

**Aus dem Zentrum für Neurologie
Neurologische Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Kognitive Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-P. Thier**

**GABA_Aβ₃-Knock-Down
mittels siRNA-Injektion (RNAi)
mit kombinierter Elektroporation
im Neokortex junger Ratten**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Patricia Szponik
aus Dortmund**

2011

Dekan: Professor Dr I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-P. Thier

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Schaeffel

**Meinen lieben Eltern
Elisabeth und Franz-Josef
gewidmet.**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gamma-Aminobuttersäure (GABA)	1
1.1.1 Die synaptische Übertragung von GABA	2
1.2 GABA_A-Rezeptor	3
1.2.1 GABA _A -Untereinheiten	5
1.2.2 Schematische Darstellung eines GABA _A -Rezeptors	6
1.2.3 GABA _A Beta ₃ -Untereinheit	6
1.3 Limitation von Knock-Out Versuchen und Alternativen	10
1.4 RNA-Interferenz	11
1.4.1 Mechanismus und Funktion der RNA-Interferenz	12
1.4.2 Schematische Darstellung der RNAi	16
1.5 siRNA Transfer	17
1.5.1 Virale Vektoren	18
1.5.2 Elektroporation	21
1.5.2.1 Schematische Darstellung einer Elektroporation	24
1.6 Fragestellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Tiere und Anästhesie	25
2.2 Injektion der siRNA und Elektroporation	25
2.2.1 Kontrollen	27
2.3 Gewebeentnahme und Frontalschnitt	27
2.4 RNA Isolation	28

2.5 DNA-freie Reaktion	29
2.6 Photometrische Bestimmung	29
2.7 Reverse Transkription	29
2.8 Real-Time-PCR	30
2.8.1 Primer-Sequenzen	31
2.8.2 Amplicon-Sequenzen	31
2.8.3 Real-Time-PCR Procedure	32
2.9 Datenanalyse	32
2.9.1 Standardkurve	34
2.9.2 Die relative Genregulation	35
2.9.3 Statistik	36
3. Ergebnisse.....	38
4. Diskussion.....	45
4.1 Mögliche Nebeneffekte der Elektroporation und Spezifität der Knock- Down Raten.....	45
4.2 Art der Gewebeentnahme	46
4.3 siRNA-Konzentration und RNAi	47
4.4 siRNA-Transfer.....	48
4.5 Interferonantwort	48
4.6 Schlussfolgerung und Perspektiven	49
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literaturverzeichnis	52
7. Danksagung	66

8. Lebenslauf.....67

1. Einleitung

1.1 Gamma-Aminobuttersäure (GABA)

Gamma-Aminobuttersäure ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des motorischen Systems im Zentralnervensystem von Säugetieren. Etwa ein Drittel aller Synapsen im Säugerhirn sind GABAerg (Bloom et al., 1971; Turner et al., 1983). Die meisten GABAergen Neurone sind inhibitorische Interneurone, d.h. Neurone mit kurzem Axon und lokaler Verschaltung (Goodchild, 1993). GABA ist im ZNS weit verbreitet, wobei insgesamt höhere Konzentrationen im Vergleich zu anderen Neurotransmittern gefunden wurden (Enna et al., 1976). Die höchsten Konzentrationen finden sich in den Basalganglien, im Hippokampus, im Kleinhirn und im Hypothalamus, sowie in den Rückenmarks-Hinterhörnern (Goodchild, 1993).

Im Zytosol einer Nervenzelle findet sich eine Konzentration von 50-150µM (Fykse et al., 1988) während der extrazelluläre Spiegel unter 1µM liegt (Erecinska, 1987). Im peripheren Gewebe sowie in Organen wie Leber, Niere und Pankreas kann GABA ebenfalls in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Das im Gehirn vorkommende GABA ist endogenen Ursprungs, da es in der Regel nicht für die Blut-Hirn-Schranke durchlässig ist. Es entsteht im Stoffwechsel aus Glukose, welche über den Zitratzyklus in α -Ketoglutarensäure und weiter durch die Pyridoxal-5-Phosphat-Transaminase (PALP) in den Mitochondrien der GABAergen Neurone in Glutamat umgewandelt wird. Glutamat wird dann wiederum ins Zytosol transportiert und dort mit Hilfe der Glutaminsäuredecarboxylase (GAD) zur GABA metabolisiert. Es sind zwei Isoformen der GAD bekannt, die sich unter anderem in ihrer Größe und Aminosäuresequenz unterscheiden. Sie werden entsprechend der Sequenzlänge GAD₆₅ und GAD₆₇ genannt (Erlander et al., 1991). Die GAD₆₅ liegt hauptsächlich als inaktives, PALP-abhängiges Apoenzym vor, während die GAD₆₇ zu einem großen Anteil als aktives, bereits an PALP gebundenes Holoenzym zur Verfügung steht. Nach Kaufman, Houser und Tobin (1991) zeigen lediglich Inhibitoren PALP-abhängiger Enzyme einen Einfluss auf die Aktivität des GAD₆₅-Isoenzym.

Ein weiterer Unterschied findet sich in der subzellulären Verteilung der Isoenzyme. Während die GAD₆₅ hauptsächlich in Terminalien von GABAergen Neuronen gefunden werden konnte, zeigte sich von GAD₆₇ eher eine gleichmäßige Verteilung in Zellkörpern und Nervenendigungen (Esclapez et al., 1994). Es wird davon ausgegangen, dass GAD₆₅ mit vesikulären Membranen assoziiert und somit für die Produktion vesikulär freigesetzter GABA verantwortlich ist. Dahingegen wird GAD₆₇ mit der Produktion von GABA-Molekülen eines nicht-vesikulären GABA-Pools in Verbindung gebracht (Ruppert et al., 1993).

Bereits ab dem 12.Tag des Embryonalstadiums lässt sich GABA im ZNS von Nagern nachweisen (Lauder et al., 1986; Lauder et al., 1998). Es konnte in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden, dass das GABAerge Neurotransmittersystem eine wesentliche Rolle in der Beeinflussung der neuronalen Entwicklung (Michler et al., 1990; Barbin et al., 1993; Liu et al., 1997), des neuronalen Überlebens (Liu et al., 1997; Ikeda et al., 1997; Fiszman et al., 1999), der Synaptogenese (Belhage et al., 1998), Zellproliferation (Fiszman et al., 1999) und Zellmigration (Behar et al., 1994; Behar et al., 2000) spielt. Bei bestimmten Epilepsieformen, bei Angststörungen, sowie Lern und Gedächtnisdefiziten können Störungen des GABA-Systems vorliegen (Goodchild, 1993).

1.1.1 Die synaptische Übertragung von GABA

Durch ein ankommendes Aktionspotential an der präsynaptischen Membran werden spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert, was zum Einstrom extrazellulären Kalziums in die Zelle führt und die Freisetzung des Transmitters GABA aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt bewirkt (Katz et al., 1970; Haycock et al., 1978; Sandoval, 1980; McMahon et al., 1991). Anschließend diffundiert GABA durch den synaptischen Spalt und binden an GABA-spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Die Bindung von GABA an seinen spezifischen Rezeptor bewirkt die Entstehung eines IPSCs (inhibitorischen postsynaptischen Stromes) durch Einstrom von Chlorid, was wiederum die Entstehung eines IPSPs (inhibitorisches postsynaptisches

Potential) zur Folge hat. Das heißt, eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran (Sakmann et al., 1983; Schofield et al., 1987; Betz, 1990; Stephenson, 1991; DeLorey et al., 1992; Laurie et al., 1992; Macdonald et al., 1994; Tyndale et al., 1994; Jones et al., 1995; Smith et al., 1995; Klinke, 1996; Waldvogel et al., 2008). Die Dauer eines IPSCs bestimmt die Dauer der Hyperpolarisation. Eine Verlängerung von GABAergen IPSCs ist demnach ein entscheidender Mechanismus für die zentral-hemmende Wirkung durch Veränderung der Rezeptorkinetik bzw. der Zeitkonstante durch Benzodiazepine oder Anästhetika (Tanelian et al., 1993).

1.2 Der GABA_A-Rezeptor

Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren sind Transmembranproteine in Neuronen, an die spezifisch der Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) bindet und die innerhalb des Zentralnervensystems postsynaptisch lokalisiert sind. GABA_A-Rezeptoren kommen gehäuft in den Basalganglien und im Cerebellum vor. Diese Bereiche sind vor allem für die Steuerung der Motorik zuständig. Im Rückenmark befinden sich GABA_A-Rezeptoren auf Motoneuronen. Sie sind an der Reflexverschaltung ebenso wie der Koordination von Bewegungsabläufen beteiligt.

Es werden ionotrope (GABA_A, GABA_C) und metabotrope (GABA_B) GABA-Rezeptoren unterschieden. GABA_A-Rezeptoren kontrollieren Chloridkanäle. Das Molekulargewicht des GABA_A-Rezeptor-Komplexes beträgt etwa 300 kDa (Kuriyama et al., 1993). Es handelt sich bei GABA_A-Rezeptoren um Heteropentamere (Sanchis-Segura et al., 2007), die sich aus fünf Untereinheiten (UE) zusammensetzen. Sie besitzen eine Bindungsstelle für GABA sowie weitere allosterische Bindestellen für Barbiturate und Neurosteroiden, die die Öffnungsdauer der Chloridkanäle verlängern und für Benzodiazepine, welche die Öffnungswahrscheinlichkeit der Chloridkanäle erhöhen. So wird die hemmende Wirkung des GABA_A-Rezeptors gesteigert.

Aufgrund der dadurch möglichen Manipulation der GABA_A-Rezeptoren wird dieser häufig als Zielrezeptor pharmakologischer Intervention genutzt (Fritschy et al., 1992; Forth et al., 1996; Walker, 2008; Herd et al., 2008).

Die GABA_A-Rezeptoren sind im menschlichen Gehirn und Rückenmark zum größten Teil aus zwei α -, zwei β - und einer γ -UE aufgebaut (Fritschy et al., 1995). Sie variieren allerdings in der Kombination ihrer UE je nach Hirnregion und bis heute fehlt eine umfassende Beschreibung aller UE (Wafford et al., 1994; Mohler et al., 1996; Gutiérrez et al., 2006; Li et al., 1997; Herd et al., 2008). Durch die verschiedenen Kombinationen der UE werden die entsprechenden GABA_A-Rezeptoren jeweils unterschiedlich stark durch Substanzen wie Pharmaka beeinflusst. Störungen bzw. Manipulationen im GABAergen System werden für viele neurologische und psychiatrische Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson, Epilepsie, Morbus Alzheimer oder auch Schizophrenie verantwortlich gemacht (Mohler et al., 1990; Connolly et al., 1996; Mizukami et al., 1998; Steiger et al., 2004; Hempelmann et al., 2007). Sie tragen auch zur Entstehung und Ausbreitung epileptischer Anfallsaktivität, Angststörungen und Sucht bei. Genau so wie GABA werden auch GABA_A-Rezeptoren mit ihren UE im frühen Embryonalstadium von Ratten in Hirnstamm (ab dem 14.Embryonaltag), Medulla und Pons (ab dem 15.Embryonaltag) entwickelt (Ugarte et al., 2001). Somit ist die Manipulation von GABA_A-Rezeptoren im zentralen Nervensystem von Ratten im neonatalen wie auch im adulten Alter möglich (Fritschy et al., 1994). Auf Grund der guten Handhabbarkeit bezüglich der Anästhesie (geringe Anästhetikummenge, intraperitoneale Injektion) und Präparation (weiche Schädelkalotte, einfach zu trepanieren), kürzerer Wartezeit bis zum erreichten Präparationsalter und der kostengünstigeren jungen Tieren wurde in dieser Arbeit mit 12-15 Tage alten Sprague Dawley (SD) Ratten gearbeitet.

1.2.1 GABA_A-Untereinheiten

In Säugetieren sind 19 unterschiedliche Polypeptide bekannt, die als UE des GABA_A-Rezeptors fungieren können: alpha₁-alpha₆, beta₁-beta₃, gamma₁-gamma₃, delta, epsilon, pi₁-pi₃, theta und rho (Fritschy et al., 1995; Whiting et al., 1999; Darlison et al., 2005; Waldvogel et al., 2008; Herd et al., 2008).

Laut Li et al. (1997) haben die α-, β- und γ-UE in Ratten eine Peptidgröße von 57, 55 und 57kDa. Jede UE des GABA_A-Rezeptors besteht aus einem langen, extrazellulären globulären Anteil, vier hydrophoben transmembranären α-Helices und einem globulären intrazellulären Anteil zwischen der dritten und vierten Transmembranregion (Betz, 1990; Olsen et al., 1990; Stephenson, 1991; DeLory et al., 1992; Macdonald et al., 1994; Tyndale et al., 1994; Smith et al., 1995; Jensen et al., 2002).

Innerhalb der UE-Klassen (α, β, γ, pi) besteht eine 70-80%ige Aminocarbonsäure-Sequenz-Gleichheit, während sie zwischen den Klassen bei 30-50% liegt (Tyndale et al., 1994). Von den vielen möglichen UE-Kombinationen kommen in der Natur allerdings nur relativ wenige vor (Hirouchi et al., 1994). Die im menschlichen ZNS am häufigsten anzutreffende Kombination eines Rezeptors ist 2α₁2β₂1γ₂ (Fritschy et al., 1995; Chang, 1996). Diese sieben Klassen homologer variabel angeordneter UE bilden einen zentralen Kanal, um Chloridionen durch die Zellmembran leiten zu können. GABA_A-Rezeptoren mit β-UE sind hauptsächlich im Telencephalon, im Hippokampus, im Thalamus und Cerebellum lokalisiert. Nach Benke et al. (1994) beinhalten die meisten GABA_A-Rezeptoren jeweils nur einen Typ der GABA_Aβ-UE.

1.2.2 Schematische Darstellung eines GABA_A-Rezeptors

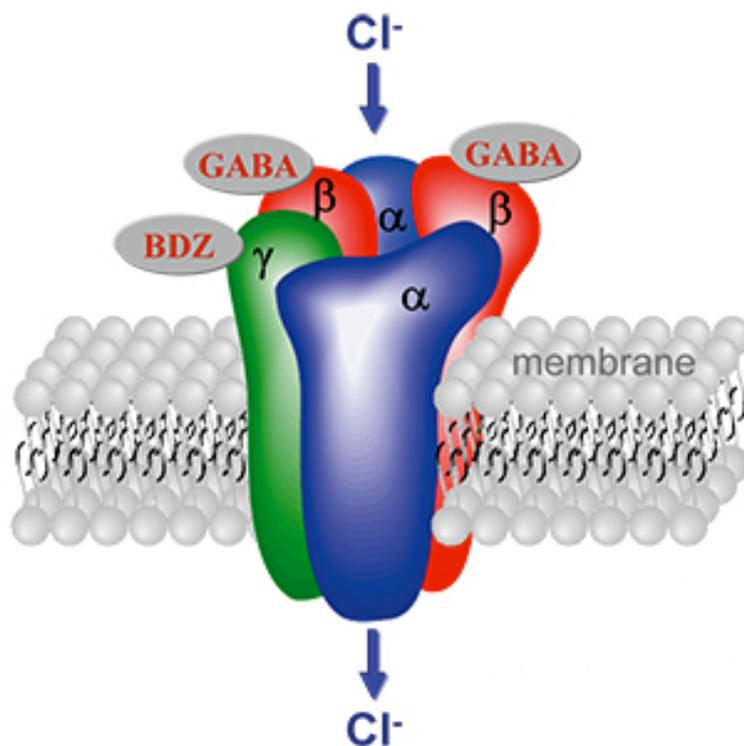


Abbildung 1.2.2: Schematische Darstellung eines GABA_A-Rezeptors. Er besteht aus 5 Untereinheiten (UE), i.d.R. aus 2α-, 2β- und 1γ-UE. Die bevorzugten Bindungsstellen für GABA sind die α- und β-UE. Für Benzodiazepine die α- und γ-UE. Für Barbiturate und Neurosteroidoide die β-UE. Die UE bilden einen zentralen Chloridionenkanal. (Quelle: Rupprecht R., 2003)

1.2.3 GABA_ABeta₃-Untereinheit

Die für diese Arbeit relevante GABA_Aβ₃-UE wird in einem Gen von 250kb kodiert mit 9 Exons in der Größe von 68-504bp (Glatt et al., 1997). Durch Immunhistologie mit spezifischen Antikörperbindungen der Benzodiazepine N-(methyl-³H) Flunitrazepam (FNZ) und (Methylen-³H) Muscimol konnte der GABA_Aβ₃-Rezeptor mit einem 64%-igem Anteil im Hippokampus, einem 48%-igem Anteil im zerebralen Cortex und einem 33%-igem Anteil im Cerebellum nachgewiesen werden (Li et al., 1997).

Es konnte ebenso eine hohe Aktivität des GABA_Aβ₃-Gens (GABA_A-Rezeptor-UE-β₃) während der Embryogenese beobachtet werden. Das GABA_Aβ₃-Gen befinden sich auf dem Chromosomenabschnitt 15q11-q13, dessen Mutation für das Angelman-Syndrom (AS) und das Prader-Willy-Syndrom verantwortlich gemacht wird (Wagstaff et al., 1991; Knoll et al., 1993; Greger et al., 1995; Glatt et al., 1994). Daraus lässt sich schließen, dass das GABA_Aβ₃-Gen eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des Zentralnervensystems und bei der Verhaltenskontrolle spielt. Die GABA_Aβ₃-UE hat einen Anteil von 19-25% an GABA_A-Rezeptoren während der GABA_Aβ₂-UE- Anteil 55-60% beträgt und GABA_Aβ₁-UE einen Anteil von 16-18% hat (Benke et al., 1994). Pharmakologisch unterscheiden sich Rezeptoren mit der GABA_Aβ₂-UE von denen mit der GABA_Aβ₁-UE oder GABA_Aβ₃-UE in ihrer ungleichen Affinität für Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden (Benke et al., 1994). Nach Benke et al. (1994) ist z.B. die Affinität für Zolpidem in Rezeptoren, welche die GABA_Aβ₁-UE oder GABA_Aβ₃-UE beinhalten, um das 5-8-fache geringer, als für Rezeptoren, welche die GABA_Aβ₂-UE einbinden. Es ist des Weiteren bekannt, dass GABA_Aβ₃ im Thalamus an der Einleitung und Aufrechterhaltung des Wach-Schlaf-Rhythmus beteiligt ist (Laposky et al., 2001; Hamet et al., 2006; Zecharia et al., 2009).

In einer wissenschaftlichen Arbeit von Jensen et al. (2002) wurde mit mutierten GABA_Aβ₃ gearbeitet. Sie fanden unter anderem heraus, dass 3μM Zink die GABA-Antwort um 63 ± 6% beim mutierten und um 95 ± 1% beim WT-Rezeptor blockiert. Ebenfalls blockt Bicucullin die GABA-Antwort zu 38 ± 1% in mutierten α₂β₃SG-EK-Rezeptoren und um 59 ± 7% in WT-α₂β₃-Rezeptoren. Sie erforschten so die Rolle der GABA_Aβ₃-UE innerhalb der Porenformation der GABA_A-Rezeptor-UE. Sie zeigten, dass die GABA_Aβ₃-UE insbesondere für die Ionen-Selektivität für Chloridionen zuständig ist.

Zecharia et al. (2009) untersuchten in einer in vitro Studie GABAnerge IPSCs im Nukleus tuberomamillaris (TMN) des Hypothalamus sowie IPSCs aus der Area perifornicalis (Pef.) des lateralen Hypothalamus und IPSCs aus dem Locus coeruleus (LC) in Wildtyp-Mäusen (WT) und Mäusen mit einer Mutation der GABA_Aβ₃-UE (β₃N265M) unter Propofol-Einfluss.

Ihre Ergebnisse zeigten, dass IPSCs der WT-Neurone aus Pef., TMN und LC sensitiv auf Propofol reagierten. Die durchschnittliche Dauer des Abklingens des IPSC stieg in Pef.-Neuronen von $20,6 \pm 2,3\text{ms}$ auf $41,0 \pm 5,2\text{ms}$, in TMN-Neuronen von $25,1 \pm 1,6\text{ms}$ auf $54,4 \pm 6,2\text{ms}$ und in LC-Neuronen von $36,5 \pm 3,6\text{ms}$ auf $62,4 \pm 5,8\text{ms}$. Im Vergleich zu den WT-Neuronen zeigten die Pef- und TMN-Neuronen der $\beta_3\text{N265M}$ -Mäuse keine signifikante Veränderung der Reizempfindlichkeit durch Propofol. Sie konnten damit eine Sensitivität des $\text{GABA}_A\beta_3$ -Rezeptors auf das Anästhetikum Propofol nachweisen.

Die $\text{GABA}_A\beta_3$ -UE spielt nach Jovanovic et al. (2004) eine wesentliche Rolle in der Phosphat-abhängigen Regulation des GABA_A -Rezeptors. Sie testeten den Phosphorylierungszustand der $\text{GABA}_A\beta_3$ -UE in vitro unter Gabe des Neurotrophins BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und fanden heraus, dass dies zu einer Erhöhung der IPSC-Amplitude gefolgt von einer andauernden Absenkung führte. Diese Beobachtung ging mit einem schnellen Anstieg der Phosphorylierung der $\text{GABA}_A\beta_3$ -UE an den intrazellulären Positionen der Aminosäurereste Serin 408 (S408) und Serin 409 (S409) durch die Proteinkinase C (PKC) einher, entsprechend gefolgt von einer Dephosphorylierung des GABA_A -Rezeptors durch die Protein-Phosphatase-2 (PP2A). Durch die Phosphorylierung der S408/409 im $\text{GABA}_A\beta_3$ -Rezeptor kann somit der $\text{GABA}_A\beta_3$ -Rezeptor in seiner Aktivität beeinflusst werden.

Auch Houston et al. (2008) berichten in ihrer Arbeit von einem Anstieg der Dauer des Abklingens der IPSCs durch Beeinflussung der $\text{GABA}_A\beta_3$ -Rezeptoren durch in vitro Phosphorylierung mit Hilfe der Kalzium/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (α -CaMK-II). Sie beschreiben eine Erhöhung der Dauer des Abklingens der IPSCs von $26,1 \pm 1,7\text{ms}$ auf $49,9 \pm 5,7\text{ms}$.

Jurd et al. (2002) prüften in ihrer Arbeit die Wirkung der Hypnotika Etomidat und Propofol in vivo in Mäusen mit einer Punktmutation (N265) in der zweiten Transmembrandomäne des $\text{GABA}_A\beta_3$ -Rezeptors ($\beta_3\text{N265M}$). Das auffälligste Ergebnis war, dass die Unterdrückung der durch Noxen hervorgerufenen Vorgänge unter Etomidat und Propofol komplett aufgehoben wurde und die schmerzlindernde Antwort auf diese Mittel signifikant reduziert war.

Jurd et al. (2002) vermuten, dass ein spezifischer Rest (N265), welcher im GABA_Aβ₃-Rezeptor lokalisiert sein soll, für die Vermittlung der Verhaltensantwort auf bestimmte Anästhetika, wie die oben benannten, von großer Relevanz sein muss. Elektrophysiologisch und biochemisch wurde bestätigt, dass ein Teil des GABA_Aβ₃-Rezeptors in β₃N265M den Prozess von üblichen klinischen Anästhetika beeinflussen soll. Jurd et al. (2002) beobachteten in diesem Zusammenhang eine signifikante Reduktion der spontanen Aktionspotentiale in GABA_Aβ₃-Rezeptor positiven neokortikalen Zellen in β₃N265M-Mäusen.

In einer weiteren Arbeit von Drexler et al. (2006), ebenfalls an β₃N265M-Mäusen, wurde bei Konzentrationen zwischen dem MAK-„awake“ (MAK= minimale alveoläre Konzentration, bei der 50% der Patienten die Augen öffnen) und MAK-„immobility“ (minimale alveoläre Konzentration eines Inhalationsnarkotikums, bei der 50% aller Patienten auf einen Hautschnitt nicht mehr reagieren =„chirurgischer MAK“) eine zur sedativen Wirkung von Enfluran im Neokortex beitragende Beeinflussung durch GABA_Aβ₃-Rezeptoren beobachtet. Die β₃N265M soll einerseits einen prolongierenden, andererseits einen blockierenden Effekt auf Enfluran an GABA_Aβ₃-Rezeptor-vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Strömen in neokortikalen Neuronen haben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass genetische Manipulation des GABA_Aβ₃-Rezeptors nötig sind, um den Rezeptor zu beherrschen und dessen Aktivität zu kontrollieren. Damit kann in das Dopamin-System eingegriffen werden, was mit einer veränderten Ausführung von motiviertem Verhalten korreliert. Die funktionelle Bedeutung der UE wird deutlich, wenn das entsprechende Gen ausgeschaltet wird. Dies kann unter anderem durch Knock-Out-Mäuse erreicht werden.

1.3 Limitation von Knock-Out Versuchen und Alternativen

Ein Knock-Out-Versuch ist ein gezielter Gen-Knock-Out am lebenden Tier, also eine Deaktivierung eines oder auch mehrerer gezielter Gene mittels genetischer Manipulation. Das bedeutsamste Merkmal der genetischen Manipulation für Knock-Outs ist die Spezifität für ein Zielgen zum Ausdruck zu bringen. Als Versuchstieren werden dafür hauptsächlich Mäuse genutzt. Diese Gendeaktivierung wird durch Manipulation der embryonalen Stammzellen, die dann in die Keimbahn einer Maus eingebracht werden, erzeugt. Diese Methode hat allerdings nennenswerte Limitationen. Ein Nachteil des klassische Knock-Out-Ansatzes ist, dass sich auf diese Weise weder Gene hinzufügen noch aktivieren lassen. Die Knock-Outs sind also irreversibel und somit schlecht zu steuern. Sie beeinflussen den gesamten Organismus systemisch, da das manipulierte Gen in jeder einzelnen Zelle ausgeschaltet wird. Somit kann mit dieser Methode kein spezifisches Organ oder Gewebe einzeln und gezielt lokal beeinflusst werden. Wenn also Gene ausgeschaltet werden, die für die Entwicklung und das Überleben in der frühen embryonalen- und postnatalen Phase notwendig sind, sind die Entwicklung sowie die Überlebensfähigkeit der Versuchstiere kritisch zu betrachten. Dem entsprechend kommt es zu einer hohen Anzahl an Nebenwirkungen bis hin zum Versterben der Tiere in der Entwicklungsphase. In klassischen Knock-Out-Ansätzen ist keine Gen-expression zum späteren Zeitpunkt (z.B. in einer späteren Entwicklungsphase) möglich. Hinzu kommt, dass wenn ein Gen erst einmal eliminiert ist, das Ausgangsstadium nicht wieder hergestellt werden kann. Somit können auch keine Verhaltensprozesse an Knock-Out-Versuchstieren untersucht werden, da dieses eine mögliche Wiederherstellung vom Ausgangsstadium zum Vergleich voraussetzen würde. Man weiß nicht genau, welche Schäden der entsprechende Knock-Out mit sich bringt. Ebenso könnten Kompensations-Mechanismen in der Entwicklungsphase dazu führen, dass der Phänotyp sich unterschiedlich ausbildet und somit durch andere Gene reguliert wird. Einige Probleme dieser Methode wurden durch neue Varianten der Technik bis zu einem bestimmten Grad überwunden (Tsien et al., 1996). Die Erzeugung von Knock-Out-Mäusen ist allerdings immer noch mit hohen Kosten verbunden.

Des Weiteren ist man auf bestimmte Tiergruppen beschränkt. Tiere mit komplexeren kognitiven Funktionen, wie z.B. der Rhesusaffe, sind für Knock-Out-Versuche ungeeignet, da die Zeitspanne für eine Aufzucht über Generationen bis zu ihrer jeweiligen Reifealter viele Jahre dauern würde. Um die Nachteile der Knock-Out-Methode zu umgehen können andere Techniken angewandt werden, mit denen gezielt in bestimmten Arealen Gene beeinflusst werden können, wie z.B. der GABA_Aβ₃-Rezeptor im Neokortex junger Ratten. Eine alternative Methode zur Manipulation einer Zielgenexpression ist die RNA-Interferenz (RNAi). Bei dieser Technik wird small interfering RNA (siRNA) zur Hemmung der Zielgenexpression eingesetzt, die aus doppelsträngiger RNA von 21-23 Nukleotiden Länge besteht (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2002) Mit dem Einschleusen der siRNA in einer begrenzten Zielregion im Gehirn mittels Elektroporation wurde eine neuartige Methode entwickelt, die es ermöglicht, durch einen geringen zeitlichen Aufwand lokal eine Reduktion der Ziel-Genexpression zu erzeugen. Hinzu kommt, dass mit reversibler RNAi ein temporärer Effekt erzielt werden kann. Dies könnte in Zukunft eine nützliche Rolle für die zeitliche Manipulation eines Gens im ZNS und damit für die Erforschung des funktionellen Vorganges in der gezielten Hirnregion spielen.

1.4 RNA-Interferenz

Als RNA-Interferenz (RNAi) oder RNA-Silencing ist ein intrinsischer Mechanismus, der durch small interfering RNA (siRNA) vermittelt wird. RNAi reguliert post-transkriptionell die Genexpression und bewirkt genspezifisch eine Verringerung der mRNA-Expressionsrate. Er tritt in eukaryontischen Zellen von Pflanzen, Tieren und auch beim Menschen auf und trägt Anteil an der Genregulation. Dieser Prozess bewirkt also eine Hemmung der Genexpression bestimmter einzelner Gene.

Bis zur Entdeckung der RNA-Interferenz Ende der 90er Jahre wurde Ribonukleinsäure (RNA) nur in klassischen Konzepten die Rolle einer einsträngigen Botensubstanz zugeteilt. Guo und Kemphues (1995) zählen zu den ersten, die in ihrer Arbeit von RNA-Interferenz in *Caenorhabditis elegans*

durch eine mRNA zielerkennende spezifische Sense-RNA und Antisense-RNA mit folgender Degradierung dieser mRNA und embryonaler Letalität berichten. Das Schlüsselexperiment zum Verständnis dieses Prozesses wurde von Fire et al. (1998) veröffentlicht, die RNA-Interferenz als eine zur Ziel-mRNA komplementäre doppelsträngige RNA (dsRNA) beschreiben, die zu einem spezifischen Knock-Down des Zielgens führt. Dies belegten sie am Beispiel des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, dessen Muskelfunktion durch doppelsträngige RNA beeinflusst wurde, die passend zur entsprechenden Gensequenz des Erbguts war. Im Jahre 2006 teilten sich die beiden US-Wissenschaftler Andrew Z. Fire und Craig C. Mello für die Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

1.4.1 Mechanismus und Funktion der RNA-Interferenz

RNAi-Interaktion doppelsträngiger RNA vermindert mRNA-Expression. RNAi kann auf dem Einsatz von doppelsträngiger RNA in Form von Micro-RNA (miRNA), piwi-interacting RNA (piRNA) oder small interfering RNA (siRNA) basieren. piRNAs bestehen aus 26-31 Nukleotiden (nt) und sind für die Bindung an PIWI-Proteine zuständig (Saito et al., 2007). Sie befinden sich ausschließlich in Geschlechtszellen, wo sie essentiell für die Spermatogenese sind und sich an der Gene-Silencing von Retrotransposons beteiligen (Grivna et al., 2006; Beyret et al., 2006). Die miRNA ist 17-24nt lang und wird innerhalb des Genoms durch RNA-Polymerase II aus pre-miRNA transkribiert (Ruvkun G., 2001). siRNAs sind 21-23nt lang, sie entsteht durch das Zerschneiden einer längeren doppelsträngigen RNA (dsRNA) in kurze Bruchstücke (Elbashir et al., 2002). In der Regel stammt diese dabei aus Transposons oder RNA-Viren (Ambros et al., 2003). siRNAs sind in der Lage sich an eine komplementäre Sequenz der mRNA zu binden und dadurch ihren Schnitt zu veranlassen (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000).

Bei dem Versuch, die von Mello und Fire verwendete Strategie der RNAi durch Injektion genspezifischer Doppelstrang-RNA-Molekülen auf Wirbeltiere zu übertragen, traten jedoch erhebliche Probleme auf, da die verwendeten Zellen die langen doppelsträngigen RNAs nicht zu tolerieren schienen. Durch die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) kam es zum Zelltod durch Apoptose.

Elbashir et al. (2001) stellten fest, dass mRNA-Manipulationen über konventionelle Antisense-RNA-Wege mit RNAs >30 Nukleotiden im Gegensatz zur siRNA keine RNAi zeigten. Dieses Problem konnte umgangen werden, indem kurze doppelsträngige RNAs (=dsRNA) von 21nt Länge verwendet wurden, die in der Lage waren einen Knock-Down zu erzeugen, jedoch nicht zu einer Aktivierung von PKR führten. Sie stellten ebenfalls fest, dass interessanterweise siRNAs mit einem Überhang von 2-3 Nukleotiden an den 3'-Enden effektiver sind als stumpfendige siRNAs ohne Überhang. Funktionelle siRNA entsteht, wie oben bereits gesagt, durch das Zerschneiden einer längeren dsRNA in kurze Bruchstücke. Dies geschieht mit Hilfe des Enzymproteins Dicers (DCR) (Bernstein et al., 2001). Dicer ist im Menschen 220kDa groß und im Zytoplasma lokalisiert (Billy et al., 2001). Es kommt in allen Organismen vor, in denen RNAi beschrieben wurde (Sontheimer, 2005). Es ist eine Typ-III-Ribonuklease mit zwei RNase-III-Domänen, einer PAZ-Domäne (Hammond et al., 2001), einer dsRNA-Bindestelle (dsRBD) und eine DEXD-Helikase-Domäne (Cerutti et al., 2006). Dicer liegt in der Zelle assoziiert mit Proteinen der Argonaut-Familie vor, die wichtige Funktionen bei der RNAi wahrnehmen. Dicer erkennt spezifisch dsRNA und zerschneidet diese in ca. 21nt lange siRNA-Fragmente. Je nach Organismus findet man unterschiedliche Anzahlen von Dicer-Proteinen, die z.T. unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (z.B. miRNA bzw. siRNA-Pathways). Menschen haben nur ein Dicer-Protein (DCR) (Collins et al., 2006) während in der Fruchtfliege *Drosophila* zwei Dicer-Proteine DCR1 und DCR2 für miRNA bzw. siRNA bekannt sind (Hammond et al., 2005). Der Mechanismus des mRNA-Silencing kann trotz kleiner Unterschiede der RNAi, wie z.B. der Anzahl der Dicer-Proteine zwischen Säugetieren und Fliegen, gut am Beispiel von *Drosophila* erläutert werden.

DCR2 spaltet lange dsRNA in ca. 21nt lange doppelsträngige siRNA mit Überhängen von 2-3nt an den 3'-Hydroxyl-Enden und einem Phosphat an den 5'-Enden (Bernstein et al., 2001). Das dsRNA-bindende Protein R2D2 mit seinen beiden dsRNA-Bindungsstellen (R2), bildet einen Komplex bestehend aus DCR2, R2D2 und dsRNA. Dabei bindet R2D2 an das DCR2-Spaltprodukt, die siRNA (Liu et al., 2003). Die RNA-Doppelstränge werden unter ATP-Verbrauch entwunden und in den RNA-induced silencing complex (RISC) integriert (Hammond et al., 2000). RISC ist ein Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der zur Argonaut-Familie zählt. Bei *Drosophila* heißt das entsprechende Protein mit RISC-Aktivität Argonaute 2 (AGO2) (Hammond et al., 2001). Er besitzt eine PAZ-Domäne und eine PIWI-Domäne zum Zerschneiden der Ziel-mRNA (Cerutti et al., 2000). Welcher der beiden RNA-Stränge im RISC als Vorlage für die komplementäre mRNA-Sequenz genutzt wird, entscheidet sich anhand ihrer thermodynamischen Stabilität der siRNA-Enden. Und zwar wird der siRNA-Strang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität am 5'-Ende als Leitstrang (Antisense-Strang) ausgewählt (Tomari et al., 2004). Das konnte mittels Photo-cross-linking gezeigt werden, bei der DCR2 am bzw. in der Nähe des 5'-Ende des weniger stabilen Doppelstrangendes bindet und R2D2 hingegen am bzw. in der Nähe des stabileren 5'-Endes. Die thermodynamische Stabilität ergibt sich durch die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen. Somit ist die Guanin-Cytosin-Verbindung mit drei Wasserstoffbrücken chemisch stabiler als die Adenin-Uracil-Verbindung mit nur zwei Wasserstoffbrücken. DCR2, R2D2 und siRNA bilden zusammen den RISC-loading-complex (RLC), der also den Antisense-Strang determiniert und die siRNA an den RISC übergibt. Nachdem also die dsRNA durch Dicer zu 21nt Fragmente geschnitten wurde, bindet die siRNA im RISC an die Endonuklease AGO2, wobei das DCR2-gebundene 5'-Ende an die 5'-Ende-Bindungsstelle und das R2D2-3'-Ende entsprechend an die PAZ-Domäne von AGO2 bindet. Der Rest (Sense-Strang) wird abgespalten und durch Exonukleasen abgebaut (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). RISC und siRNA (Antisense-Strang) binden an die komplementäre mRNA, die durch den RISC innerhalb der zur siRNA komplementären Nukleotid-Sequenz gespalten wird. RISC fungiert hierbei als

Endonuclease für den mRNA-Strang (Martinez et al., 2004). Und zwar wird die Phosphodiester-Bindung der mRNA zwischen der 10. und 11. Position aufsteigend ab der ersten zur siRNA komplementären Nucleotide zählend gespalten (Elbashir et al., 2001). Anschließend lösen sich die mRNA-Fragmente vom RISC ab und unterliegen unterschiedlichen Exonuklease-Abbaumechanismen, wobei das Fragment mit dem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende von seinem 5'-Ende durch 5'-3'-Exoribonuklease 1 (XRN1) und das Fragment mit dem 5'-Cap-Struktur-Ende durch Exosome abgebaut werden (Orban et al., 2005). RISC steht nun wieder einem neuen Zyklus zur Verfügung. Durch den Mechanismus der RNAi kommt es somit zu einem Knock-Down des Zielgens.

