Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Neurologie

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. Albert C. Ludolph

Verbesserung der axonalen Regeneration durch Einsatz der Technik der RNA-Interferenz

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Lisa Nonnenmacher
Geburtsort Filderstadt

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dietmar Fischer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Marienfeld
Tag der Promotion: 23. Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **iv**

1 Einleitung **1**

1.1 Vorwort . . . 1
1.2 Pathogenese einer Verletzung . . . 2
1.3 Regenerationshemmende Einflüsse im Zentralen Nervensystem (ZNS) im Vergleich zum Peripheren Nervensystem (PNS) . . . 3
1.3.1 Gliale Umgebung . . . 3
1.3.2 Intrinsische Aktivität . . . 11
1.4 Regenerationshemmende Einflüsse im ZNS und PNS . . . 11
1.4.1 Apoptose . . . 11
1.5 Expressionshemmung mittels RNA-Interferenz . . . 13
1.5.1 Mechanismus der RNA-Interferenz . . . 13
1.5.2 Aufgaben physiologischer small-interfering-RNA (siRNA) in einer Zelle . . . 14
1.6 Ziele der Arbeit . . . 15

2 Material und Methoden **17**

2.1 Molekularbiologische Methoden . . . 17
2.2 Zellkultur . . . 26
2.3 Herstellung Adeno-Assoziierter-Viren, Subtyp 2 . . . 30
2.4 Tierversuche . . . 33
2.5 Immunhistochemie . . . 36
2.6 Statistische Auswertung . . . 36
2.7 Verwendete Materialien . . . 37

3 Ergebnisse **43**

3.1 Entwicklung eines siRNA-Haarnadelkonstrukts . . . 43
3.2 Einfluss der Expressionsunterdrückung der Kinase ROCK (RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase) auf das neuritogene Wachstumsverhalten in Zellkultur . . . 46
3.3 Einfluss der Expressionsunterdrückung der Kinase ROCK auf das neuritogene Wachstumsverhalten *in vivo* . . . 52
3.4 Charakterisierung des Proteins LINA (lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity) . . . 56

3.5 Versuchsansätze zur axonalen Wachstumssteigerung 64

4 Diskussion **65**

4.1 Die Technik der RNA-Interferenz 66

4.2 Versuchsansätze zur Neutralisation der inhibitorischen Myelinsignalkaskade 70

4.2.1 Auswirkungen der Expressionshemmung von ROCK 71

4.3 Auswirkungen von LINA auf das neuritogene Wachstum 75

4.3.1 Einfluss von Myelin auf LINA 76

4.3.2 Auswirkungen der Expressionshemmung von LINA 76

4.4 Unterschiedliche Ansatzpunkte zur Verbesserung des neuritogenen Wachstums 77

4.5 Ausblick 77

5 Zusammenfassung **78**

6 Literaturverzeichnis **80**

Anhang **94**

Danksagung **103**

Lebenslauf **104**

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAV	Adeno-assoziiertes-Virus
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Adenovirus
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copied DNA
CH	Schweiz
CMV	Cytomegalievirus
CSPG	chondroitin sulfate proteoglycan
D	Deutschland
DMEM	Dulbecco‘s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	Hinterwurzelneurone (= dorsal root ganglion)
dsRNA	doppelsträngige RNA
E	England
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
GDiα	guanine diphosphate dissociation inhibitor α
GDP	Guanosindiphosphat
GFAP	glial fibrillary acid protein
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
hnRNA	heteronucleäre RNA
H_2O	Wasser

hrGFP	humanized Renilla reniformis GFP
I	Ireland
IL	Interleukin
kB	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
LINA	lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity
LPA	lysophosphatidic acid
LV	Lentiviren
MAG	myelin-associated glycoprotein
MDF	macrophage-derived factor
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mRNA	messanger RNA
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
NL	Niederlande
NO	Stickstoffmonoxid
Nr	Nummer
OD	optische Dichte
OEG	olfacotry ensheating glia cell
OMgp	oligodentrocyte-myelin glycoprotein
PBGD	gene for porphobilinogen deaminase
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PKR	protein kinase C-related protein kinase
pmol	Picomol
PNS	peripheres Nervensystem
RA	retinoic acid
RdRp	RNA dependent RNA Polymerase
RGZ	retinale Ganglienzellen
RISC	RNAi induced silencing complex
rmp	rounds per minute
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz

ROCK	RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase
rRNA	ribosomale RNA
RSV	repiratory syncytial virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
S	Schweden
SCA	spinozerebelläre Ataxie
sec	Sekunde
siRNA	small-interfering-RNA
shRNA	short hairpin RNA
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNF	tumor necrosis factor
TLR7	toll-like receptor 7
tRNA	transfer RNA
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VF	Verdünnungsfaktor

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Das Gehirn stellt eines der aktivsten Organe des menschlichen Körpers dar. Mit einem Gewicht von etwa 1,5 kg macht es ca. 2% der Körpermasse aus, jedoch benötigt es 20% des Körperbedarfs an Sauerstoff und Glucose, um komplexe sensorische, motorische, vegetative und kognitive Leistungen zu vollbringen.
Die Grundlage dieser außerordenlichen Fähigkeit basiert auf einem Netzwerk, in dem 10^{11} Nervenzellen und 10^{14} Gliazellen mit höchster Präzision miteinander interagieren. Diese Genialität kann aber nur durch ein in Struktur und Funktion intakes Nervensystem gewährleistet werden. Unterbrechungen dieser Faserbahnen führen zu permanenten funktionellen Defiziten. Schwere Verletzungen auf Rückenmarks- oder Sehnervenebene, Morbus Parkinson oder Schlaganfälle sind als Beispiele für Ursachen zu nennen, die einen andauernden Funktionsverlust zur Folge haben.
Abgesehen von sozioökonomischen Belastungen sind irreversible Behinderungen mit einer erheblichen Minderung der Lebensqualität sowohl für Betroffene als auch Angehörige verbunden. Sofortige Therapiemaßnahmen führen bis heute ausschließlich zu einer geringfügigen Verbesserung bzw. zu einem Stopp der Verschlechterung der Krankheiten. Erkrankungen des ZNS, deren Ursache auf einem Verlust von Neuronen beruht, bleiben bis heute unheilbar. Die Ursache liegt in der fehlenden spontanen Regenerationsfähigkeit von durchtrennten Axonen im ZNS.
Im Gegensatz zu allen anderen Zellen des Körpers, die einem ständigen Zyklus von Abnutzung und Erneuerung unterworfen sind, können verletzte Neurone im ZNS nicht regenerieren. Nach der Embryonalphase geht ihre Teilungsfähigkeit verloren und verletzte Zellkörper oder durchtrennte Axone können nicht mehr nachwachsen.
Im Gegensatz dazu erlangen Axone peripherer Nerven nach einer Verletzung ihre Funktion wieder zurück. Es kommt zu keinen bleibenden Schäden. Ferner besitzen alle Neurone in der Embryonalphase die Fähigkeit, sich zu teilen und auf hemmende Einflüsse der Umwelt mit einer axonalen Regeneration zu antworten.
Es ist bis heute ungeklärt, warum Neurone des ZNS im Laufe ihrer Entwicklung ihre axonale Regenerationsfähigkeit verlieren bzw. von dieser Eigenschaft keinen Gebrauch mehr machen können. Intensive Forschungen der letzten Jahre deckten grundlegende molekulare und zelluläre Mechanismen, die der Nichtregenerierbarkeit des ZNS zugrunde liegen, auf. Bis heute gibt es jedoch noch keinen Therapieansatz, der eine Heilung zerebraler Verletzungen in Aussicht stellen könnte.

Eingebunden in die Forschungsarbeiten von Prof. Dr. Fischer, Universität Ulm, die intensiv die Thematik der axonalen De- und Regeneration erforschen, befasst sich diese medizinische Doktorarbeit auf molekularer Ebene mit den Auswirkungen einer Verletzung in zentralen Nervenzellen. Neue Ansätze zur Steigerung des Regenerationspotenzials im ZNS werden experimentell untersucht: Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Expression eines Proteins, das an inhibitorischen Signalwegen beteiligt ist, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* supprimiert, im zweiten Teil wird ein in dieser Arbeitsgruppe neu entdecktes, neuritogenwirkendes Protein genauer charakterisiert.

1.2 Pathogenese einer Verletzung

Kommt es zu einer axonalen Verletzung von Neuronen, laufen in den ersten zwei Wochen im peripheren und im zentralen Nervensystem ähnliche Vorgänge ab.
Einer Destruktion neuronalen Gewebes folgen Einblutungen, Ödeme und Demyelinisierungen des Gebiets [58]. Die Proteinsynthese ändert sich, so dass vermehrt proteinspaltende Enzyme aktiviert, zytotoxische Konzentrationen des Neurotransmitters Glutamat freigesetzt und freie Radikale (z.B NO) produziert werden [103]. Es kommt zur Apoptose und Nekrose verletzungsnaher Zellen [103; 129]. Axone distal der Myelinscheidenverletzung degenerieren und werden zusammen mit Zelltrümmern phagozytiert (= Wallersche Degeneration) [103]. Neben Neuronen sind von der Veränderung des zellulären und extrazellulären Milieus auch die Stützzellen betroffen. Sie produzieren immunologische Mediatoren sowie neurotrophe Wachstumsfaktoren und bewirken so eine Strukturänderung der extrazellulären Matrix [58]. Nach dieser Zeit beginnen Axone im PNS in die Verletzungsstelle mit einer Geschwindigkeit von bis zu 4 mm pro Tag nachzuwachsen. Im ZNS hingegen degenerieren die Zellen weiter.
Da der Zellaufbau und die Verletzungsmechanismen beider Neuronenarten sehr ähnlich sind, liegt die Vermutung nahe, dass der Unterschied in der Fähigkeit zur Nichtregeneration bzw. zur Regeneration der neuronalen Umgebung zugeschrieben werden könnte.
Diese These kam erstmals Anfang des letzten Jahrhunderts auf [20] und wurde in den 80er Jahren bekräftigt. Aguayo *et al.* zeigten, dass zentrale Axone in ein Transplantat peripherer Nerven einwachsen können [1].
Offensichtlich sind Axone in geeigneter Umgebung zur Regeneration befähigt. Im ZNS gelingt die Regeneration nicht, da ein Mangel an wachstumsfördernden und ein Überschuß an hemmenden Substanzen vorliegt [22].

1.3 Regenerationshemmende Einflüsse im Zentralen Nervensystem (ZNS) im Vergleich zum Peripheren Nervensystem (PNS)

1.3.1 Gliale Umgebung

Zusammensetzung der glialen Umgebung: Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckte der Berliner Pathologe Rudolph Virchow erstmals, dass neben Neuronen auch weitere Zellen im Gehirn vorkommen. Da er annahm, dass diese Zellen Neurone zusammenhalten, taufte er sie Gliazellen, abgeleitet von dem griechischem Wort *glia = Leim*.
Heutzutage ist bekannt, dass verschiedene Arten von Gliazellen exisiteren und diese zusammen fast 90% der Zellen im Gehirn ausmachen. Im ZNS kommen andere Stützzellenarten vor als im PNS. Allen Stützzellen gemeinsam ist die Aufgabe der elektrischen Isolation der Nervenzelle und der Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts. Zusätzlich haben sie folgenden Aufgaben:

1. Myelinumhüllung: Die Myelinhülle dient der Isolation eines Axons und einer schnellen Erregungsweiterleitung. Sie wird im ZNS von den Oligodentrozyten produziert, wobei ein Oligodentrozyt mehrere Axone umhüllt. Sein Homolog im PNS, die Schwann'sche Zelle, umgibt nur das Axon einer Nervenzelle. Das von Oligodentrozyten und Schwann´schen Zellen gebildete Myelin unterschiedet sich in der Zusammensetzung.
2. Elektrolythaushalt: Astrozyten regulieren den pH-Wert, Flüssigkeits- und Ionenhaushalt. Sie sind nur im ZNS zu finden.
3. Immunabwehr: „Stationäre“ Makrophagen werden im Gehirn als Mikrogliazellen bezeichnet. Ebenso wie Makrophagen, die im PNS vorkommen, dienen sie der Immunabwehr.
4. Ependymzellen: Ependymzellen kleiden Hohlräume aus und sind sowohl im PNS als auch im ZNS zu finden.

Im folgenden werden die einzelnen Zellarten genauer erörtert und mögliche experimentelle Ansätze vorgestellt, die die axonale Regeneration durch Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Stützzellen steigern konnten.

1.3.1.1 Schwann'sche Zellen

Nach der Phase der Degeneration beginnen Schwann'sche Zellen im PNS zu proliferieren und regenerationsfördernd zu wirken. Sie sezernieren Neurotrophine, Zelladhäsionsmoleküle, extrazelluläre Matrixmoleküle, und bilden eine „Leitschiene“ für regenerierende Axone [129]. Der wachstumsfördernde Effekt dieser Substanzen führt zu einer erneuten Innervation des Zielorgans [129].
Experimente zeigten, dass neben Schwann´schen Zellen auch Fibroblasten, fetale Rückenmarkstransplantate, OEG (olfactory ensheating glia cell) und embryonale Stammzellen regenerationsfördernde Moleküle abgeben und auf verletzte Neurone wachstumssteigernd wirken. Diese Gliazellen wurden in Tierversuchen an Verletzungsstellen des Rückenmarks eingebracht. Durch Überbrückung der verletzten Stelle mit diesen Zellen konnte eine regenerationsfördernde Umgebung (durch Verhinderung der Narbengenerierung und durch eine Verhinderung der Auswirkung ZNS spezifischer Myelininhibitoren) geschaffen werden, so dass verletzte Axone des ZNS in die Transplantate einwachsen konnten [16, 25, 17, 84, 86]. Jedoch wuchsen die regenerierenden Fasern nicht über das Transplant hinaus. Bislang konnten nur embryonale Stammzelltransplantate in Tierversuchen eine für therapeutische Zwecke ausreichende Regeneration hervorrufen. Problematisch ist hierbei jedoch die Gewebegewinnung, da Sicherheit und Nebenwirkungen solcher Transplantate noch ungeklärt sind [129].

1.3.1.2 Oligodentrozyten

Nach einer Verletzung bildet sich auch im ZNS zunächst ein Wachstumskegel am proximalen Ende des durchtrennten Axons aus [65]. Dieser besitzt eine Vielzahl an Rezeptoren, die „attraktive“ oder „repulsive“ Leitsignale der Umgebung detektieren [65]. Bei anziehenden Signalen kommt es zu einer Längenzunahme des Wachstumskegels. Bei inhibitorischen Signalen kollabiert dieser, so dass das axonale Wachstum bzw. die axonale Regeneration unmöglich ist [65]. Im Gegensatz zur Funktionsweise der Schwann'schen Zellen besitzen die Oligodentrozyten auf den Wachstumskegel eine inhibitorische Wirkung. Der Wachstumskegel kollabiert [104].

Myelininhibitoren sind in der glialen-axonalen Oberfläche der Oligodentrozyten lokalisiert und berühren in intakter Umgebung das Axon, wo sie durch ihre wachstumsstörenden Eigenschaften ein Aussprossen des Axons in „falsche“ Richtungen verhindern [73, 57]. Bei einer Verletzung allerdings werden diese Myelinscheiden zerstört, so dass sehr viele Myelininhibitoren frei vorliegen und in Kontakt mit dem Wachstumskegel treten können. Bis heute sind die drei „Haupt“-Myelininhibitoren MAG (myelin-associated glycoprotein), OMgp (oligodentrocyte-myelin glycoprotein) und Nogo identifiziert [87, 93, 73, 24, 49]. Daneben gibt es weitere Myelininhibitoren wie z.B. die Proteine Ephrin B3 und Semaphorin 4D, die jedoch über „eigene“ neuronale Rezeptoren (EphrinB3 über EphA4 und SemaD4 über PlexinB1 [140] und nicht über die RhoA/ROCK-Signalkaskade (siehe unten) einen Kollaps des Wachstumskegel induzieren [140, 91, 52].

Die Myelininhibitoren MAG, OMgp und Nogo binden an einen gemeinsamen Rezeptorkomplex, der aus dem Rezeptor Nogo-66-Rezeptor und den Korezeptoren LINGO und $P75^{NTR}$ oder LINGO und TROY besteht [146, 146, 140].
$P75^{NTR}$ und TROY haben eine intrazelluläre Domäne, an welche in der Abwesenheit von inhibitorischen Signalen RhoA an GDiα (guanine diphosphate dissociation inhibitor α) gebunden vorliegt [103, 142]. Da das Protein RhoA zur „Familie der kleinen GTPasen“ gehört und somit zwischen einem aktivem Status, in dem es GTP gebunden hat, und einem inaktiven Status, in dem GDP gebunden vorliegt, wechselt, verhindert GDiα die Aktivierung von RhoA dadurch, dass es GDP fest an RhoA bindet. Interagiert nun ein Myelininhibitor mit den Rezeptoren, kommt es zu einer Konformationsänderung der intrazellulären Domänen von TROY und $P75^{NTR}$ und GDiα difundiert von RhoA ab und Guanine triphosphate exchange factor fügt GTP an RhoA an [103]. RhoA liegt in seiner aktiven Form vor [137]. RhoA assoziiert mit der Plasmamembran und bindet an die Serin-Threonin Kinase ROCK (Rho-A-associated coiled-coil serine-threonine kinase) [103]. Da auch das Protein ROCK der „Familie der kleinen GTPasen“ angehört, führt die Interaktion von RhoA an ROCK durch den Austausch von GDP zu GTP zu dessen Aktivierung [4, 3]. Aktiviertes ROCK verhindert durch die im folgenden aufgeführten Mechanismen die axonale Regeneration (vgl. Abb. 1):

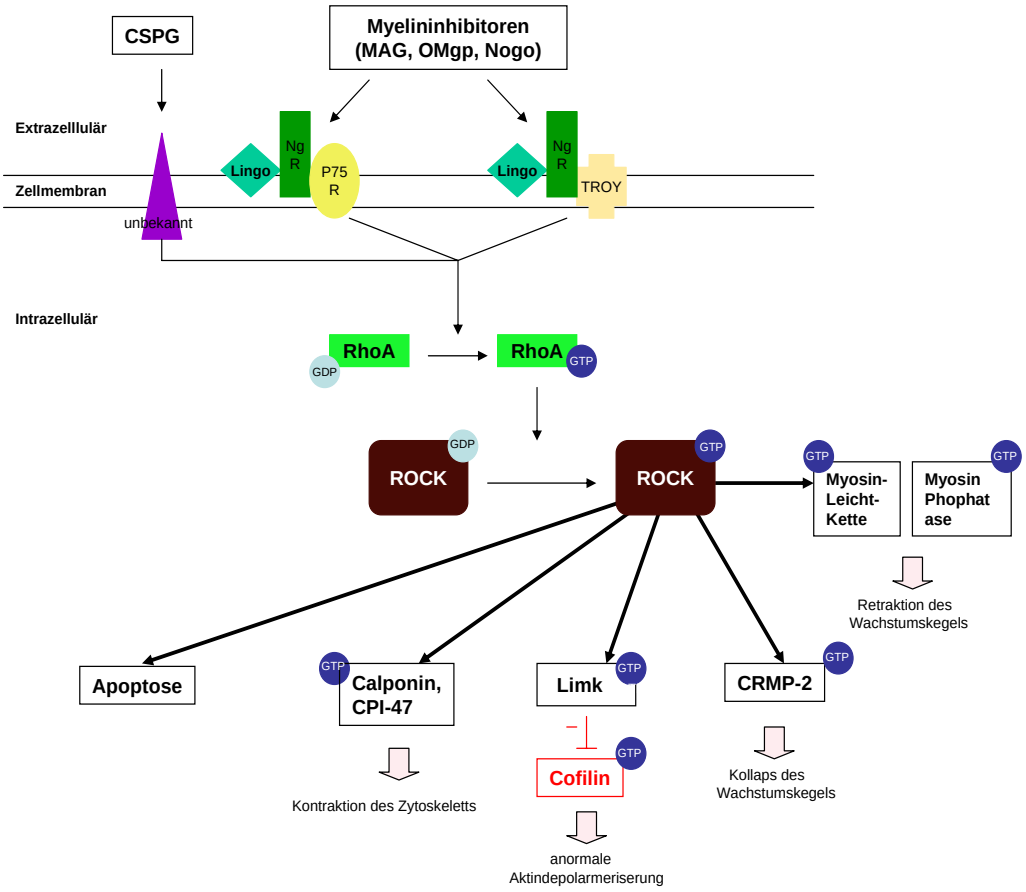

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweisen der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK): Die schwarzen Pfeile bedeuten eine Aktivierung, die roten eine Inhibition. Ist ein Protein mit einem dunkelblauen, Guanosintriphosphat (GTP) gebunden Kreis markiert, liegt es in aktiviertem Zustand vor; ist es mit einem hellblauen Guanosindiphosphat (GDP) gebunden Kreis markiert, liegt es inaktiviert vor.
Die Myelininhibitoren Nogo, OMgp und MAG binden extrazellulär an die Rezeptoren NgR, LINGO und Troy oder p75. Troy und p75 besitzen eine intrazelluläre Domäne. Dies führt durch Konformationsänderung zum Austausch von GDP gegen GTP an RhoA und somit zur Aktivierung von RhoA. Ebenso aktiviert über einen bislang unbekannten Mechanismus das bei einer Narbenbildung vermehrt vorliegende Proteoglykan CSPG (chondroitin sulfate proteoglycan) das Enzym RhoA. Das Enzym RhoA aktiviert über den Austausch GDP gegen GTP das Protein ROCK.
Die Aktivierung des Proteins ROCK führt von links nach rechts zu folgenden Effekten:

1. Induktion der Apoptose durch Veränderung des Zytoskeletts mit Ausbildung apoptotischer Bläschen. Zudem aktiviert ROCK die Synthese proapoptotischer Gene.
2. Kontraktion des Zytoskeletts durch Phosphorylierung der Proteine Calponin und CPI-47, was zu einer Induktion der Apoptose führt.
3. Inhibition freier Aktinmonomere durch Phosphorylierung des Proteins LIMK und infolge dessen Hemmung des Proteins Cofilin. Das Protein Cofilin ist für eine normale Aktindepolarisierung notwendig.
4. Kollaps des Wachstumskegels durch Phosphorylierung des Proteins CRMP-2.
5. Retraktion des Wachstumskegels durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette und Phosphorylierung der Myosin Phosphatase.

1. ROCK führt über Phosphorylierung und Aktivierung der Myosin-Leichtkette zur Retraktion des Aktinzytoskeletts und somit zum Kollaps des Wachstumskegels [5, 3, 103]. Dieser Vorgang wird dadurch verstärkt, dass aktiviertes ROCK zusätzlich zu einer Phosphorylierung und dadurch zu einer Inaktivierung der Myosin-Phophatase führt. Die Myosin-Phosphatase wiederum hemmt nur in dephosphoryliertem Zustand die Aktivierung der Myosin-Leichtketten [71, 132].
2. ROCK führt zu einer Aktivierung der LIM-Kinase. Diese hemmt das für die Depolarisation von Aktin zuständige Protein Cofilin, wodurch die für die Elongation des Wachstumskegels notwendige Freisetzung von Aktinmonomeren inhibiert wird [80, 100, 63]. Vergleichbar den Folgen einer unterbrochenen Handelsstraße, stehen nicht mehr genügend Aktinmonomere zur Verfügung und es kommt zum Kollaps des Wachstumskegels.
3. ROCK induziert auf bislang noch wenig bekannte Weise das Protein c-fos und verändert damit die Genexpression einer Zelle [35]. Es kommt zur Apoptose, die auch durch die von ROCK induzierte Bildung apoptotischer Bläschen verstärkt wird [27]. Zusätzlich verstärkt ROCK die Kontraktion des Zytoskeletts durch Phosphorylierung von Calponin und CPI-47 und induziert dadurch die Apoptose [6, 74, 4].
4. Desweiteren wird die Destruktion des Wachstumskegels durch die von ROCK verursachte Aktivierung des Proteins CRMP-2 auf einen bislang noch nicht genau bekannten Mechanismus untermauert [133, 7, 4].

Extrazelluläre Ansätze (Inhibition der Myelininhibitoren):
Experimente zeigten, dass durch Hemmung der Wirkung der Myelininhibitoren eine verbesserte Regeneration zustande kommen kann:
Der von einem Tumor produzierte Antikörper IN-1 gegen das Myelinmembranprotein Nogo-A steigerte das Auswachsen von zentralen Axonen nach einer Rückenmarksverletzung in jungen Ratten auf 7-11 mm [115]. In Kontrollratten war nur ein Wachstum bis maximal 1 mm nachweisbar [115]. Diese Applikationsform ist jedoch auf Grund der erheblichen tumorbedingten Nebenwirkungen bzw. Komplikationen nicht klinisch anwendbar.
Lokal applizierter IN-1 Antikörper förderte das Wachstum im gleichen Maße [22, 18]. Dementsprechende Ergebnisse wurden auch durch Einsatz von Nogo knock-out Mäusen oder durch die Suppression anderer Myelininhibitoren erzielt [125, 69, 9, 79, 119, 143, 70]. Jedoch bleiben durch Suppression nur eines Myelininhibitors wie z.B. Nogo die weiteren inhibitorischen Faktoren wie MAG und OMgp aktiv und können kompensatorisch hochreguliert werden [140, 69, 144]. Aus diesem Grund ist die durch Suppression eines Myelininhibitors hervorgerufene axonale Wachstumssteigerung für therapeutische Zwecke zu gering.

Intrazelluläre Ansätze (Inhibition der Signalkaskade):
Viele Studien weisen darauf hin, dass das Ausschalten der RhoA/ROCK-Signalkaskade die Regenerationskraft erhöht:
Ein Enzym des Bakteriums Clostridium botulinum (ADP-Ribosyl-Transferase (C3)) ist ein irreversibler RhoA-Inaktivator [34, 32]. Es inhibiert die Wirkungsdomäne des Proteins RhoA durch die ADP-Ribolsylierung [32]. Der Inhibitor Y-27632, ein Pyridinderivat, blockiert die Funktion des stromabwärtsliegenden Proteins ROCK, indem es mit der ATP-Bindungsseite der katalytischen Domäne des Proteins ROCK interagiert [4]. Durch die Applikation eines membrangängigen C3 Fusionsproteins sowie durch Applikation von Y-27632 an der Läsionsstelle konnte das axonale Wachstum gesteigert werden [32, 45]. Ihre Applikation *in vivo* an der Läsionsstelle ist jedoch problematisch, da ihre Konzentrationen schnell abnehmen und somit die positiven Effekte nur kurzzeitig anhalten. C3 wirkt außerdem nach einiger Zeit toxisch.
Ein weiterer Nachteil in der Anwendung von Y-27632 liegt darin, dass es sowohl das Protein ROCK als auch das Protein PKR (protein kinase C-related protein kinase) inhibiert. PKR beeinflußt ebenso wie das Protein ROCK die Regulation des Zytoskeletts [44, 30]. Wachstumssteigernde Effekte durch Y-27632 sind somit nicht eindeutig einer Inhibition von ROCK zuzuordnen.

Die Hemmung des RhoA/ROCK-Signalwegs stellt somit eine erfolgsversprechende Strategie dar. Im Gegensatz zur Ausschaltung einer einzelnen peripheren Komponente (wie z.B. die Inhibition eines Myelininhibitors) führt die Expressionshemmung von ROCK an einer zentralen Stelle zur Suppression der durch die Myelininhibitoren aktivierten Signalkaskade. Darüberhinaus funktionieren ebensfalls Aspekte der Narbenbildung und Apoptose über dieses Protein (siehe unten) und werden gleichermaßen durch eine Suppression des Proteins positiv beeinflusst [140].

1.3.1.3 Narbenbildung

Nach einer Verletzung oder Schädigung wird abgestorbenes Gewebe durch minderwertiges Ersatzgewebe erneuert. Es kommt zur Narbenbildung.
An der Narbenbildung im ZNS sind zusätzlich zu inflammatorischen und meningealen Zellen vor allem Astrozyten beteiligt. Neben den positiven Effekten nicht-reaktiver Astrozyten, die eine Verletzungsstelle isolieren und so die Gebiete der Entzündung und der zellulären Degeneration minimieren, besitzten hypertrophierte Astrozyten eine regenerationshemmende Wirkung [118]. Die Mehrzahl der Astrozyten hypertrophieren nach einer Verletzung und bilden in ihrem aktivierten Zustand vermehrt Intermediärfilamente (GFAP und Vimentin) [118]. Diese füllen die von den phagozytierten Zellen entstandenen Hohlräume aus und bilden ein unüberwindbares Hindernis für verletzte

Nervenzellen, das sowohl auf eine physikalische als auch auf eine molekulare Barriere zurückzuführen ist. Weiterhin sezernieren Astrozyten vier inhibitorische Proteoglykane [141, 85]. CSPGs (chondroitin sulfate proteoglykans) besitzen dabei deutliche wachstumshemmende Eigenschaften. Nach einer Verletzung wird die Expression von CSPGs in Astrozyten sofort hochreguliert, die höchste Konzentration findet sich im Zentrum der Verletzungsstelle [118]. CSPGs werden zusätzlich von Oligodentrozyten-Vorläuferzellen gebildet, die auch an der Narbenbildung beteiligt sind [39]. Bis heute weiß man nicht genau, warum CSPGs wachstumshemmend wirken. Es wird jedoch vermutet, dass CSPGs eine molekulare Barriere aufbauen, Interaktionen mit wachstumsfördenden Substraten eingehen, diese dadurch eliminieren und über Aktivierung intrazellulärer Signalwege inhibitorische Reaktionen hervorrufen [140]. Unter anderem aktiviert CSPGs über einen noch unbekannten Rezeptor die RhoA/ROCK-Signalkaskade [140, 90]. Dies führte wie oben beschrieben zur Retraktion und Destabilisierung des Wachstumskegels. Inwieweit reaktive Astrozyten das Substrat TNF-α (tumor necrosis factor α) sezernieren und dieses die RhoA-Signalkaskade aktiviert, ist derzeit noch umstritten [98].
Auch Matrixproteine (Tenascin-C und Tenascin-R) sind nach einer Verletzung hochreguliert und an der Narbenbildung beteiligt. Die daraus resultierenden Effekte sind noch nicht vollständig geklärt, da sie sowohl wachstumsfördernde als auch -hemmende Substanzen binden können. Allerdings geht man davon aus, dass sie nach einer Verletzung mit CSPGs interagieren und dadurch die Inhibition verstärken.

Experimentelle Ansätze konnten zeigen, dass die Narbenbildung durch einen „knockdown“ astrozytärer Intermediärfilamente (GFAP und Vimentin) verringert wurde und zu einem Einwachsen von Axonen in die Verletzungsstelle führte [88].
Die Elimination des inhibitorischen glialen Substrats CSPGs durch enzymatische Verdauung durch das Enzym Chondroitinase ABC verbesserte die Regenerationsfähigkeit [118, 15]. So erzielte die intrathekale Applikation von Chondroitinase ABC ein Auswachsen verletzter Neurone in die Läsionsstelle, ein Auswachsen über die Verletztungsstelle hinaus wurde allerdings nicht ermöglicht [118]. Da Chrondroitinase ABC viele, aber nicht alle Zuckerreste verdaut, können die inhibitorischen Eigenschaften von CPSGs nicht vollständig eliminiert werden [118]. Trotz der oben aufgeführten Ansätze, die versuchen die regenerationshemmendenden Aspekte der Narbenbildung auszuschalten, konnte diese nicht völlig aufgehoben werden [130].
Im Gegensatz zum ZNS wird im PNS die Narbe von Fibroblasten gebildet, die dort hauptsächlich wachstumsfördernde und in geringerem Maße inhibitorische Molküle sezernieren.

Linsenverletzung und Zymosaninjektion in den Glaskörper: Eine Linsenverletzung oder die Injektion von Zymosan (Zellwandbestandteil der Hefe) führen zu einem verbesserten Überleben und zu einem verbesserten Auswachsen verletzter RGZ [41, 139]. Dieses Phänomen wurde zunächst ausschließlich aktivierten Markophagen zugeschrieben, die in den verletzten Glaskörper einwandern und hauptsächlich über das Protein Oncomodulin regnerationsfördernd wirken sollten [139]. Neueste Arbeiten in unserem Labor konnten jedoch widerlegen, dass nicht aktivierte Makrophagen und Oncomodulin, sondern aktivierte Müller-Zellen und Astrozyten über eine Freisetzung von CNTF (ciliary neurotrophic factor) zu diesen positiven Effekten führen [54, 92]. Eine Linsenverletzung oder Zymosan induzieren in reaktiven Astrozyten eine Hochregulation und Freisetzung des Faktors CNTF [92]. CNTF und die „down-stream" Signalkasakade (Janus-kinase Transduktoren und Aktivatoren der Transcription 3 (JAK/STAT3) Signalkaskade) sind in regenerierenden RGZ in hohem Maße aktiv und deren Aktivierung ist für die Regeneration essentiell [92].
Die Durchführung einer Linsenverletzung simultan zur Quetschung des Sehnervens 2 Wochen vor Auswertung des Experiments erwies sich damit als vorteilhaft, um die Regenerationskapazität verletzter Sehnerven zu steigern [42, 78].

1.3.1.4 Rolle der Mikrogliazellen

Mikrogliazellen sind die Immuneffektorzellen des Gehirns [33]. Im Gegensatz zu allen anderen Zellen des ZNS stammen sie von blutbildenden Vorläuferzellen ab [111, 46]. Mikrogliazellen sezernieren einerseits neurotoxische Substanzen wie TNF-α, Proteasen und Stickstoffmonoxid (NO), aber auch überlebenswichtige Substanzen wie NGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) und Laminin [94, 105, 47]. Wann die sezernierten Stoffe positiv und wann negativ auf die Regeneration wirken, hängt vermutlich von der Menge der Rezeptoren und der Konzentration der Substanzen ab. Durch Phagozytose zerstörter Zellen und Myelinscheiden haben sie zumindest anfänglich nach einer Verletzung positive Effekte [104].
Raibon et al. nehmen an, dass „ruhende" Mirkogliazellen eine wachstumsfördernde und aktivierte Zellen eine hemmende Wirkung haben. Durch die Substanz Tuftsin, ein mikroglialer Inhibitor, verringerten sie die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen. Dadurch konnte eine erhöhte Regeneration in RGZ hervorrufen werden [106].
Einen erfolgsversprechenden Ansatz zur „positiven" Modifikation von Mikrogliazellen gab es bislang nicht, da das Verhältnis und Verhalten von aktivierten zu „ruhenden" Mikrogliazellen noch nicht aufgedeckt wurde.

1.3.2 Intrinsische Aktivität

Nach der Embryonalphase verlieren Neurone ihre Teilungsfähigkeit, so dass sich nach der Geburt lediglich die Anzahl der synaptischen Verknüpfungen sowie die Anzahl der Gliazellen im Gehirn verändert. Demnach können embroynale Neurone sich teilen. Darüber hinaus besitzen embryonale Nervenzellen die Fähigkeit, verletzte Neurone durch eine erneute Elongation zu regenerieren. Diese Fähigkeit ist auf ein unterschiedliches Expressionsmuster mit dem gezielten Ein- und Umschalten von Genen zurückzuführen. Auch adulte Neurone können unter regenerationsfördernden Bedingungen zumindest teilweise regenerieren. Wie oben erläutert können z.B. durchtrennte Axone in Transplantate peripherer Stützzellen einwachsen. Bei den meisten regenerierenden Neuronen ist die Expression des Proteins GAP-43 erhöht [42]. Andere Studien zeigen, dass regenerierende sowie embryonale Neurone eine höhere Anzahl an Integrinrezeptoren besitzen und dadurch vermehrt wachstumsfördernde Moleküle binden können [28, 118]. Daraus lässt sich ableiten, dass die Fähigkeit das Expressionspattern zu ändern nicht irreversibel verloren gegangen ist, sondern dass die Nervenzellen dieses Potential nicht ausschöpfen. Warum adulte Neurone von dieser Fähigkeit keinen Gebrauch machen können, bleibt bislang ungeklärt. Neurone des PNS besitzten eine höhere intrinische Aktivität als ihre Homologe im ZNS. Sie steigern ihre Regenerationskapazität unter anderem durch eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration [28, 10]. Auch in Zebrafischen führte die erhöhte Konzentration an cAMP -(die Substrate Rolipram und Forskolin vermindern die Hydrolyse von cAMP)- zu einer verbesserten Regeneration [129, 13]. Es bedarf jedoch zukünftiger Forschungen, um diesen Mechanismus der Regnerationskapazität vollständig zu verstehen und anwenden zu können.

1.4 Regenerationshemmende Einflüsse im ZNS und PNS

1.4.1 Apoptose

Von der Verletzungsstelle gehen Informationen aus, die das Absterben des Zellkörpers verursachen. Die Schädigung eines Axons führt somit zum Tod dieser Nervenzelle. Es wird allgemein angenommen, dass der axotomiebedingte Zelltod von Neuronen, die sich nicht im Verletzungsareal befinden, nach einem apoptotischen Mechanismus verläuft. Eine Reinnervation des verletzten Gebietes ist nur möglich, wenn eine ausreichend große Population an Nervenzellen überlebt. Somit stellt die Verhinderung der Apoptose eine Grundvorraussetzung für eine mögliche Regeneration dar. Im folgenden werden nur diejenigen Proteine genauer erläutert, die an der Apoptose beteiligt sind sowie mit

ROCK in Zusammenhang stehen.

RhoA/ROCK: Auch wenn der genaue Wirkungsmechanismus bislang unbekannt ist, wird allgemein angenommen, dass RhoA/ROCK eine wichtige Rolle bei der Apoptose zukommt [8, 27, 62]. Es besteht die Hypothese, dass ROCK bislang unbekannte Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiviert, wodurch die Synthese (pro)apoptotischer Gene wie c-jun, NF$\kappa\beta$, $p75_{NTR}$ angetrieben wird (vgl. Abb. 2).
Wie oben beschrieben führt die Induktion der RhoA/ROCK-Signalkaskade zur Veränderung des Zytoskeletts und ist damit durch die Ausbildung apoptotischer Bläschen ein wichtiges Kennzeichen der Apoptose [27]. Dubreuil *et al.* zeigte, dass durch Inaktivierung von RhoA mittels des Bakterientoxins C3 bis zu 50% der Neurone vor Apotose geschützt werden konnten [35].

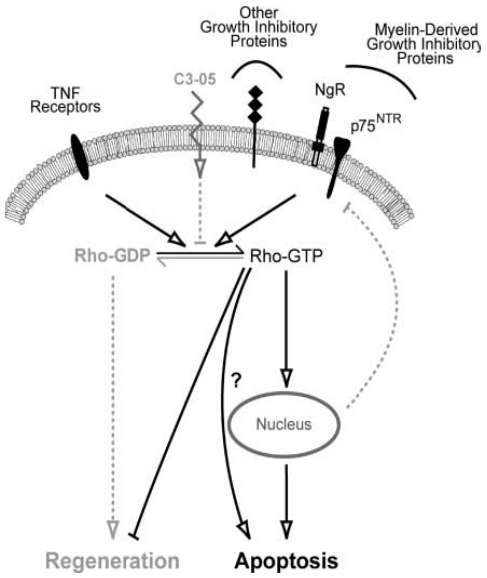

Abbildung 2: Schematische Darstellung der durch die Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK) vermittelten apoptotischen Kaskade: Aktiviert durch tumor necrosis factor (TNF)-Rezeptoren, durch inhibitorische Proteine oder durch Myelininhibitoren verhindern die Proteine Rho und ROCK unter anderem die Regeneration dadurch, dass sie über eine bislang unbekannte Kaskasde die Apoptose induzieren [35].

bcl-2: Das Oncogen bcl-2 besitzt im Gehirn eine antiapoptotische Wirkung [51, 75, 23]. Esteve et al. beschrieben, dass in Nervenzellen eine Überexpression von Bcl-2 zu einer Inhibition einer durch RhoA vermittelten Apotose führte [37].

1.5 Expressionshemmung mittels RNA-Interferenz

Wie erörtert, führt eine Verletzung im ZNS zur Aktivierung von „Todesproteinen“, die für das Regenerationsdefizit des ZNS mit ausschlaggebend sind. