down barriers: advances in siRNA delivery." Nat Rev Drug Discov. **8**(2): 129-38.

Yadava, P., D. Roura, et al. (2007). "Evaluation of Two Cationic Delivery Systems for siRNA." Oligonucleotides **17**(2): 213-22.

Yaksh, T. L., D. M. Dirig, et al. (2001). "The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1." J Neurosci **21**(16): 5847-53.

Yang, Y. L., L. F. Reis, et al. (1995). "Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase." Embo J **14**(24): 6095-106.

Yu, J. Y., S. L. DeRuijter, et al. (2002). "RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6047-52.

Zamore, P. D. (2002). "Ancient pathways programmed by small RNAs." Science **296**(5571): 1265-9.

Zeng, Y., R. Yi, et al. (2003). "MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9779-84.

Zhang, H., F. A. Kolb, et al. (2002). "Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP." Embo J **21**(21): 5875-85.

Zhang, H., F. A. Kolb, et al. (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell **118**(1): 57-68.

Zhou, A., B. A. Hassel, et al. (1993). "Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action." Cell **72**(5): 753-65.

8 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Ich, Stefan Angermair, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Akute Neurodegeneration nach intraventrikulärer Injektion von synthetisch hergestellter siRNA im Gehirn der Ratte selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 12. Januar 2010

Stefan Angermair