1.4.2 Schematische Darstellung der RNAi

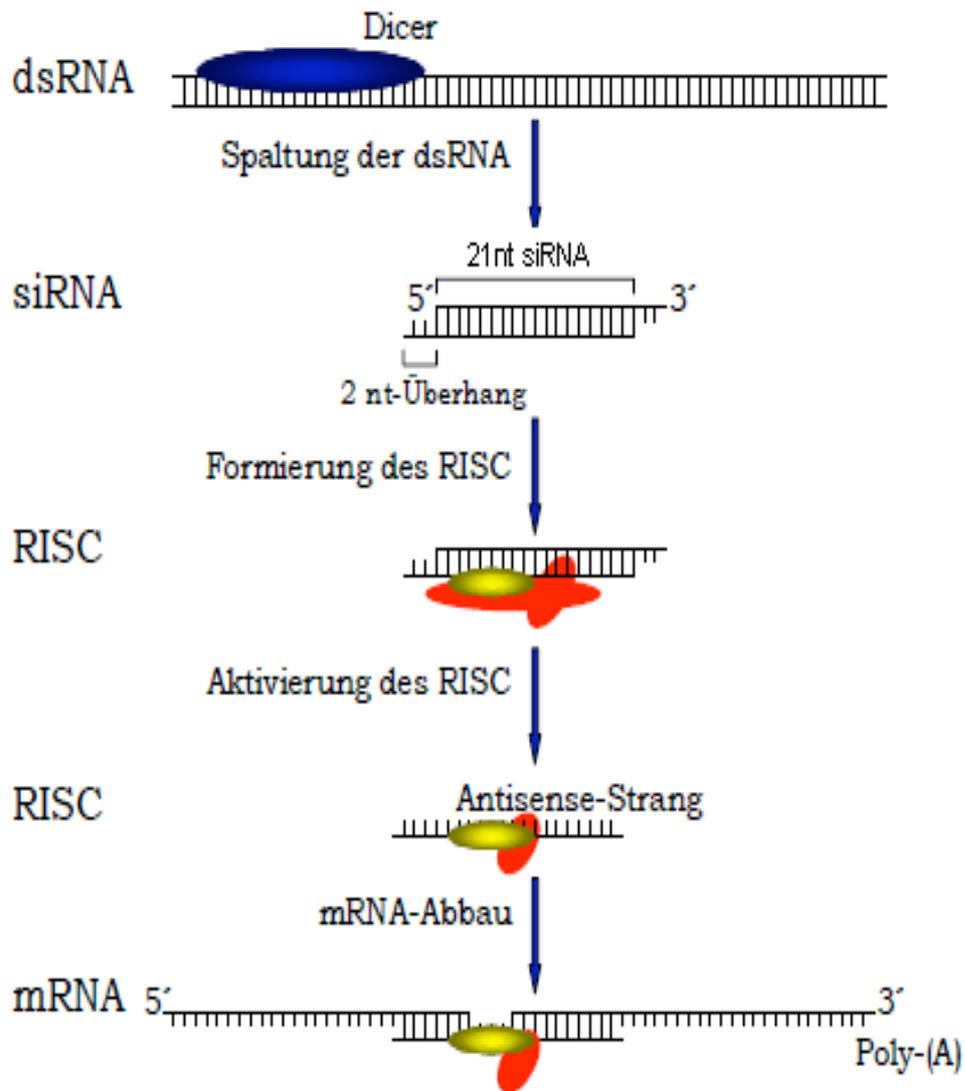


Abbildung 1.4.2: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz. dsRNA wird durch die Ribonuklease Dicer in 21-23nt lange siRNA-Duplexe zerschnitten. Der Strang mit der geringeren Bindungsenergie am 5'-Phosphatende wird in den RNA-induced silencing complex (RISC), einen Nuklease-Komplex, inkorporiert. Das dadurch aktivierte RISC wird durch den siRNA-Strang zur komplementären mRNA geführt und zerschneidet diese durch eine Endonuklease-Aktivität. Anschließend degradiert die homologe mRNA und der RISC löst sich, um wieder einen neuen Zyklus zu durchlaufen. (Quelle: Immisch C., 2006)

1.5 siRNA Transfer

Es gibt unterschiedliche Methoden für den Transfer einer siRNA in lebendes Gewebe. Welche Strategie angewandt werden soll hängt von der Fragestellung ab. Man wird unterschiedliche Strategien in einer Zellkultur als für einen in vivo Knock-Down anwenden müssen. So wäre z.B. eine intravenöse Injektion von unmodifizierter (nativer) siRNA oder der siRNA Transport in Zellkulturen via lipid- bzw. peptidbasierten Transfektions-Methoden völlig ungeeignet für einen effizienten in vivo Transfer in die Zelle, da es zu einem schnellen RNase-Abbau der siRNA durch den Blutfluss oder auch Organe wie die Leber oder die Nieren käme. Des Weiteren würde eine intravenöse Injektion nicht effizient auf ein Zielgen innerhalb des Zentralnervensystems wirken, da Moleküle mit einem Molekulargewicht >500Da nicht für die Blut-Hirn-Schranke durchgängig sind. Zumindest nicht in pharmakologisch wirksamen Mengen (Pardridge, 2001).

Um die Blut-Hirn-Schranke bei Transfektionszielen innerhalb des Zentralnervensystems umgehen zu können, kann siRNA direkt intrathekal in den zerebralen Ventrikel oder stereotaktisch in ein klar definiertes Zielgebiet injiziert werden. Eine Überlegung bei der Methodenwahl wäre dementsprechend, ob man gezielt ein bestimmtes Organ bzw. ein gezieltes Gewebe oder eine systemische Manipulation über das Ventrikelsystem bezwecken möchte. Die Eignung von siRNA-Oligonukleotiden für einen Knock-Down einer Proteinexpression hängt von ihrem effizienten und zielgenauen Transfer in die Zellen ab. Ein vielversprechender Ansatz zum Transfer von siRNA kann die Elektroporation sein, da sie bei bestimmten Zelltypen, die als schwer transfizierbar gelten, gute Ergebnisse zeigt (Gresch et al., 2004; Heidenreich et al., 2003) und gut reproduzierbar ist (Echeverriet al., 2006).

Die Verwendung Fluoreszenz-markierter siRNA konnte hierbei Aussagen über die Effizienz des Transfers in die Zellen mittels Elektroporation treffen (Chan et al., 2006; Gresch et al., 2004; John et al., 2003). Dabei werden Transfektionsraten von 50% (Chan et al., 2006) bis nahezu 100% (Gresch et al., 2004; Heidenreich et al., 2003; Skapenko et al., 2004) beschrieben.

Isacson et al. (2003) hingegen injizierten über eine konstante mini-osmotische Langzeitinfusionspumpe native siRNA gegen den Dopamin-D₁-Rezeptor in das Hirnparenchym einer Ratte. Sie erzielten dadurch keine signifikante Abnahme des Proteinlevels. Allerdings erzielten sie mit der gleichen siRNA durch Oligofectamin Transfektion ein effektives Ergebnis in Zellkulturen. Oligofectamin ist ein Transfektionsreagenz, welches mit Oligonukleotiden oder siRNA einen lipophilen Komplex bildet und das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen erleichtert.

1.5.1 Virale Vektoren

Virale Vektoren werden in der Gentechnik genutzt, um gezielt genetisch verändertes Material in Zielzellen einzubringen. Grundlage dieses Systems ist die Entdeckung der Entstehung replikationsfähiger adeno-assoziierten-Viren (AAV)-DNA nach Transfektion in Säugierzellen. Eine Besonderheit von AAV ist, dass es für eine produktive Vermehrung auf bestimmte Helferfunktionen angewiesen ist, die durch andere, nicht-verwandte Viren, wie Adeno- oder Herpesviren, bereitgestellt werden können (Atchison et al., 1965; Buller et al., 1981). In Abwesenheit von Helferviren kann es eine latente Infektion hervorrufen, in deren Verlauf das virale Genom stabil in die DNA der Wirtszelle integriert wird (Cheung et al., 1980; Samulski et al., 1982; Kotin et al., 1990; Samulski et al., 1991). Durch Infektion der Zelle mit einem geeigneten Helfervirus wird das integrierte AAV aus der Latenz reaktiviert und eine produktive Vermehrung eingeleitet (Cheung et al., 1980; Laughlin et al., 1986; McLaughlin et al., 1988). Somit können Viren, die sich durch Transfektion von Plasmid-DNA herstellen lassen, aufgrund der bestehenden DNA-Rekombinationstechniken sehr schnell manipuliert, verändert und zur Integration von Fremd-DNA verwendet werden. Dafür muss zunächst die gewünschte DNA-Sequenz in das Genom der Viren kloniert werden, indem bestimmte Bereiche des viralen Genoms ersetzt werden.

Eine Rekombination kann nahezu ausgeschlossen werden, da sich die transaktiven Elemente wie die Gene für die Rep- und Cap-Proteine von den cisaktiven Regionen, den ITR (invertet terminal repeat), vollständig trennen lassen und den Viren somit z.B. regulatorische Sequenzen oder die Gene für Enzyme, Kapsid- oder Hüllmembranproteine fehlen. Sie können sich demnach nicht unkontrolliert nach Infektion der Zielzelle weitervermehren, was die Sicherheit dieser Methode bedingt. Darüber hinaus wird gewährleistet, dass die Viren nur eine lokale Infektion erzeugen und keine weitreichende Infektion hervorrufen können. Virale Vektoren können angewandt werden, um z.B. Gene zu exprimieren, die für Proteine codieren, mit dem Hintergrund ihre Funktionen zu erforschen. Des Weiteren können virale Vektorsysteme auch für den Transfer von siRNA und somit zur Erzeugung von RNAi eingesetzt werden.

AAV, die für small hairpin RNA (shRNA) codieren, werden über Dicer verarbeitet und können mit ihrer siRNA eine Ziel-mRNA manipulieren (Xia et al., 2004; Xiao et al., 1998). AVV integrieren bevorzugt in aktive Gene (Nakai et al., 2003). Als weitere virale Vektoren werden Retroviren (RV) eingesetzt. RV sind behüllte Einzel-Strang-RNA-Viren, deren Erbinformation als RNA vorliegt und die als DNA in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird. Zu ihrer Familie gehören unter anderem Gammaretroviren. Gammaretrovirale Vektoren infizieren vor allem in sich in Teilung befindende Zellen und können durch die starken Enhancer-Elemente (=Transkriptionsverstärker, die die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promotor beeinflussen und so die Transkriptionsaktivität eines Gens verstärken) in ihrer 200-600bp langen DNA-Wiederholungseinheit (LTR) leicht zur potenziellen Protoonkogenaktivierung (= Krebs-Gene, die zum ungebremsten Tumorwachstum führen) in der Nähe ihres Integrationsortes führen. Um dem entgegen zu wirken wurden SIN-Vektoren (self inactivating) mit fehlenden Enhancer im 3'-LTR-Bereich entwickelt. Nach erfolgter reverser Transkription und Integration des Provirus (=latenter Virus) in das Wirtsgenom fehlen die Enhancer auch im 5'-LTR-Bereich. Es konnte von Modlich et al. (2006) und Zychlinski et al. (2008) ein Risikoverringern für eine potentielle Onkogenaktivierung, jedoch keine komplette Verhinderung dieser nachgewiesen werden.

Aus der Familie der RV finden des Weiteren Lentiviren(LV) Verwendung. Sie haben ein potenziell breites Anwendungsspektrum, da sie wie auch AAVs neben aktiven sich teilenden Zellen ebenso sich nicht-teilende Zellen, wie z.B. Nervenzellen, infizieren können (Kafri, 2004; Kaplitt et al., 1994; Barquintero et al., 2004). Für LV wurden SIN-Vektoren erzeugt (Iwakuma et al., 1999; Yang et al., 2007), da sie genau so wie die Gammaretroviren ein erhöhtes Risiko auf ungewollte auslösende Onkogenaktivität durch ihre tendentielle Integrations in Gennähe aufweisen (Wu et al., 2003; Barquintero et al., 2004). LV wurden in Forschungsarbeiten genutzt, um unter anderem die Replikation von humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) in Patienten mit Aids zu unterdrücken (Kohn et al., 2007). Diese Replikation des HIV wurde durch RNAi gegen virale Gene wie tat (transactivator of transcription), rev (regulator of expression of virion proteins), nef (negative factor) und gag (group-specific antigen) in Zellkulturmodellen inhibiert (Capodici et al., 2002; Coburn et al., 2002; Hu et al., 2002).

In AAV oder LV transportierte shRNA kann stabil nach Integration in ihrer Zielzelle exprimiert werden (Xia et al., 2004; Ralph et al., 2005). Allerdings ist eine dauerhafte Expression nicht immer als positiv zu werten. Dauerhafte RNAi ist wünschenswert, wenn z.B. mit therapeutischer Perspektive ein beschädigtes Gen herunterreguliert werden soll. Allerdings muss beachtet werden, dass dieser Vorgang irreversibel ist. Um eine Expression in bestimmten Zielzellen zu ermöglichen, kann ein viraler Vektor mit einem zelltypspezifischen Promotor entworfen werden (Yu et al., 1986).

Für eine mögliche Anwendung in der Gentherapie im Zentralnervensystem werden hohe Erwartungen an virale Vektoren und somit an den siRNA-Transfer gesetzt. Um diesen gerecht zu werden, müssen noch einige Hindernisse überwunden werden. Zu denen gehören neben den bereits genannten, dass einige Vektoren trotz Berichten über mögliche adenovirale Transfektion nach Infektion jenseits der Blut-Hirn-Schranke (Moon et al., 2003), die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können wenn nicht eine Zerstörung dieser vorausging (Doran et al., 1995). Um Risiken einer zerstörten Blut-Hirn-Schranke zu vermeiden, ist die direkte Injektion ins Gewebe bzw. in die Ventrikel eine mögliche Alternative.

Diese beinhaltet allerdings eine Infektionsgefahr, eine Inflammationsgefahr und auch die Gefahr zur Schädigung der auf dem Weg zur Zielregion befindenden Hirnstrukturen. Die therapeutische Nutzung im Menschen wird sicher durch das geringe aber nicht völlig ausschließbare Risiko einer Onkogenese eingeschränkt.

Schließlich könnte es bei Injektion viraler Vektoren zu einer Immunantwort des Wirtes kommen, wie sie bei intraokulärer Injektion von AAV und LV beobachtet wurde. Dort kam es zu einer humoralen Immunantwort mit Bildung von IgG1 und IgG2b (Th2-Typ) Antikörpern. Auch die für eine Th2-Typ charakteristische Zytokine, wie der transformierenden Wachstumsfaktor TGF- β oder Interleukine IL-4, IL-10 wurden gebildet (Bennett, 2003).

Zusammenfassend sollten virale Vektoren einen gewissen Grad an Sicherheit, geringe Gen- und Zytotoxizität, Stabilität und eine Zelltypspezifität aufweisen. Des Weiteren ist zu jedem Zeitpunkt bei Arbeiten mit viralen Vektoren die entsprechende Sicherheitsstufe einzuhalten, um Kontaminationen von Laborpersonal, z.B. mit LV, zu vermeiden. LV können durch offene Wunden oder durch das Stechen mit einer kontaminierten Injektionsnadel in den menschlichen Körper gelangen. Die Bildung von Aerosolen, die LV enthalten, stellt ein Restrisiko für den Anwender dar.

1.5.2 Elektroporation

Elektroporation ist eine geeignete Methode, um exogene Moleküle wie Proteine, RNA oder DNA in eine Zelle durch Membranöffnung einzubringen (Neumann et al., 1999). In den meisten Fällen wurden als Ziele für in vivo Elektroporation ganze Organe wie z.B. die Leber genutzt. Der Vorgang wurde allerdings auf Organe von Küken- und Mäuseembryonen beschränkt (Agarwala et al., 2001). Wei et al. (2003) etablierten ein Elektroporations-Protokoll für den DNA-Transfer in Neurone des präfrontalen Cortex in ausgewachsenen Mäusen und Ratten. Sie injizierten entweder DNA für grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder für mutiertes Calmodulin (CaM) in den präfrontalen Cortex.

Anschließend platzierten sie zwei Elektroden im Bereich der Injektionsstelle, durch die in Rechteckpulsen Stromstöße abgegeben wurden, wodurch sich vermutlich die Membran öffnete und die DNA durch die Membranporen einfließen konnte. Ähnlich haben auch Fukuchi-Shimogori und Grove (2001) DNA in Neuronen embryonaler Mäuse eingeführt.

Akanea et al. (2005) nutzten Elektroporation zum Einschleusen von siRNA gegen Cyclooxygenase-1 (Cox-1) und siRNA gegen Glutamat-Rezeptor-2 (GluR2) in die CA1-Region des Hippokampus und in den visuellen Cortex. Sie untersuchten dabei unterschiedliche Elektroporations-Parameter wie Spannung, Frequenz oder Pulsdauer, um einen bestmöglichen Effekt erzielen zu können. Dieser wird laut Akanea et al. (2005) durch das Abgeben eines kurzen Impulses mit hoher Spannung, der von einem langen Impuls mit niedriger Spannung gefolgt wird erreicht. Dabei soll die hohe kurze Spannung als „poring pulse“ das Öffnen der Membranporen und die lange kurze Spannung als „driving pulse“ das Eintreten der siRNA in das Zytosol durch Elektrophorese bewirken. Sie fanden heraus, dass die mRNA-Level am 5.Tag nach Behandlung auf bis zu 20% ihrer regulären Expression abnahm und dieser Effekt bis zu 30 Tage anhielt. Diese Verringerung der Expression fand nur in den Regionen statt, in denen elektroporiert wurde. Des Weiteren wurde mit dem TUNEL-Assay (= terminal transferase dUTP nick end labeling) untersucht, ob DNA-Bruchstücke sichtbar waren, die bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod oder durch die Enzymaktivität von Endonukleasen entstehen. Mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierte dUTP-Nukleotide wurden durch das Enzym Terminal-Transferase an die DNA-Bruchenden gebunden und markierte Stellen in der beschädigten DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht. Es konnten keinerlei Hinweise auf Apoptosevorgänge beobachtet werden, was zeigt, dass die Elektroporation keinen wesentlichen Zellschaden zur Folge hat. Eine andere in vivo Arbeit in Ratten mit siRNA targeting BDNF-Tyrosinkinase-B-Rezeptor (TrkB) und Elektroporation im Bereich der rostral-ventro-medialen Medulla zeigte eine Reduktion des TrkB-Proteins um 45% einen Tag nach Behandlung und um 30% drei Tage nach Behandlung (Guo et al., 2006).

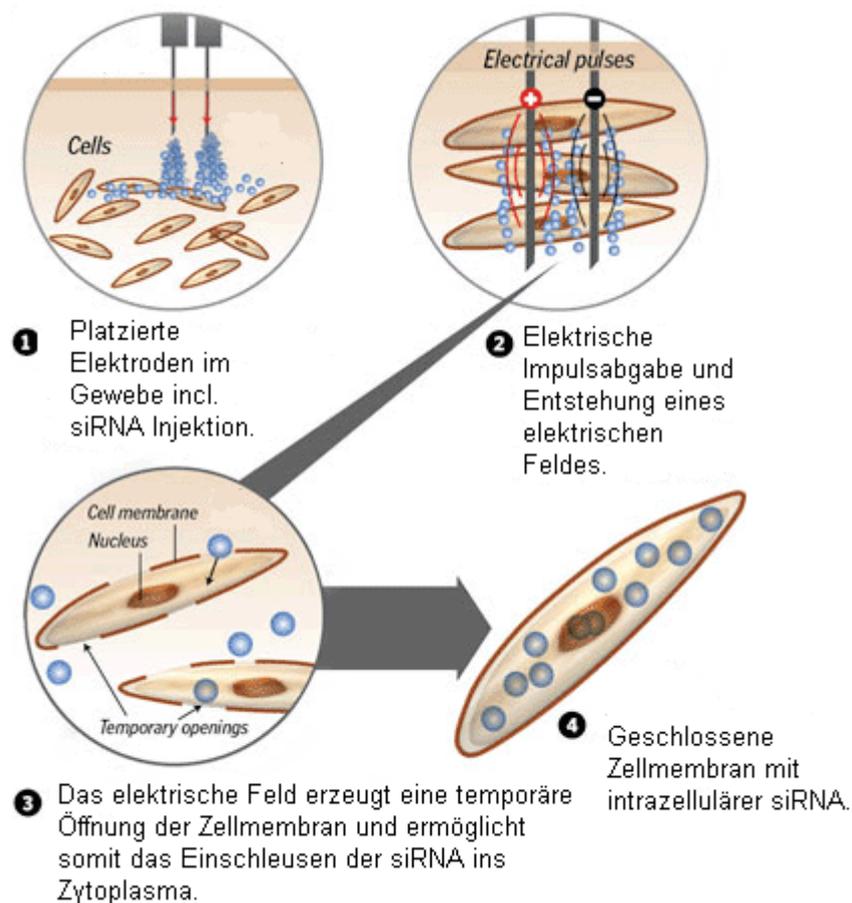
Die erfolgreiche RNAi konnte mit einer Abschwächung der Hyperalgesie im Verhaltenstest nach induzierter Inflammation belegt werden. Der mRNA-Level wurde hier nicht gemessen. Allerdings konnte fluoreszenzmarkierte Kontroll-siRNA innerhalb der Zellen im Bereich der Injektionsstelle nachgewiesen werden.

Der große Vorteil dieser Methode gegenüber anderen, wie z.B. die durch virale Vektoren vermittelte oder auf Lipid basierende RNAi, liegt in der geringen Intoxizität (Akanea et al., 2005), obwohl bei den hohen Spannungspulsen über eine längere Laufzeit, so wie sie bei der Elektroporation angewandt wird, Sauerstoffradikale (ROS) zu beobachten waren (Bonnafous et al., 1999). Ebenfalls wurden bei so hohen Spannungen vaskuläre Veränderungen und damit einhergehend eine Reduktion des Blutflusses beobachtet (Gehl et. al., 2002). Die Methode ist auch deswegen vielversprechend, da man die Technik der auf Elektroporation basierenden Einschleusung der siRNA zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung - als auch im Adulttier - durchführen kann.

Hinzu kommt der Vorteil der Möglichkeit zur klaren Definition des Zielgewebes. Außerdem ist eine RNAi induzierbar, wie dies auch in dieser Arbeit durch Einschleusung von gegen GABA_Aβ₃ gerichteter siRNA in kortikale Neurone mit kombinierter Elektroporation durch einen signifikanten Knock-Down der GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspiegel nachgewiesen werden konnte.

Ein nennenswerter Nachteil bleibt der invasive Eingriff mit all seinen Risiken.

1.5.2.1 Schematische Darstellung einer Elektroporation



Schema 1.5.2.1: Das Prinzip der Elektroporation mit siRNA-Transfer ins Zytoplasma einer Zelle.

(Quelle: Simmerman, 2002, Technology Overview, Electroporation-Based DNA Delivery, How Electroporation Works)

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit wurde die Expressionsveränderung von $GABA_A\beta_3$ nach Injektion von gegen $GABA_A\beta_3$ gerichteter siRNA in Kombination mit Elektroporation durch RNAi im behandelten neokortikalen Areal im Verhältnis zur kontralateralen Seite untersucht, um zu klären, ob hierdurch eine Reduktion, also ein signifikanter „Knock-Down der $GABA_A\beta_3$ -mRNA zu erreichen ist.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Anästhesie

Es wurden Sprague Dawley (SD) Ratten der Firma Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland, im Alter zwischen 12 und 15 Tagen verwendet. Die Tiere wurden bis zum Versuchszeitpunkt erst durch eine Amme und anschließend bis zum Präparationszeitpunkt über 24 Stunden mit Wasser und Futter ad libitum ernährt sowie in einem 12-Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten.

Die Ratten wurden für den Zeitraum des operativen Eingriffes, der siRNA-Injektion sowie die Elektroporation mit einer intraperitonealen Injektion von einem Gemisch aus Xylazinhydrochlorid (10mg/kg Körpergewicht, Rompun Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und Ketaminhydrochlorid (100mg/kg Körpergewicht, Ketamin-Hydrochlorid, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) anästhesiert. Im Verlauf des Eingriffes wurde wenn nötig die Anästhesie durch zusätzliche Injektionen aufrecht gehalten. Das Nachlassen des Anästhetikums konnte an Reflexen der hinteren Extremitäten und des Schwanzes durch gezielte taktile Provokation an diesen erkannt werden. Während des anästhesierten Zustandes wurde die Körpertemperatur der Ratten mit Hilfe eines mit warmem Wasser gefüllten Wärmekissens bewahrt. Im Wachzustand wurde dafür eine Infrarotlampe (Infraphil, Philips GmbH, Hamburg, Germany) genutzt.

2.2 Injektion der siRNA und Elektroporation

Nachdem die Ratten anästhesiert wurden, wurde ein ca.2,5cm mittiger Felllängsschnitt am Schädel der jeweiligen Ratte mit einem Spitzskalpell durchgeführt. Daraufhin folgte eine vom Scheitelbein ausgehende linksseitige 5x2mm Schädeltrepanation auf Bregmahöhe mit Hilfe einer kleinen Schere (FST Medizintechnik, Bad Oeynhausen, Deutschland).

In der Mitte dieser Kalottenöffnung wurde die siRNA-Injektionsnadel platziert: für den visuellen Cortex: 1mm posterior zum Bregma, 3mm lateral des Scheitelbeins, 1mm tief in den Cortex.

Für die Injektion wurde eine 26S-Hamilton-Mikroinfusionsspritze (0,47mm Außendurchmesser, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verwendet.

Injiziert wurde ein kommerziell erworbener siRNA-Pool, der aus 4 siRNAs bestand. Das Ziel war die GABA_A-Rezeptor-Untereinheit-Beta₃ (GABA_Aβ₃-Rezeptor) (Accession Number: NM_017065, ON-TARGET plus SMARTpool, Dharmacon Inc., Lafayette, CO, USA).

5µL 20µM siRNA wurden über 10 Minuten hinweg injiziert. Die Nadel verblieb vor Entnahme noch weitere 5 Minuten im Cortex. Es folgte die Einführung der Elektroporationsnadeln 1,5mm medial und 1,5mm lateral der Einstichstelle der Injektionsnadel in 3mm Tiefe im Neokortex. Die Elektroden waren parallel in der Vertikalen zueinander angeordnet. Für die Elektroporation wurden Elektroden aus Wolframdraht (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Durchmesser von 250µm verwendet, die an einen Elektroporator (CUY 2, NEPA GENE CO., LTD., Ichikawa, Chiba, Japan) angeschlossen wurden. Die Elektroporation wurde mit 7 Rechteckpulsen von 50ms Dauer und 40 Volt Spannung mit einer Frequenz von 1Hz durchgeführt.

Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Elektroden wieder senkrecht herausgefahren. Durch die angewandte Frequenz wurden eine Porenöffnung der Plasmamembran und ein Eindringen der siRNA ins Zytosol angestrebt.

Der Fellschnitt wurde mit drei Stichen durch Einzelknopfnah geschlossen. Nach Ausklingen der Anästhesie innerhalb von einer Stunde nach dem oben beschriebenen operativen Eingriff wurden die Tiere über 24 Stunden bis zum erneuten Präparationszeitpunkt mit Wasser und Futter ad libitum ernährt sowie in einem 12-Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten.

2.2.1 Kontrollen

Als Kontrolltiere wurden SD-Ratten gleichen Alters wie die Versuchstiere verwendet. Der Versuchsablauf war ebenfalls identisch, nur das hier keine spezifische gegen GABA_Aβ₃ gerichtete siRNA injiziert wurde, sondern 5µl Natriumchlorid (Kochsalz, NaCl).

2.3 Gewebeentnahme und Frontalschnitt

24 Stunden nach Elektroporation und siRNA-Injektion wurden die Ratten erneut nach dem gleichen Verfahren wie bereits beschrieben anästhesiert und die Schmerzfreiheit und somit die Tiefe der Anästhesie durch starke taktile Schmerzprovokation der hinteren Extremitäten überprüft, um eine Schmerzfreiheit der Tiere während des erneuten Eingriffes und der Tötung zu gewährleisten. Es wurde wieder ein ca. 2,5cm Felllängsschnitt am Schädel mit einem Spitzskalpell durchgeführt. Die Schädelkalotte wurde durch einen Ringschnitt beidseits vom Foramen Magnum ausgehend Richtung ventral mit einer kleinen Schere gelockert und nach frontal geklappt, so dass das Gehirn mit einem Löffel entnommen werden konnte und damit das Tier getötet wurde. Dann wurde mit einer Rasierklinge (Rotbart extra dünn, Procter u. Gamble Service GmbH, Schwalbach am Taunus, Deutschland) ein kompletter Frontalschnitt ventral der Bregmahöhe durchgeführt und das Gehirn mit Cyanacrylat-Klebstoff in aufrecht stehender mit der Schnittstelle nach unten gerichteten Lage fixiert. Zur Stabilisierung des Gehirns beim Schneiden wurde es einseitig durch einen kleinen Agarwürfel (1x1cm) gestützt. Um das Degradieren der RNA zu vermeiden, wurde das Gewebe in RNAlater (Ambion) gehalten. Dann wurden mit einem DTK-1000 Mikroslicer (Ted Pella, Redding, CA, USA) 1mm dicke Frontalschnitte angefertigt. Aus dem Schnitt, in dem die Injektionsstelle zu erkennen war, wurde eine 1mm breit und 2mm tiefe Gewebeprobe auf der ipsilateralen behandelten Seite im Bereich der stattgefundenen Injektion sowie der kontralateral unbehandelten Hemisphäre ausgestanzt. Beide Gewebeproben wurden in 600µl RNAlater-Stabilisierungsreagenz bis zur weiteren Bearbeitung verwahrt.

2.4 RNA Isolation

Die RNA wurde aus den Gewebeproben mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gewonnen. Dabei wurden die Gewebeprobe zusammen mit 600µl RLT Puffer und β -Mercaptoethanol (1µl β -Mercaptoethanol pro 1ml RLT Puffer) in Reagenzgläser übertragen. Die jeweilige Probe wurde mit einem Ultra-Turrax T8 Homogenisator (IKA-Werke GmbH u. Co. KG, Staufen, Deutschland) für 30 Sekunden gemixt und anschließend für 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen umgefüllt. Dann wurden 600µl 70%iges Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt. Die Probe wurde in eine RNeasy-Drehröhrchen (englisch: Spin-Column) überführt, welche in einem Sammelröhrchen platziert war. Diese Probe wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Darauf wurde 700µl RW1 Puffer ins Drehröhrchen hinzugefügt und bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Drehröhrchen wurde in ein neues Sammelröhrchen platziert. Nun wurden 500µl RPE Puffer hinzugefügt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.

Im nächsten Schritt wurden 500µl RPE Puffer hinzugefügt und bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten zentrifugiert. Der Durchlauf wurde wieder verworfen. Das Drehröhrchen wurde in ein neues Sammelröhrchen platziert.

Die Probe wurde bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert.

Im letzten Schritt wurde das Drehröhrchen in ein neues Eppendorfröhrchen platziert und 40µl Nuklease-Freies Wasser ins Drehröhrchen hinzugefügt und die RNA durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute eluiert.

2.5 DNA-freie Reaktion

Für die DNase Reaktion wurde das DNA-free Kit (Ambion, Austin, TX, USA) verwendet, welches DNasen sowie Kationen entfernt.

Für diesen Vorgang wurden 4µl 10xDNase1 Puffer und 1µl rDNase 1 zur RNA hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Probe wurde bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Dann wurden 5µl DNase-Inaktivierungsreagenz (englisch: resuspended DNase Inactivation Reagent) zur RNA hinzugefügt und die Probe gut durchmischt. Anschließend wurde die Probe bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubiert und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert.

2.6 Photometrische Bestimmung

Bei der photometrischen Bestimmung (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde die Menge an RNA in einer 1:10 Lösung (10µl isolierte RNA + 90µl Nuklease-freies Wasser (Ambion, Austin, TX, USA)) gemessen. Es wurde die Dichte bei 260nm Wellenlänge und einem 260/280nm Verhältnis angegeben.

Die Ausbeute variierte von 200-500ng. Diese Messung wurde gemacht, um bei allen Proben vergleichbare Konzentrationen an RNA zu erhalten.

2.7 Reverse Transkription

Während der Reversen Transkriptase (RT) wird RNA in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde mit dem SuperScript II RT Kit durchgeführt. Dafür wurden folgende Komponenten in einem Eppendorfröhrchen zusammengefügt.

10µl unverdünnte RNA (200-500ng) (laut Photometrischer Bestimmung so viel RNA + Nuklease-freies Wasser, um insgesamt bei allen Proben vergleichbare Konzentration an RNA zu erhalten) plus 1µl pd(N)₆ willkürliche Hexameter (englisch: random hexamers) 200ng/µl (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) und 1µl dNTP Mix 10mM (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Das Gemisch wurde bei 65°C für 5 Minuten inkubiert.

Dann wurde die Probe für 3 Minuten auf Eis gekühlt und bei maximaler Geschwindigkeit für 15 Sekunden zentrifugiert. Nun wurden 4µl 5x First-Strand Puffer, 2µl 0,1 M DTT und 1µl RNase OUT (40 Units/µl) hinzugefügt.

Nun wurde die Probe gemischt und bei Raumtemperatur für 2 Minuten inkubieren. Danach wurden 1µl (200 Units) SuperScript II RT Enzym hinzugefügt.

Die Probe wurde erneut gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 42°C für 50 Minuten inkubiert und zum Schluss bei 70°C für 15 Minuten, um die SuperScript II RT Enzyme zu inaktivieren.

2.8 Real-Time-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (englisch: Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction = RT-PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren mit gleichzeitiger Darstellung der Quantifizierung der gewonnenen DNA durch Fluoreszenzmessungen. Dabei wird mit jedem Amplifikationsschritt durch Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) der Anstieg dieses Farbstoffes durch Bindung an doppelsträngige DNA gemessen, welches mit der jeweils vorhandenen Menge an PCR-Produkten korrelierte. Durch Wellenlängendetektion des Farbstoffes durch das Gerät (ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) kann der Ablauf der Reaktion nachvollzogen werden. Der SYBR Green PCR Master Mix enthielt SYBR Green 1 Färbung, AmpilTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Reference 1 (ROX) und Pufferkomponenten zur Optimierung.

2.8.1 Primer-Sequenzen

Die Primer Sequenzen für HPRT₂-rat und GABA_Aβ₃ (Applied Biosystems, ABI) wurden mit Hilfe des ABI Prism Express 2.0 Software bestimmt und lauteten folgendermaßen:

GABA_Aβ₃ -Vorwärts (Startposition: 517) (20b):

5`GCT GTA CGG GCT CAG GAT CA 3`;

GABA_Aβ₃ -Rückwärts (Startposition: 587) (23b):

5`GCT CAT CCA GTG GGT ATC TTC TG 3`;

HPRT₂-rat-Vorwärts (Startposition: 579):

5`TGT TGG ATA CAG GCC AGA CTT TGT 3`;

HPRT₂-rat-Rückwärts (Startposition: 702):

5`TGT GTC ATC AGC GAA AGT GGA 3`;

2.8.2 Amplicon-Sequenzen

Um eine gute Auswertung des Gen-Expressions-Spiegel zu erreichen, wurden für die Standardkurven Oligonucleotide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit der gleichen Sequenz wie das zu erwartende Amplicon entsprechend der jeweiligen Primer erzeugt. Die Amplicons wurden logarithmisch verdünnt, so dass sie eine Serie von insgesamt 4 unterschiedlichen Verdünnungsstufen (10^{-7} bis 10^{-10} Kopien / μ l) ergab. Damit konnte die Wirksamkeit der Reaktion und die absolute Menge des PCR Produktes errechnet werden. Die Sequenzen lauteten folgendermaßen:

GABA_Aβ₃ -Amplicon (71b):

5`GCT GTA CGG GCT CAG GAT CAC CAC CAC AGC AGC TTG CAT GAT
GGA CCT CAG AAG ATA CCC ACT GGA TGA GC 3`;

HPRT₂-rat-Amplicon:

5' TGT TGG ATA CAG GCC AGA CTT TGT TGG ATT TGA AAT TCC AGA
CAA GTT TGT TGT TGG ATA TGC CCT TGA CTA TAA TGA GCA CTT CAG
GGA TTT GAA TCA TGT TTG TGT CAT CAG CGA AAG TGG A 3' .

2.8.3 Real-Time-PCR Procedere

Die cDNA Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt. 5µl dieser verdünnten Probe wurden mit 10µl PCR-Master-Mix bestehend aus 7,5µl SYBR-Green-Master-Mix, 0,9µl Primer-Vorwärts, 0,9µl Primer-Rückwärts und 0,7µl Nuklease-freies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 15µl auf einer PCR-Platte (Abgene, Epsom, UK) zusammengefügt. Die Platte wurde mit einer dünnen Folie (Abgene, Epsom, UK) verschweißt. Für die Verdünnungsreihe der Standardkurve wurden gleiche Mengen verwendet. Jede Probe wurde als Duplikat aufgesetzt. Zusätzlich wurden für jeden Primer Wasserproben (englisch: NTC-Proben = no-template-controls) zur Kontrolle eventueller Kontaminationen der Master Mix Komponenten oder auch Primer-Dimer-Effekte aufgetragen.

Die Bedingungen der PCR waren wie folgt: 50°C für 2 Minuten und 95°C für 10 Minuten; für 40 Zyklen 95°C für 15 Sekunden gefolgt von 60°C über 1 Minute.

Am Ende der PCR wurde für jede Probe an Hand der Schmelztemperatur des PCR-Produktes eine Dissoziationskurve ermittelt.

2.9 Datenanalyse

Die PCR-Daten wurden zur HPRT cDNA in Beziehung gesetzt (=Normalisiert) und mit der ABI Prism SDS Software analysiert. Dabei wurden während der Reaktion die Fluoreszenzen aufgezeichnet und der Quotient aus den Fluoreszenzemissionen von Reporter (SYBR Green) und passivem Referenzfarbstoff (ROX) das normalisierte Reportersignal (R_n-Wert) gebildet.

Dann wurde von den ersten PCR-Zyklen vom R_n^+ -Wert (relatives Reportersignal) der R_n^- -Wert (Hintergrundfluoreszenz) subtrahiert und somit der Delta- R_n -Wert ermittelt. Nun konnte durch Auftragen des logarithmierten Delta- R_n -Wertes (Abszisse) gegen den entsprechenden PCR-Zyklus (Ordinate) in ein Koordinatensystem ein Amplifizierungsverlauf erstellt werden. Die Dissoziationskurven wurden auf einzelne Peaks hin kontrolliert, um eventuelle andere PCR-Produkte, die während des Vervielfältigungsprozesses entstanden sein konnten, wie z.B. Primer-Dimer, ausschließen zu können. Alle Reaktionen mit mehreren Peaks wurden aus der Wertung ausgeschlossen. Ebenso wurden Dissoziationskurven der NTC-Proben auf eine flache Kurve hin kontrolliert, um Kontaminationen ausschließen zu können. Die Grundlinie konnte aus den Fluoreszenzdaten der PCR-Zyklen (i.d.R. Zyklus 6-15) errechnet werden. Diese war wichtig für die Bestimmung des Grenzwertes, ab dem ein Signal eine Fluoreszenzstärke als positiv gewertet wurde und so die Phase der exponentiellen Amplifikation erreicht hatte. Der errechnete relative PCR-Zyklus, bei dem der Amplifizierungsverlauf den Grenzwert überschritt, wurde als C_T -Wert (englisch: Threshold Cycle) angegeben. NTC-Vervielfältigungskurven oberhalb des Grenzwertes wurden in die Wertung mit einbezogen, so lange ihr C_T -Wert mindestens 5 Zyklen vom höchsten C_T -Wert der Probe abwich. Laut Bustin und Nolan (2004) stimmt eine Zyklusdifferenz von 5 Zyklen mit einer $(1+\text{Effizienz})^5$ -fache Differenz im PCR-Produkt überein. Bei einer idealen Effizienz von 100% oder 1 würde die Differenz bei $(1+1)^5 = 32$ -fache liegen, das heißt die NTC-PCR-Produktmenge würde $1/32 = 3\%$ der zu vergleichenden PCR-Probenmenge betragen. Diese prozentual geringe Abweichung kann bei der Auswertung der Daten ignoriert werden.

$$\text{Delta } R_n = R_n - \text{Durchschnitt}_{\text{Zyklen 6-15}} (R_n)$$

$$\text{Mit } R_n = \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{SYBR Green}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{ROX}}}$$

2.9.1 Standardkurve

Eine Standardkurve für das Zielgen sowie das Haushaltsgen (=nicht-reguliertes Gen, konstitutiv exprimiertes Gen, englisch: Housekeeping-Gen) wurden aus den C_T -Werten der betreffenden Verdünnungsreihen durch logarithmische Auftragung der Verdünnung gegen den C_T -Wert errechnet.

Die lineare Regressionslinie (Standardkurve) y basierend auf der Methode der kleinsten Quadrate ergibt sich aus der Steigung m und y -Abschnitt b , sowie auch den R^2 -Wert welches der Benennungskoeffizient ist. Dieser Koeffizient gibt einen Einblick bezüglich der Reliabilität und Präzision der Regression.

Ein R^2 -Wert $> 0,95$ sollte erreicht werden.

Die lineare Regressionskurve ergibt sich aus:

$$y = mx + b$$

m = Steigung

b = y -Abschnitt

y = C_T -Wert

Die Wirkungsgrade W für die Zielsequenz sowie für das Haushaltsgen konnte ermittelt werden durch

$$W = 10^{\frac{-1}{m} - 1}$$

Im Idealfall liegen die PCR Wirkungsgrade um den Wert 1 (entspricht einer Steigung von $m = -3,34$), welches eine Verdoppelung jedes DNA-Stranges in jedem Zyklus ausdrückt.

2.9.2 Die relative Genregulation

Um die Expressionsspiegel vergleichen zu können müssen die C_T -Werte in absolute oder relative Mengen des PCR-Produktes umgeschrieben werden. Die Menge des PCR-Produktes für einen bestimmten C_T -Wert kann durch Erstellung einer linearen Regressionskurve berechnet werden. Da sich die Regression aus der logarithmischen Dekade der Standardkurve errechnet, errechnet sich die relative Menge des PCR-Produktes $q_{rel.}$ durch

$$q_{rel.} = 10^{\frac{y - b}{m}}$$

Bei dieser relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens sowie die des Haushaltsgenes von Gewebeproben der ipsilateral bearbeiteten und der kontralateral unbearbeiteten Kortexseite in Relation zueinander gesetzt. Dafür mussten die relativen Mengen der Zielsequenz der behandelten und unbehandelten Kortexseite durch Division des Zielgens auf das Haushaltsgen normalisiert werden.

$$q_{norm} = \frac{q_{rel.} \text{ (Zielsequenz)}}{q_{rel.} \text{ (Haushaltsgen)}}$$

Um nun die Regulation R der Zielsequenz mRNA auf der behandelten Kortexseite in Relation zu der unbehandelten Kortexseite stellen zu können, musste die behandelte Kortexseite durch die unbehandelte Kortexseite dividiert werden.

$$R = \frac{q_{norm} \text{ (behandelte Kortexseite)}}{q_{norm} \text{ (unbehandelte Kortexseite)}}$$

2.9.3 Statistik

Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der normalisierten behandelten ipsilateralen und der normalisierten unbehandelten kontralateralen Kortexseite der Versuchstiere - entsprechend q_{norm} - durch Nachweis in einem Paired-t-Test sowie bei der Gegenüberstellung der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollreihe in einem t-Test bestätigt werden.

$$T = \frac{m}{\sigma} \sqrt{n}$$

mit $m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \bar{\delta}_i$ (Stichprobenmittelwert)

$$\bar{\delta}_i = q_{norm\ i} (\text{behandelt}) - q_{norm\ i} (\text{unbehandelt})$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{\delta}_i - m)^2} \quad (\text{Standardabweichung})$$

n = Probenanzahl

Die Gauß'sche Normalverteilung wurde für jede Gruppe mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Anpassungstest (mit Lilliefors-Modifikation) gesichert.

Um eine Signifikanz zwischen den durchschnittlichen relativen $GABA_A\beta_3$ -mRNA-Spiegel einer jeden Gruppe errechnen zu können, wurde eine einfache Varianzanalyse (englisch: One-Way ANOVA) angewandt.

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Computerprogrammes SigmaStat 3.11 erstellt. Die Auswertung erfolgte mit SigmaPlot 9.0. (beides Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

Die Effektgröße konnte durch Berechnung von Cohens d bestimmt werden:

$$d = \frac{m_{\text{behandelt}} - m_{\text{unbehandelt}}}{\bar{\sigma} \sqrt{2(1-r)}}$$

mit $m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n q_{\text{norm } i}$ (Durchschnitt der betr. Gruppe)

$$\bar{\sigma} = \frac{\sigma_{\text{behandelt}}^2 - \sigma_{\text{unbehandelt}}^2}{2} \quad (\text{Standardabweichung})$$

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (q_{\text{norm } i (\text{behandelt})} - m_{\text{behandelt}}) (q_{\text{norm } i (\text{unbehandelt})} - m_{\text{unbehandelt}})}{(n-1) \sigma_{\text{behandelt}} \sigma_{\text{unbehandelt}}}$$

(Korrelationskoeffizient)

$\sigma^2 = \text{Abweichung}$

Die Effektstärke ist ein gutes und unmittelbares standardisiertes Maß Mittelwertunterschiede zwischen zwei Gruppen mit korrelationsgewichteten Standardabweichungen darzustellen.

Bei der Regulation vom mRNA-Spiegel R (Korrelationskoeffizient) wurden mögliche Ausreißer mit Dixons Q-Test für Erkennung von einzelnen Ausreißern untersucht und von der Analyse ausgeschlossen.

3. Ergebnisse

Es wurde eine Methode etabliert, mit der man die Expression von GABA_Aβ₃ im Neokortex junger SD-Ratten mittels Injektion von gegen GABA_Aβ₃ gerichteter siRNA (RNA-Interferenz) kombiniert mit lokaler Elektroporation in vivo manipulieren kann. Hierzu wurden 5µL 20µM siRNA aus einem kommerziell erworbenen siRNA-Gemisch, welches gegen GABA_Aβ₃ gerichtet ist, unilateral in den Neocortex 12-15 Tage alter SD-Ratten injiziert. Beidseits der Injektionsstelle wurden Elektroden ins Gewebe abgesenkt, über die eine Folge von 7 Rechteckpulsen (50ms Dauer, 40 Volt, 1Hz Frequenz) appliziert wurde. Es wird angenommen, dass diese Pulse die Zellmembran elektroporieren und die Aufnahme der siRNA in die Zielzelle ermöglichen. Die hierdurch aufgenommene siRNA fließt in den RNA-Interferenz-Ablauf ein, was wiederum zum Knock-Down der Ziel-mRNA und somit zu einer Reduktion des Proteinspiegels führen soll. 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation wurden sowohl aus der elektroporierten Region wie auch aus der unbehandelten kontralateralen Region (Kontrolle) im gleichen Tier Gewebeproben entnommen und die Gesamt-RNA („total RNA“) isoliert, von welcher anschließend Mittels reverser Transkription cDNA erzeugt wurde. Durch quantitative Real-Time-PCR wurden mit spezifischen Primern die GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionsraten relativ zum stabil exprimierten Haushaltsgen HPRT bestimmt.

In Abbildung 3.1 werden GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel der individuellen Versuchstiere relativ zum Spiegel der HPRT-mRNA der jeweiligen Hemisphären (ipsi- und kontralateral) für alle individuellen Versuchstiere 24 Stunden nach Behandlung gegenübergestellt. Bei allen Tieren zeigte sich eine Reduktion der relativen GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel im behandelten Areal im Vergleich zur unbehandelten kontralateralen Seite. Es konnte des Weiteren eine große individuelle Variabilität im relativen mRNA-Spiegel unter den Tieren beobachtet werden. Die unterschiedlichen mRNA-Expressionsspiegel unter den Tieren spiegeln wahrscheinlich primär unterschiedliche Gesamt-RNA-Ausbeuten (192,0 µg/ml MW ± 144,1 µg/ml SD, n=20) wieder, bzw. reflektieren

Unterschiede in der Effizienz der RT-Reaktion. Da jedoch, wie nachfolgend erläutert, der Quotient aus behandelter und unbehandelter Hemisphäre zur Beurteilung der Genregulation analysiert wurde, kommt der absoluten mRNA-Menge eine geringe Bedeutung bei, solange eine für die Analyse hinreichende Menge isoliert werden konnte.

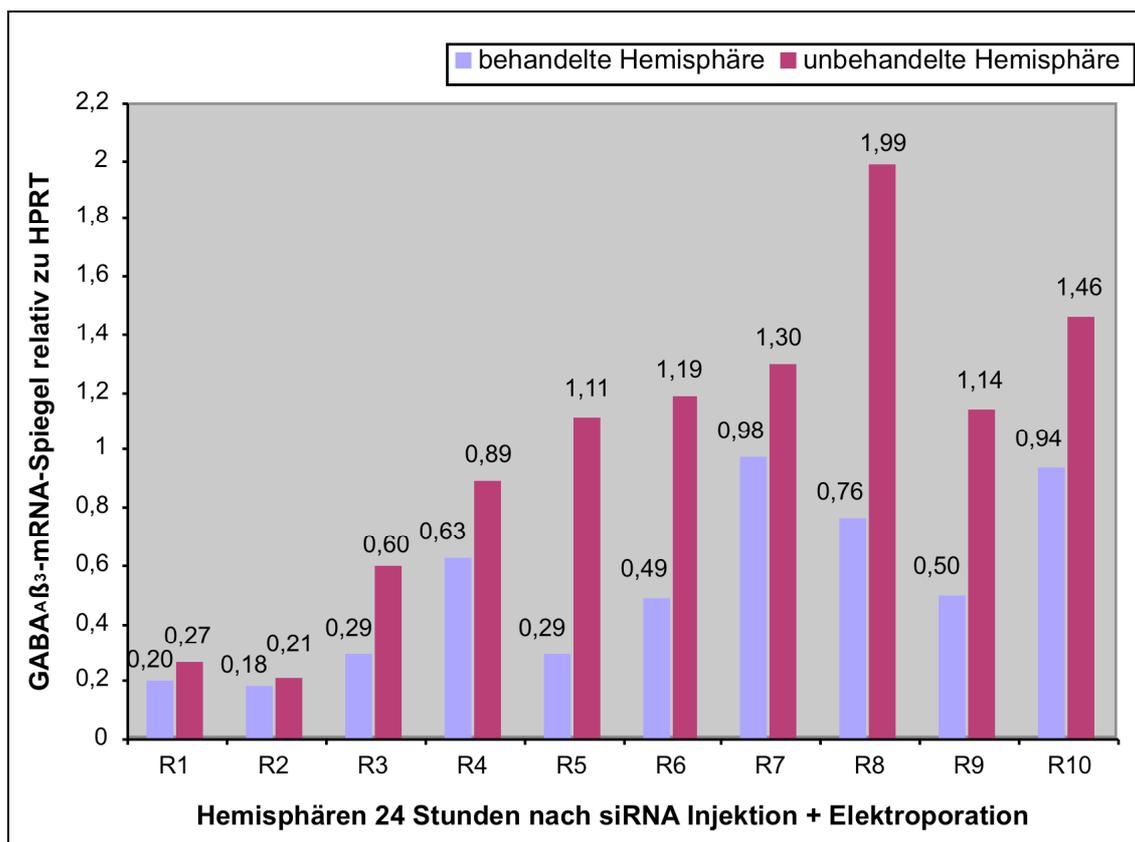


Abbildung 3.1: Darstellung der GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel relativ zum HPRT-mRNA-Spiegel der jeweiligen ipsilateralen behandelten und kontralateralen unbehandelten Hemisphären der individuellen Versuchstiere (R1-R10) 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation.

Zur Ermittlung der Expressionsveränderung von GABA_Aβ₃ im behandelten Areal im Verhältnis zur kontralateralen Seite (folgend als normiertes GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel bezeichnet) und um die Frage zu klären, ob die Injektion von siRNA in Kombination mit Elektroporation eine Reduktion der Ziel-mRNA zur Folge hatte, also zu einem Knock-Down führte, wurden diese GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspiegel in Abbildung 3.2 dargestellt.

Die auf die unbehandelten Hemisphären normierten relativen GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel sanken in den behandelten Versuchstieren unterschiedlich stark, wobei eine Reduktion im Mittel auf 57% ± 20% SD (n=10) der Ausgangswerte beobachtet werden konnte.

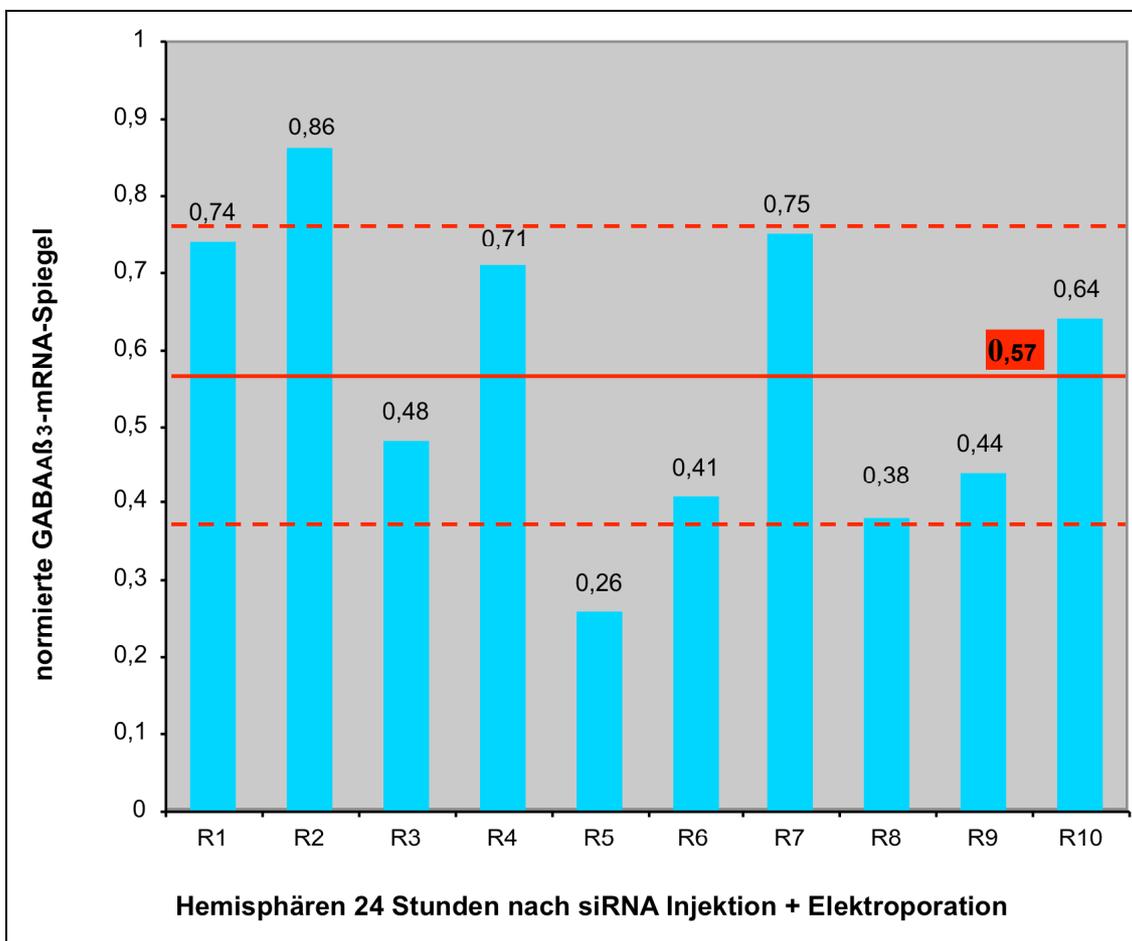


Abbildung 3.2: Darstellung der normierten GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel der individuellen Versuchstiere (R1-R10) 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) werden mit durchgehende bzw. gestrichelten Linien dargestellt.

Die Kontrollreihe wird in Abbildung 3.3 dargestellt. Diese Tiere wurden identisch wie die Versuchstiere behandelt, mit dem Unterschied, dass an Stelle der siRNA 5µl NaCl injiziert wurden. Hier werden die GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel relativ zum Spiegel der HPRT-mRNA der jeweiligen Hemisphären (ipsi- und kontralateral) für alle individuellen Kontrolltiere 24 Stunden nach Behandlung gegenübergestellt.

Bei den Kontrolltieren konnte, wie bei den Versuchstieren, eine große individuelle Variabilität im relativen mRNA-Spiegel unter den Tieren beobachtet werden. Die Ursache hierfür ist wie bei den Tieren der Versuchsgruppe in der großen Variabilität der Gesamt-RNA-Ausbeute zu suchen (291,5µg/ml MW ± 262,7µg/ml SD, n=14). Allerdings wichen die relativen mRNA-Spiegel der beiden Hemisphären im gleichen Tier nicht sehr stark voneinander ab.

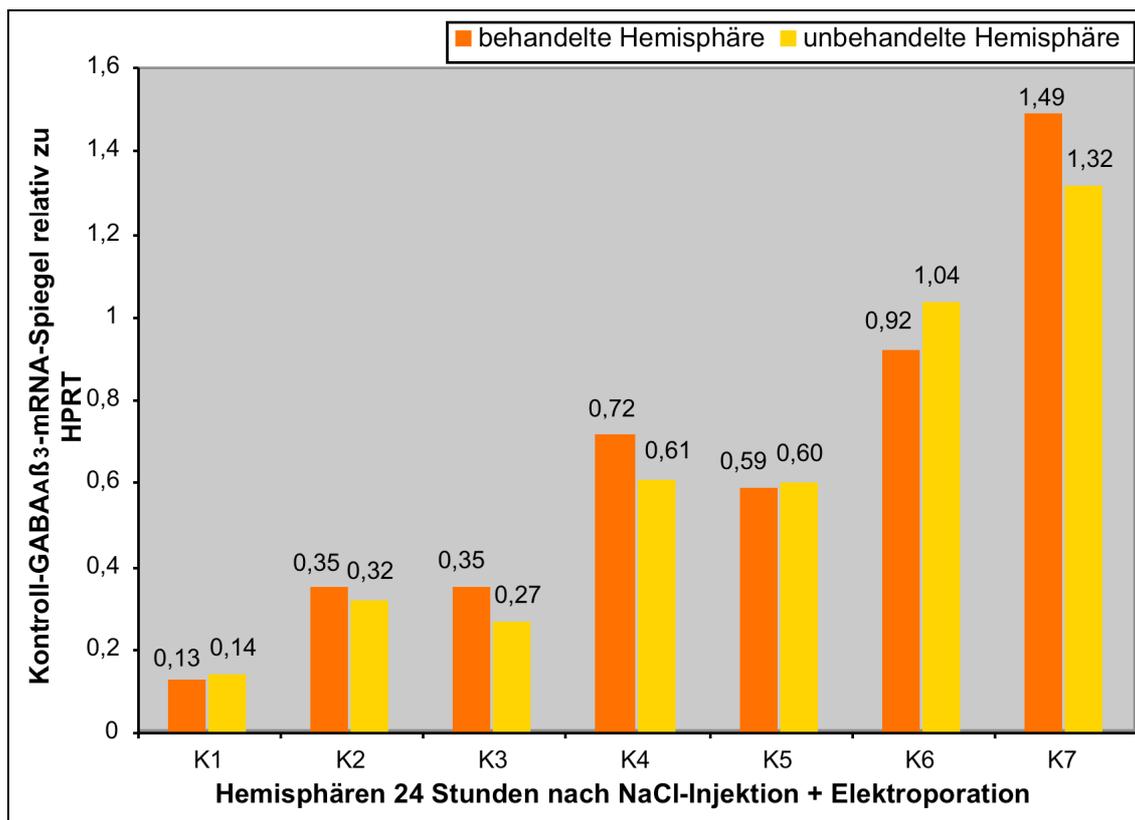


Abbildung 3.3: Darstellung der GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel relativ zum HPRT-mRNA-Spiegel der jeweiligen ipsilateralen behandelten und kontralateralen unbehandelten Hemisphären der individuellen Kontrolltiere (K1-K7) 24 Stunden nach NaCl-Injektion mit kombinierter Elektroporation.

In Abbildung 3.4 werden analog zur Darstellung in Abbildung 3.2 die auf die unbehandelten kontralateralen Hemisphären normierten relativen GABA_Aβ₃-mRNA-Level der individuellen Tiere der Kontrollgruppe abgebildet. Hier zeigte sich im Mittel (107% ± 15% SD, n=7) nur eine geringe Veränderung zu den Ausgangswerten.

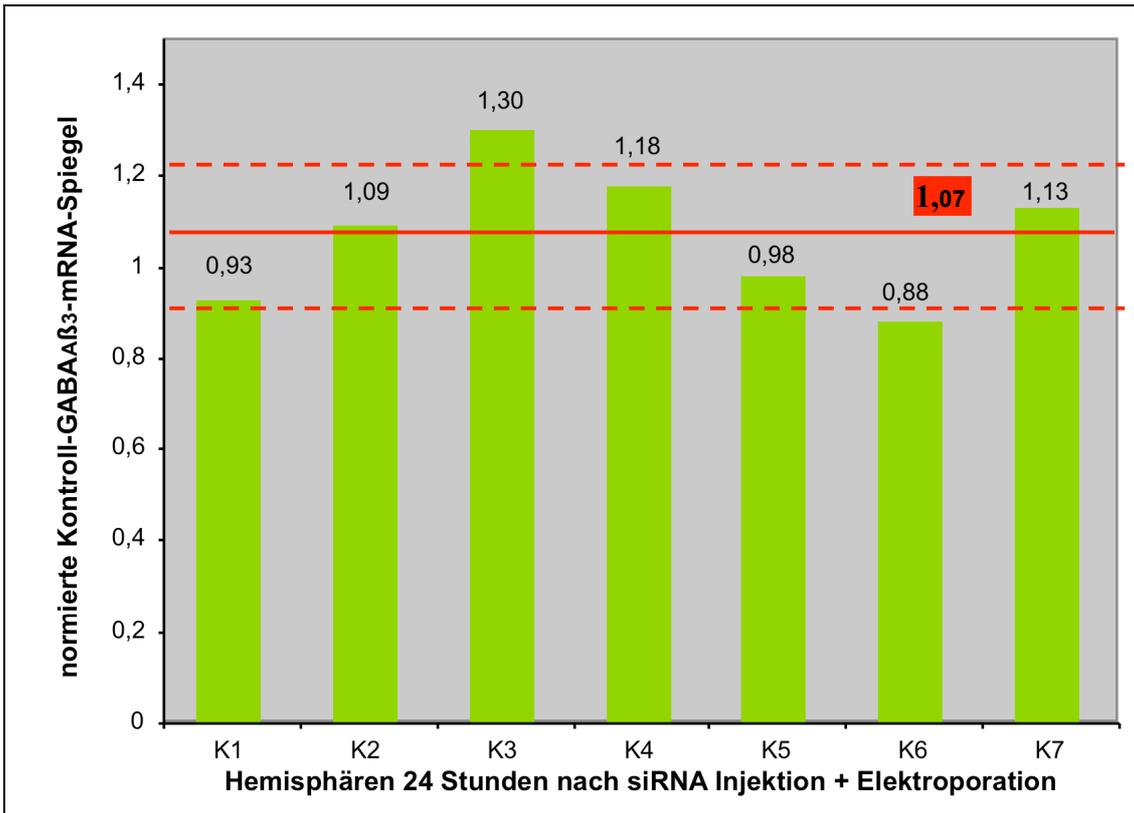


Abbildung 3.4: Darstellung der normierten GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel der individuellen Kontrolltiere (K1-K7) 24 Stunden nach NaCl-Injektion mit kombinierter Elektroporation. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) werden mit durchgehend bzw. gestrichelten Linien dargestellt.

Abbildung 3.5 stellt die Mittelwerte der behandelten ipsilateralen Hemisphären und die Mittelwerte der unbehandelten kontralateralen Hemisphären der Versuchstiere denen der Kontrolltiere gegenüber. Die Versuchstiere zeigten 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation im behandelten Areal einen signifikanten Unterschied des GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspegel im Vergleich zu den GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspegel in den unbehandelten Hemisphären. Im Kontrast dazu konnte zwischen den Hemisphären der Kontrolltiere 24 Stunden nach NaCl-Injektion mit kombinierter Elektroporation kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die statistische Auswertung mit einem gepaarten t-Test zeigte eine signifikante (**) Reduktion des GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel zwischen den beiden Hemisphären der Versuchsgruppe (P= 0,002, n=10).

Hingegen ergab ein gepaarter t-Test der GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel zwischen den beiden Hemisphären der Kontrollgruppe keine Signifikanz (P= 0,358, n=7). Der 95% Konfidenzintervall lag bei der Versuchsreihe zwischen -0,754 und -0,226, bei der Kontrollreihe zwischen -0,052 und 0,123.

Die Effektgröße betrug -1,668 (Cohen's d für abhängige Proben) im Hemisphären-Vergleich für Versuchstiere und im Gegensatz dazu 0,390 für Kontrolltiere.

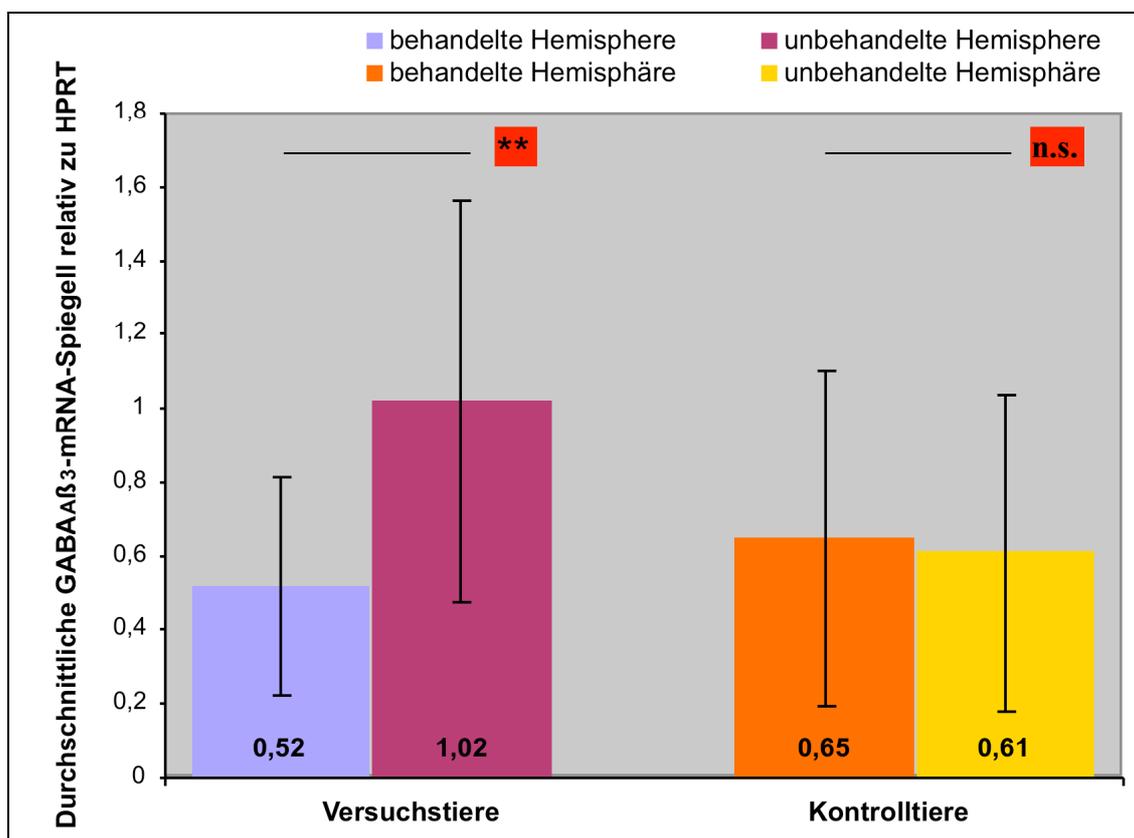


Abbildung 3.5: Darstellung der durchschnittlichen GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspiegel der behandelten ipsilateralen und unbehandelten kontralateralen Hemisphären relativ zu HPRT der Versuchstiere (n=10) 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation im Vergleich zu denen der Kontrolltiere (n=7) nach NaCl-Injektion mit kombinierter Elektroporation. Die jeweilige Standardabweichung (SD) wird durch vertikale Linien dargestellt.

In Abbildung 3.6 werden die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichung (SD) der normierten $GABA_A\beta_3$ -Spiegel der beiden Gruppen (Versuchstiere vs. Kontrolle) gegenübergestellt. Die statistische Auswertung mit einem t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($P = <0,001$, $n=7$). Der 95% Konfidenzintervall lag zwischen $-0,692$ und $-0,316$.

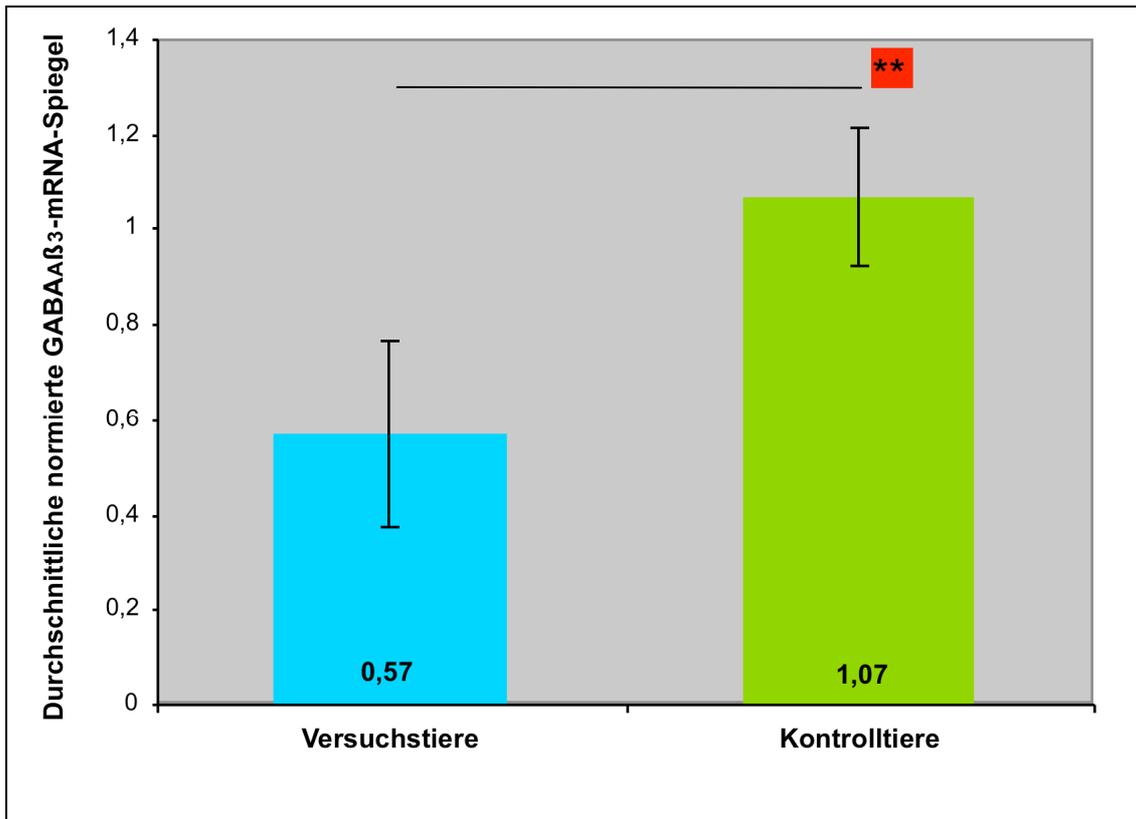


Abbildung 3.6: Darstellung der durchschnittlichen normierten $GABA_A\beta_3$ -mRNA-Spiegel der Versuchstiere ($n=10$) 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation im Vergleich zu denen der Kontrolltiere ($n=7$) nach NaCl-Injektion mit kombinierter Elektroporation. Die jeweilige Standardabweichung (SD) wird durch vertikale Linien dargestellt.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der mittels Injektion von gegen $GABA_A\beta_3$ gerichteter siRNA kombiniert mit lokaler Elektroporation und darauf folgende RNAi, die $GABA_A\beta_3$ -mRNA-Expression junger SD-Ratten in vivo signifikant manipulieren kann.

4.1 Mögliche Nebeneffekte der Elektroporation und die Spezifität der Knock-Down Raten

Für die Elektroporation müssen Elektroden ins Gewebe eingebracht werden. Dazu muss man die entsprechenden über dem Gewebe liegenden Schichten freilegen bzw. diese mit den Elektroden bis zum Zielgewebe hin durchdringen. Durch das invasive Vorgehen kann es zu den allgemeinen Risiken wie Gewebe-, Nerven und Gefäßschädigung kommen. Bei der Elektroporation werden kurze elektrische Impulse mit hoher Spannung über Elektroden in das umliegende Gewebe abgegeben. Bei langen Impulsen mit hoher Spannung konnte laut Bonnafous et al. (1999) die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) beobachtet werden. Ebenfalls wurden bei so hohen Spannungen vaskuläre Veränderungen mit einer Reduktion des Blutflusses beobachtet (Gehl et. al., 2002). Laut Akanea et al. (2005) konnten keine Apoptosevorgänge festgestellt werden. Ein identischer Test wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Apoptosevorgänge können daher nicht ausgeschlossen werden. Bei möglichen Entzündungsvorgängen, die mit dem Eingriff assoziiert sind, könnten Entzündungsmediatoren freigesetzt worden sein, die wiederum die Neurone und die Expressionsspiegel von $GABA_A\beta_3$ und somit die Knock-Down Raten beeinflusst haben könnten. Dies konnte jedoch nicht in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass Inflamationsprozesse erst nach mehreren Tagen sichtbar geworden wären. Denkbar wären auch Gewebeschädigungen, die selektiv GABA und nicht das Haushaltsgen betreffen. Eine mögliche Verfälschung der Knock-Down Raten durch solch eine selektive Gewebeschädigung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft und kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren kann keine Aussage bezüglich der Feldstärke über das Gebiet gemacht werden, in dem elektroporiert wurde, da nicht überprüft wurde, ob die Feldstärken homogen waren, was auch messtechnisch schwer zu realisieren wäre. Dabei bestände die Möglichkeit, dass nicht alle Zellen des Gebietes elektroporiert wurden, da lokal zu geringe Feldstärken vorherrschen könnten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Knock-Down-Rate von 57% dem Umstand geschuldet ist, dass die erfolgreich elektroporierten Zellen einen sehr starken Knock-Down erzeugen, jedoch deren Anteil in der Gewebeprobe anteilig zu gering ausfiel, um Knock-Down-Raten wie anderswo beschrieben (Akanea et al., 2005; Guo et al., 2006) im Nachweis zu liefern. Dennoch zeigten die Versuchstiere in dieser Arbeit 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation im behandelten Areal einen signifikanten Unterschied des GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspiegel im Vergleich zu den GABA_Aβ₃-mRNA-Expressionspiegel in den unbehandelten Hemisphären. Im Kontrast dazu konnte zwischen den Hemisphären der Kontrolltiere 24 Stunden nach NaCl-Injektion mit kombinierter Elektroporation kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung mit einem gepaarten t-Test zeigte eine signifikante Reduktion des GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel zwischen den beiden Hemisphären der Versuchsgruppe wo hingegen ein gepaarter t-Test der GABA_Aβ₃-mRNA-Spiegel zwischen den beiden Hemisphären der Kontrollgruppe keine Signifikanz ergab. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Effekt nicht durch Zufall erklärt werden kann.

4.2 Art der Gewebeentnahme

Für die Gewebeentnahme wurden mit einem Mikroschneider 1mm dicke Frontalschnitte angefertigt. Aus dem Schnitt, in dem die Injektionsstelle zu erkennen war, wurde eine Gewebeprobe auf der ipsilateral behandelten Seite im Bereich der stattgefundenen Injektion sowie der kontralateral unbehandelten Hemisphäre ausgestanzt.

Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Art der Probenentnahme der relative Anteil der Gebiete mit elektroporierten und nicht-elektroporierten Zellen variierte. Hieraus könnte sich ein Teil der Varianzen in den Versuchs-Knock-Down-Raten erklären.

4.3 siRNA-Konzentration und RNAi

Es wurden 5µL 20µM gegen GABA_Aβ₃ gerichtete siRNA für die Injektion verwendet. Bei hohen siRNA-Konzentrationen besteht die Möglichkeit, dass die Zelle mit siRNA überfrachtet wird. Es gibt Hinweise darauf, dass diese siRNA mit der miRNA der Zellen um die Bindung in den RISC-Komplex konkurriert (Tang et al., 2003). Die auf miRNA basierende normale Genregulation könnte beeinträchtigt werden und die Folgen für die Zellhomöostase sind schwer hervorzusehen. Aus diesem Blickwinkel sind mögliche Therapieansätze basierend auf RNAi Technologie kritisch zu hinterfragen und bedürfen einer genauen Prüfung der Dosis-Wirkung-Beziehung (Grimm et al., 2006). Grimm et al. (2006) beschreiben in ihrer Arbeit Langzeitfolgen einer hohen shRNA-Expression (englisch: short hairpin RNA), die durch Dicer zu siRNA prozessiert wird, mit Überflutung des endogenen RNAi-Pfades. Sie injizierten 49 verschiedene AAV8-(Adenovirus Typ8)/shRNA-Vektoren in die Leber von Mäusen, woher sich die shRNAs sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz unterschieden und gegen sechs verschiedene Ziele gerichtet waren. 36 von ihnen überlasteten jeweils die zelleigene RNAi und führen zu dosisabhängigen Leberschäden. In 23 Fällen starben die Mäuse an den Nebenwirkungen. Die Morbidität war assoziiert mit der Herunterregulation der in Leberzellen produzierten miRNA. Grimm et al. (2007) gehen davon aus, dass es, wie oben bereits erwähnt, zum Konkurrieren der RNAs um die für die RNAi nötigen Zellfaktoren kam. Inwiefern im kurzen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden diese Effekte in Erscheinung treten, bleibt jedoch fraglich. Es wird in mehrere Arbeiten über eine Zeitabhängigkeit der RNAi diskutiert (Hannon, 2002; Akaneya et al., 2005).

In wie weit diese eine Auswirkung auf die Beeinflussung der GABA_Aβ₃-mRNA-Expression hat und wie genau die Halbwertszeit (HWZ) der Wirkung der gegen GABA_Aβ₃ gerichteten siRNA ist, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, da alle Auswertungen 24 Stunden nach siRNA-Injektion mit kombinierter Elektroporation stattgefunden haben. Es ist allerdings bekannt, dass RNA rasch in den Zellen verstoffwechselt wird und somit ist mit einem transienten Charakter des Knock-Downs zu rechnen (Schroeder et al., 2006).

4.4 siRNA-Transfer

Es gibt unterschiedliche Methoden für den Transfer einer siRNA in lebendes Gewebe. Welche Strategie angewandt werden soll hängt von der Fragestellung ab. In dieser Arbeit wurde gezielt gegen GABA_Aβ₃ gerichtete siRNA in eine begrenzte Zielregion im Neokortex junger SD-Ratten injiziert und durch Elektroporation in die Zelle verholpen. Es ist allerdings nicht nachgewiesen worden, in welchen Neuronen die siRNA tatsächlich angekommen ist. Dies hätte durch Verwendung von Fluoreszenz-markierter siRNA zum Abschätzen der Effizienz ihres Transfers in die Zellen beobachtet werden können, wie an anderer Stelle dokumentiert worden ist (Chan et al., 2006; Guo et al., 2006; Gresch et al., 2004; John et al., 2003). Durch Fluoreszenz-Markierung hätten entsprechende Zellen visualisiert und gegebenenfalls sogar gezielt mittels Laser-Cutting-Microdissection aus dem Gewebe isoliert werden können, um lokal elektroporierte von nicht-elektroporierten Zellen unterscheiden und analysieren zu können.

4.5 Interferonantwort

In der Regel reagieren Säugetierzellen auf längere doppelsträngige RNA, wie z.B. aus Viren stammend, mit einer verstärkten Interferonexpression, indem die Proteinkinase R (PKR) aktiviert wird (Kuhlmann et al., 2004). Diese greift hemmend in die Translation ein und verursacht letztendlich den apoptotischen Zelltod.

Dies scheint ein Schutzmechanismus dieser Zellen auf eine virale Invasion zu sein (Sledz et al., 2003). Deshalb wurden kurze synthetische doppelsträngige 21nt lange RNAs zum „Genesilencing“ eingesetzt (Elbashir et al., 2001). Diese siRNAs sind vermutlich klein genug, um die PKR nicht zu aktivieren und umgehen somit das zelluläre Apoptoseprogramm. Mehrere Untersuchungen zeigten aber, dass in Abhängigkeit von der siRNA-Dosis dennoch eine Interferonantwort erfolgen kann (Kuhlmann et al., 2004; Bridge et al., 2003, Flynn et al., 2004). Die zu erwartenden Interferoninduzierten Nebenwirkungen bei in vivo-Anwendung geben zu größter Vorsicht Anlass (Kuhlmann et al., 2004). Sledz et al. (2003) fanden heraus, dass gegen Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gerichtete siRNA zu einer erhöhten mRNA-Expression der Interferon-Stimulierenden Gene (ISGs) führte. Bei Akaneyas et al. (2006) Elektroporationsversuchen konnte allerdings keine signifikante erhöhte Expression der 5'-Oligoadenylatsynthase 1 (OAS1), Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumornekrose-faktor α (TNF α) beobachtet werden. In wie weit und ob überhaupt eine Interferonantwort einen Einfluss auf die GABA β_3 -mRNA-Expressionsrate hatte, kann nicht gesagt werden.

4.6 Schlussfolgerung und Perspektiven

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass durch die in vivo Injektion von gegen GABA β_3 gerichteter siRNA (RNA-Interferenz) kombiniert mit lokaler Elektroporation mit einer Applikationsfolge von 7 Rechteckpulsen (50ms Dauer, 40 Volt, 1Hz Frequenz) eine signifikante Reduktion der GABA β_3 -mRNA-Spiegel nach 24 Stunden erreicht werden konnte.

Auf Grund der Ergebnisse scheint dieses Procedere für die Manipulation des GABA β_3 -mRNA-Spiegel in Ratten, sowie vermutlich auch in anderen Säugerspezies, eine vielversprechende Methode zur lokalen und zeitlich begrenzten RNAi im ZNS zu sein. Dennoch bedürfen einige Fragen, wie oben bereits erwähnt, detaillierter Klärung.

Diese Arbeit soll methodisch den Weg zur Anwendung der auf siRNA mit kombinierter Elektroporation in GABA β_3 exprimierenden Hirnarealen ebnen.

Darauf aufbauend kann durch den lokalen Knock-Down von GABA_Aβ₃ gezielt in die Kombination der Untereinheit des GABA_A-Rezeptors eingegriffen werden und die Funktion von GABA_Aβ₃ bezüglich ihrer Rolle in der Generierung von IPSPs sowohl in vivo als auch im akuten Hirnschnitt untersucht werden. Die beschriebene Methodik ermöglicht durch ihre lokale Anwendbarkeit eine Manipulation auf Ebene kleiner Netzwerke, wie dies im klassischen Mausmodell mit globaler Manipulation nur schwer oder gar nicht zu realisieren wäre. Sie ist gegenüber anderen lokalen genetischen Manipulationsmöglichkeiten, wie dem Einsatz von viralen Vektorsystemen mit Blick auf die Kosten, den zeitlichen Aufwand und nicht zuletzt bezüglich der Sicherheitsfrage überlegen. Die Methode bietet in der Perspektive auch die Möglichkeit einer Anwendung im nicht-menschlichen Primaten mit der Aussicht, die Rolle einzelner Proteine bzw. Ionenkanäle im Cortex höherer kognitiver Funktionen zu beschreiben, wie dies bisher in Ermangelung von Verfahren zur genetischen Manipulation dieser Tiere nicht möglich ist.

5. Zusammenfassung

GABA_A-Rezeptoren sind in Nervenzellen postsynaptisch lokalisiert und besitzen eine Bindungsstelle für den inhibitorischen Neurotransmitter GABA sowie weitere allosterische Bindestellen, unter anderem für Barbiturate und Neurosteroiden an der β -Untereinheit (UE). Die Bindung von GABA aktiviert den Einstrom von Chloridionen durch die Kanalpore, was zur Entstehung eines inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) führt. Diese Hyperpolarisation der Membran führt zu einer verminderten Erregbarkeit der postsynaptischen Neurone. Strukturell handelt es sich bei den GABA_A-Rezeptoren um Heteropentamere, die zum größten Teil aus zwei α -, zwei β - und einer γ -UE aufgebaut sind. Die β_3 -UE der GABA_A-Rezeptoren (GABA_A β_3) ist hauptsächlich im Hippokampus, im zerebralen Cortex und Cerebellum lokalisiert.

In dieser Arbeit wurde die Expression von GABA_A β_3 -mRNA im Neokortex der Ratte mittels RNA-Interferenz (RNAi) *in vivo* manipuliert. RNAi ist ein intrinsischer Mechanismus, der durch small-interfering-RNA (siRNA) vermittelt wird. Die aus 21-23 Nukleotiden lange doppelsträngige siRNA ist in der Lage sich an eine komplementäre Sequenz der mRNA zu binden und mit Hilfe des RNA-induced-silencing-complex (RISC) diese dort zu schneiden. Die Schnittprodukte werden intern abgebaut, was zu einem sogenannten Knock-Down in ihrer spezifischen Ziel-mRNA, hier GABA_A β_3 -mRNA, und somit zu einer Reduktion der Expressionsrate des Zielproteins führt. Hierfür wurde gegen GABA_A β_3 gerichtete siRNA in den Neokortex junger Ratten injiziert. Die Aufnahme der siRNA in die Zellen wurde durch lokale Elektroporation erreicht. Nach 24 Stunden wurden sowohl aus der elektroporierten Region wie auch aus dem unbehandelten kontralateralen Gebiet im gleichen Tier Gewebeproben entnommen und verarbeitet. Durch quantitative Real-Time-PCR wurden die GABA_A β_3 -mRNA-Expressionsraten relativ zum stabil exprimierten Haushaltsgen HPRT bestimmt.

Es kann gezeigt werden, dass die GABA_A β_3 -mRNA-Expressionspiegel sowohl in den behandelten Hemisphären als auch im Mittel verglichen mit einer NaCl-injizierten Kontrollgruppe nach 24 Stunden signifikant reduziert waren.

Literaturnachweis

Agarwala S., Sanders T.A., Ragsdale C.W. (2001) Sonic Hedgehog Control of Size and Shape in Midbrain Pattern Formation. *Science* 291(5511):2147-2150

Akaneya Y., Jiang B., Tsumoto T. (2005) RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J Neurophysiol* 93:594-602

Akaneya Y., Tsumoto T. (2006) Bidirectional trafficking of prostaglandin E2 receptors involving in long-term potentiation in visual cortex. *J Neurosci* 26:10209-10221

Ambros V., Bartel B., Bartel D.P., Burge C.B., Carrington J.C., Chen X., Dreyfuss G., Eddy S.R., Griffiths-Jones S., Marshall M., Matzke M., Ruvkun G., Tuschl T. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9(3):277-279

Atchison R.W., Casto B.C., Hammon W.M. (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149: 754-6

Barbin G., Pollard H., Gaarsa J.L., Ben-Ari Y. (1993) Involvement of GABA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 152:150-154

Barquinero J., Eixarch H., Pérez-Melgosa M. (2004) Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Therapy* 11:3-9

Behar T.N., Schaffner A.E., Scott C.A., Greene C.L., Barker J.L. (2000) GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb. Cortex* 10:899-909

Behar T.N., Schaffner A.E., Colton C.A., Somogyi R., Olah Z., Lehel C., Barker J.L. (1994) GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 14:29-38

Belhage B., Hansen G.H., Elster L., Schousboe A. (1998) Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function, *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5:235-246.

Benke D., Fritschy J.M., Trzeciak A., Bannwarth W., Mohler H. (1994) Distribution, prevalence, and drug binding profile of gamma-aminobutyric acid type A receptor subtypes differing in the beta-subunit variant. *J Biol Chem.* 269(43): 27100-27107

Bennett J. (2003) Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. *Gene Ther.* 10(11): 977-982

Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*.18; 409 (6818):363-366

Betz H. (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: The amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5:383-392

Beyret E., Grivna ST, Wang Z, Lin H. (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* 20(13):1709-1714

Billy E., Brondani V., Zhang H., Müller U., Filipowicz W. (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *PNAS* 98:14428-14433

Bloom F.E., Iversen L.L. (1971) Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 229:628-630

Bonafous P., Vernhes M.-C., Teissie J.; Gabriel B. (1999) The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electropermeabilisation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane *Biochim Biophys Acta* 1461:123-134

Brantl S. (2002) Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 1575:15-25

Bridge A.J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A.L., Iggo R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet.*34(3):263-264

Buller R.M., Janik J.E., Sebring E.D., Rose J.A. (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40(1): 241-247

Bustin S., Nolan T. (2004). Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase-Chain-Reaction. *J Biomol Tech* 15:155-166

Capodici J., Kariko K., Weissman D. (2002) Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J.Immunol.* 169: 5196-5201

Cerutti H., Casas-Mollano A. (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50: 81 - 99

Cerutti L., Mian N., Bateman A. (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci.* 25(10):481-482

Chan S.M., Olson J.A., Utz P.J. (2006) Single-cell analysis of siRNA-mediated gene silencing using multiparameter flow cytometry. *Cytometry A* 69:59-65

Chang Y., Wang R., Barot S., Weiss D.S. (1996) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *J. Neurosci.* 16:5415-5424

Cheung A.K., Hoggan M.D., Hauswirth W.W., Berns K.I. (1980) Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33(2): 739-48

Coburn G.A., Cullen B.R. (2002) Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J.Virol.* 76: 9225-9231

Collins R.E., Cheng X. (2006) Structural and biochemical advances in mammalian RNAi. *J Cell Biochem.* 99(5): 1251-1266

Connolly C.N., Wooltorton J.R., Smart T.G., Moss S.J. (1996) Subcellular localization of gamma-aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor beta subunits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(18):9899-9904

Darlison M.G., Pahal I., Thode C. (2005) Consequences of the evolution of the GABA(A) receptor gene family. *Cell Mol Neurobiol.* 25(3-4):607-624

DeLorey T.M., Olsen R.W. (1992) Gamma-aminobutyric acid, a receptor structure and function. *J. Biol. Chem.* 267: 16747-6750

Doran S.E., Ren X.D., Betz A.L., Pagel M.A., Neuwelt E.A., Roessler B.J., Davidson B.L. (1995) Gene expression from recombinant viral vectors in the central nervous system after blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery.* 36(5):965-970

Drexler B., Jurd R., Rudolph U., Antkowiak B. (2006) Dual actions of enflurane on postsynaptic currents abolished by the gamma-aminobutyric acid type A receptor beta3(N265M) point mutation. *Anesthesiology* 105(2):297-304

Echeverri C.J., Beachy P.A., Baum B., Boutros M., Buchholz F., Chanda S.K., Downward J., Ellenberg J., Fraser A.G., Hacohen N., Hahn W.C., Jackson A.L., Kiger A., Linsley P.S., Lum L., Ma Y., Mathey-Prévôt B., Root D.E., Sabatini D.M., Taipale J., Perrimon N., Bernards R. (2006) Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods.* 10: 777-779

Echeverri C.J., Perrimon N. (2006) High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* 7:373-384

Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 24; 411: 494-498

Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W., Tuschl T. (2001) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20(23):6877-6888

Elbashir S.M., Harborth J., Tuschl T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 24; 411:494-498

Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T. (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods.* 26(2):199-213

Enna S.J., Snyder S.H. (1976) A simple, sensitive and specific radioreceptor assay for endogenous GABA in brain tissue. *J Neurochem* 26:221-224

Erecinska M. (1987) The neurotransmitter amino acid transport systems *Biochem Pharm* 36 (21):3547-3555

Erlander M.G., Tillakaratne N.J.K., Feldblum S., Patel N., Tobin A.J. (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7:91-100

Esclapez M., Tillakaratne N.J.K., Kaufman D.L., Tobin A.J., Houser C.R. (1994) Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neuroscience* 14 (3):1834-1855

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811

Fiszman M.L., Borodinsky L.N., Neale J.H. (1999) GABA induces proliferation of immature cerebellar granule cells grown in vitro, *Dev.Brain Res.* 115:1-8

Flynn M.A., Casey D.G., Todryk S.M., Mahon B.P. (2004) Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo. *J Inflamm (Lond).* 1(1):4

Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K. (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Fritschy J.M., Mohler H. (1995) GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol.* 359(1):154-194

Fritschy J.M., Paysan J., Enna A., Mohler H. (1994) Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci.* 14(9):5302-5324

Fritschy J.M., Benke D., Mertens S., Oertel W.H., Bachi T., Möhler H. (1992) Five subtypes of type A gamma-aminobutyric acid receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.*89(15):6726-6730

Fukuchi- Shimogori T., Grove E.A. (2001) Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* 294:1071-1074

Fykse E., Fonnum F. (1988) Uptake of γ -aminobutyric acid by a synaptic vesicle fraction isolated from rat brain. *J Neurochem* 50 (4):1237-1242

Gehl J., Skovsgaard T., Mir L.M. (2002) Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery *Biochimica et Biophysica Acta* 1569:51-58

Glatt K., Glatt H., Lalande M. (1997) Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. *Genomics.* 41(1): 63-69

Glatt K., Sinnott D., Lalande M. (1994) The human γ -amino butyric acid receptor subunit b3 and a5 gene cluster in chromosome 15q11–q13 is rich in highly polymorphic (CA)_n repeats. *Genomics* 19:157-160

Goodchild C.S. (1993) GABA receptors and benzodiazepines. *Br. J. Anaesth.* 71:127-133

Greger V., Knoll J.H.M., Woolf E., Glatt K., Tyndale R.F., DeLorey T.M., Olsen R.W. et al. (1995) The gamma-aminobutyric acid receptor gamma 3 subunit gene (GABRG3) is tightly linked to the alpha 5 subunit gene (GABRA5) on human chromosome 15q11–q13 and is transcribed in the same orientation. *Genomics* 26:258-264

Gresch O., Engel F.B., Nesic D., Tran T.T., England H.M., Hickman E.S., Korner I., Gan L., Chen S., Castro-Obregon S., Hammermann R., Wolf J., Muller-Hartmann H., Nix M., Siebenkotten G., Kraus G., Lun K. (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33:151-163

Grimm D., Kay M.A. (2007) Combinatorial RNAi: a winning strategy for the race against evolving targets? *Mol Ther.* 15(5):878-888

Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F., Kay M.A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441(7092):537-541

Grivna S.T., Pyhtila B., Lin H. (2006) MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(36):13415-13420

Guo S., Kempthues K.J. (1995) Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Scr/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620

Guo W., Robbins M.T., Wei F., Zou S., Dubner R., Ren K. (2006) Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *J Neurosci* 26:126-137

Gutiérrez R., Heinemann U. (2006) Co-existence of GABA and Glu in the hippocampal granule cells: implications for epilepsy. *Curr Top Med Chem.* 6(10):975-978

Hamet P., Tremblay J. (2006) Genetics of the sleep-wake cycle and its disorders. *Metabolism: clinical and experimental.* 55:7-12

Hammond S.M. (2005) Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579(26): 5822 – 5829

Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., Hannon G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293 (5532):1146-1150

Hammond S.M., Bernstein E., Beach D., Hannon G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296

Hannon G.J. (2002) RNA interference. *Nature* 418:244-251

Haycock J.W., Levy W.B. (1978) Effects of elevated $[K^+]_0$ on the release of neurotransmitters from cortical synaptosomes: efflux or secretion? *J Neurochem* 30:1113-1125

Heidenreich O., Krauter J., Riehle H., Hadwiger P., John M., Heil G., Vornlocher H.P., Nordheim A. (2003) AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood* 101:3157-3163

Hempelmann A., Cobilanschi J., Heils A., Muhle H., Stephani U., Weber Y., Lerche H., Sander T. (2007) Lack of evidence of an allelic association of a functional GABRB3 Exon 1a promoter polymorphism with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy research.* 74 (1): 28-32

Herd M.B., Haythornthwaite A.R., Rosahl T.W., Wafford K.A., Homanics G.E., Lambert J.J., Belelli D. (2008) The expression of GABA_A beta subunit isoforms in synaptic and extrasynaptic receptor populations of mouse dentate gyrus granule cells. *J Physiol.* 586(4):921-1004

Hirouchi M., Kuriyama K. (1994) Molecular pharmacology of GABA_A and GABA_B receptors. *Nippon. Yakurigaku. Zasshi.* 104:199-206

Houston C.M., Hosie A.M., Smart T.G. (2008) Distinct regulation of beta2 and beta3 subunit-containing cerebellar synaptic GABA_A receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci.* 28(30):7574-8754

Hu W.Y., Myers C.P., Kilzer J.M., Pfaff S.L., Bushman F.D. (2002) Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr.Biol.* 12: 1301-1311

Ikeda Y., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H. (1997) GABA receptor stimulation promotes survival of embryonic rat striatal neurons in culture, *Dev. Brain Res.* 98:253-258

Immisch C. (2006) Synthese und Analytik von TmHU, dem Histon-ähnlichen Protein aus *Thermotoga maritima*, und dessen Einsatz als proteinogenes Gentransfersystem. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Isacson R., Kull B., Salmi P., Wahlestedt C. (2003) Lack of efficacy of 'naked' small interfering RNA applied directly to rat brain. *Acta Physiol Scand.* 179(2): 173-177

Iwakuma T., Cui Y., Chang L.J. (1999) Self-Inactivating Lentiviral Vectors with U3 and U5 Modifications. *Virology.* 261(1): 120-132

Jensen M.L., Timmermann D.B., Johansen T.H., Schousboe A., Varming T., Ahring P.K. (2002) The beta subunit determines the ion selectivity of the GABA_A receptor. *J Biol Chem.* 277(44): 41438-41447

John M., Geick A., Hadwiger P., Vornlocher H.P., Heidenreich O. (2003) Gene silencing by RNAi in mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 26: Unit 26.2

Jones M.V., Westbrook G.L. (1995) Desensitized states prolong GABA_A channel responses to brief agonist pulses. *Neuron* 15: 181-191

Jovanovic J.N., Thomas P., Kittler J.T., Smart T.G., Moss S.J. (2004) Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability. *J Neurosci.* 24(2): 522-30.

Jurd R., Arras M., Lambert S., Drexler B., Siegwart R., Crestani F., Zaugg M., Vogt K.E., Ledermann B., Antkowiak B., Rudolph U. (2002) General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J.* 17(2): 250-252

Kafri T. (2004) Gene delivery by lentivirus vectors. An overview. *Methods Mol Biol.* 246: 367-390

Kaplitt M.G., Leone P., Samulski R.J., Xiao X., Pfaff D.W., O'Malley K.L., During M.J. (1994) Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet.* 8 (2):148-154

Katz B., Miledi R. (1970) Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol* 207: 789-801

Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J. (1991) Two forms of the γ -aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* 56 (2): 720-723

Klinke R. (1996) Erregungsübertragung in Zellverbänden. In: "Lehrbuch der Physiologie", *Klinke, R., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 2. Auflage, 59-78

Knoll J.H.M., Sinnott D., Wagstaff J., Glatt K., Wilcox A.S., Whiting P.J., Wingrove P. et al. (1993) FISH ordering of reference markers and of the gene for the alpha 5 subunit of the gammaaminobutyric acid receptor (GABRA5) within the Angelman and Prader-Willi syndrome chromosomal regions. *Hum. Mol. Genet.* 2:183-189

Kohn, Donald B. (2007) Lentiviral vectors ready for prime-time. *Nat Biotechnol.* 25(1):65-66

Kotin R.M., Siniscalco M., Samulski R.J., Zhu X.D., Hunter L., Laughlin C.A., McLaughlin S., Muzyczka N., Rocchi M., Berns K.I. (1990) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(6): 2211-2215

Kuhlmann M., Nellen W. (2004). Gen, sei still! RNAinterferenz. *Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. Nr.3.

Kuriyama K., Hirouchi M., Nakayasu H. (1993) Structure and function of cerebral GABA_A and GABA_B receptors. *Neurosci. Res.* 17:91-99

Laposky A.D., Homanics G.E., Basile A., Mendelson W.B. (2001) Deletion of the GABA(A) receptor beta 3 subunit eliminates the hypnotic actions of oleamide in mice. *Neuroreport.* 12(18): 4143-4147

- Lauder J.M., Han V.K.M., Henderson P., Verdoorn T., Towle A.C.** (1986) Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study, *Neuroscience* 19:465-493
- Lauder J.M., Liu J., Devaud L., Morrow A.L.** (1998) GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspect. Dev. Neuro-biol.* 5:247-259
- Laurie D.J., Seeburg P.H., Wisden W.** (1992) The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. *Journal of Neuroscience*
- Laughlin C.A., Cardellicchio C.B., Coon H.C.** (1986) Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol* 60(2): 515-524
- Li M., De Blas A.L.** (1997) Coexistence of two beta subunit isoforms in the same gamma-aminobutyric acid type A receptor. *J Biol Chem.* 272(26): 16564-16569
- Liu J., Morrow A.L., Devaud L., Grayson D.R., Lauder J.M.** (1997) GABA receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro, *J. Neurosci.* 17: 2420-2428
- Liu Q., Rand T.A., Kalidas S., Du F., Kim H.E., Smith D.P., Wang X.** (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science.* 301(5641):1921-1925
- Macdonald R.L., Olsen R.W.** (1994) GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:569-602
- Martinez J., Tuschl T.** (2004) RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18(9):975-980
- Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D.P., Zamore P.D.** (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell.* 123(4): 607-620
- McLaughlin S.K., Collis P., Hermonat P.L., Muzyczka N.** (1988) Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62(6): 1963-1973
- McMahon H.T., Nicholls D.G.** (1991) Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} . *J Neurochem* 56 (1):86-94
- Michler A.** (1990) Involvement of GABA receptors in the regulation of neurite growth in culture embryonic chick tectum. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8: 463-472

Mizukami K., Grayson D.R., Ikonovic M.D., Sheffield R., Armstrong D.M. (1998) GABAA receptor beta 2 and beta 3 subunits mRNA in the hippocampal formation of aged human brain with Alzheimer-related neuropathology. *Brain Res Mol Brain Res.* 56(1-2): 268-272

Modlich U., Bohne J., Schmidt M., von Kalle C., Knöss S., Schambach A., Baum C. (2006) Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood.* 108(8): 2545-2553

Mohler H., Malherbe P., Draguhn A., Richards J.G. (1990) GABA_A-receptors: structural requirements and sites of gene expression in mammalian brain. *Neurochem Res.* 15(2): 199-207

Mohler H., Fritschy J.M., Lüscher B., Rudolph U., Benson J., Benke D. (1996) The GABAA receptors. From subunits to diverse functions. *Ion Channels.* 4: 89-113

Moon C., Moon C., Kang W.S., Jeong D.C., Jin J.Y. (2003) Distribution of adenoviral vector in brain after intravenous administration. *J Korean Med Sci.* 18(1):108-111

Nakai H., Montini E., Fuess S., Storm T.A., Grompe M., Kay M.A. (2003) AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet.* 34(3): 297-302

Neumann E., Kakorin S., Toensing K. (1999). Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem.Bioenerg.* 48:3-16

Olsen R.W., Tobin A.J. (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J.* 4:1469-1480

Orban T.I., Izaurralde E. (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA.* 11(4): 459-469

Pardridge W.M. (2001) Brain drug targeting: the future of brain drug development. *Cambridge University Press*

Ralph G.S., Radcliffe P.A., Day D.M., Carthy J.M., Leroux M.A., Lee D.C., Wong L.F., Bilsland L.G., Greensmith L., Kingsman S.M., Mitrophanous K.A., Mazarakis N.D., Azzouz M. (2005) Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med.* 11(4): 429-433

Rand T.A., Petersen S., Du F., Wang X. (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 123(4): 621-629

Röhl T., Kurreck J. (2006) RNA interference in pain research. *J Neurochem.* 99(2):371-380

Ruppert C., Sandrasagra A., Anton B., Evans C., Schweitzer E.S., Tobin A.J. (1993) Rat-1 fibroblasts engineered with GAD65 and GAD67 cDNAs in retroviral vectors produce and release GABA. *J Neurochem* 61: 768-771

Rupprecht R. (2003) Neuroactive steroids: Mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology* 28: 139-168

Ruvkun G. (2001) Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*.294 (5543): 797-799

Saito K., Sakaguchi Y., Suzuki T., Suzuki T., Siomi H., Siomi M.C. (2007) Pimet, the Drosophila homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* 1;21(13):1603-1608

Sakmann B., Hamill O.P., Bormann J. (1983) Patch-clamp measurements of elementary chloride currents activated by the putative inhibitory transmitter GABA and glycine in mammalian spinal neurons. *J. Neural Transm. Suppl.* 18: 83-95

Samulski R.J., Berns K.I., Tan M., Muzyczka N. (1982) Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2077-2081

Samulski R.J., Zhu X., Xiao X., Brook J.D., Housman D.E., Epstein N., Hunter L.A. (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 10(12): 3941-3950

Sanchis-Segura C., Cline B., Jurd R., Rudolph U., Spanagel R. (2007) Etomidate and propofol-hyposensitive GABAA receptor beta3(N265M) mice show little changes in acute alcohol sensitivity but enhanced tolerance and withdrawal. *Neurosci Lett.* 416(3): 275-278

Sandoval M.E. (1980) Sodium-dependent efflux of [3H]-GABA from synaptosomes probably related to mitochondrial calcium mobilization. *J Neurochem* 35: 915-921

Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328: 221-227

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 31; 7:3

Simmerman J.M. (2002) Advances DNA vaccines., Electroporation-Based DNA Delivery, How Electroporation Works, Technology Overview, Nurse Pract.27(1):53-9; quiz 60-1

Skapenko A., Leipe J., Niesner U., Devriendt K., Beetz R., Radbruch A., Kalden J.R., Lipsky P.E., Schulze-Koops H. (2004) GATA-3 in human T cell helper type 2 development. *J. Exp. Med.* 199: 423-428

Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H., Williams B.R.G. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834-839

Smith G.B., Olsen R.W. (1995) Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 162-167

Sontheimer E.J. (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(2): 127-138

Steiger J.L., Russek S.J. (2004) GABA_A receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *Pharmacol Ther.* 101(3):259-281

Stephenson F.A. (1991) The GABA_A receptors: Structure and function. *Current Aspects of the Neurosciences (N. N. Osborne, Ed.)*, 3:177-193

Tanelian D.L., Kosek P., Mody I., MacIver M.B. (1993) The role of the GABA_A receptor/chloride channel complex in anesthesia. *Anesthesiology* 78: 757-776

Tang G., Reinhart B.J., Bartel D.P., Zamore P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 17(1): 49-63

Tomari Y., Matranga C., Haley B., Martinez N., Zamore P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science.* 306(5700):1377-1380

Tsien J.Z., Chen D.F., Gerber D., Tom C., Mercer E.H., Anderson D.J., Mayford M., Kandel E.R., Tonegawa S. (1996) Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87: 1317-1326

Turner A.J., Whittle S.R. (1983) Biochemical dissection of the Gamma-Aminobutyrate synapse. *Biochem J* 209: 29-41

Tyndale R.F., Olsen R.W., Tobin A.J. (1994) GABA_A receptors. *Handbook of Receptors and Channels: Ligand and Voltage-Gated Ion Channels* 261-286

Ugarte S.D., Homanics G.E., Hammond D.L. (2001) Effect of embryonic knock-down of GABA_A receptors on the levels of monoamines and their metabolites in the CNS of the mouse. *Brain Res.* 904(2): 290-297

Wafford K.A., Bain C.J., Quirk K., McKernan R.M., Wingrove P.B., Whiting P.J., Kemp J.A. (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABA_A receptor beta subunit. *Neuron*. 12(4): 775-782

Waldvogel H.J., Baer K., Gai W.P., Gilbert R.T., Rees M.I., Mohler H., Faull R.L. (2008) Differential localization of GABA_A receptor subunits within the substantia nigra of the human brain: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. 506(6): 912-929

Walker M.C., Semyanov A. (2008) Regulation of excitability by extrasynaptic GABA(A) receptors. *Results Probl Cell Differ*. 44: 29-48

Wagstaff J., Chaillet J.R., Lalande M. (1991) The GABA_A receptor b3 subunit gene: Characterization of a human cDNA from chromosome 15q11–q13 and mapping to a region of conserved synteny on mouse chromosome 7. *Genomics* 11: 1071-1078

Wei F., Xia X.M., Tang J., Ao H., Ko S., Liauw J., Qiu C.S., Zhuo M. (2003) Calmodulin Regulates Synaptic Plasticity in the Anterior Cingulate Cortex and Behavioral Responses: A Microelectroporation Study in Adult Rodents. *The Journal of Neuroscience* 23(23): 8402-8409

Whiting P.J., Bonnert T.P., McKernan R.M., Farrar S., Le Bourdellès B., Heavens R.P., Smith D.W., Hewson L., Rigby M.R., Sirinathsinghji D.J., Thompson S.A., Wafford K.A. (1999) Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann NY Acad. Sci.* 868: 645-653

Wu X., Li Y., Crise B., Burgess S.M. (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 300(5626): 1749-1751

Xia H., Mao Q., Eliason S.L., Harper S.Q., Martins I.H., Orr H.T., Paulson H.L., Yang L., Kotin R.M., Davidson B.L. (2004) RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med*. 10 (8): 816-820

Xiao X., Li J., Samulski R.J. (1998) Production of high-titer recombinant adenoassociated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72: 2224-2232

Yang Q., Lucas A., Son S., Chang L.J. (2007) Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat. *Retrovirology* 10:1186/1742-4694

Yu S.F., von Rüden T., Kantoff P.W., Garber C., Seiberg M., Rüther U., Anderson W.F., Wagner E.F., Gilboa E. (1986) Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(10): 3194-3198

Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33

Zecharia A.Y., Nelson L.E., Gent T.C., Schumacher M., Jurd R., Rudolph U., Brickley S.G., Maze M., Franks N.P. (2009) The Involvement of Hypothalamic Sleep Pathways in General Anesthesia: Testing the Hypothesis Using the GABA_A Receptor {beta}3N265M Knock-In Mouse. *J Neurosci.* 29(7): 2177-2187

Zychlinski D., Schambach A., Modlich U., Maetzig T., Meyer J., Grassman E., Mishra A., Baum C. (2008) Physiological Promoters Reduce the Genotoxic Risk of Integrating Gene Vectors. *Mol Ther*

7. Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren,

insbesondere:

... meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. H.-P. Thier für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die Möglichkeit, diese Promotion am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung der Universitätsklinik Tübingen durchführen zu können, sowie für die Durchsicht, Korrektur und Begutachtung der Arbeit.

... meinem Betreuer Herrn Dr. Christoph Linnemann für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die vorzügliche Betreuung und Ansprechbarkeit in allen Belangen der Arbeit während der ganzen Zeit, sowie das Korrekturlesen.

... Herrn Professor Dr. F. Schaeffel, der sich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat.

... Frau Ute Gross und Frau Dagmar Heller-Schmerold für ihre Geduld und Hilfe in allem Organisatorischen.

... Herrn Jens Müller für die Hilfe bei den Computerarbeiten sowie auch für das geduldige und gründliche Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

... ganz besonders meinen Eltern Elisabeth und Franz-Josef sowie meinen Brüdern Christian und David, die immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte, an mich glaubten und mich in jeglicher Hinsicht unterstützten!

... meinen Freunden, vor allem Susanne Tappe, für die langen Telefonate, die psychische Unterstützung und das offene Ohr sowie die guten Ratschläge zu jeder Tages- und Nachtzeit ;-)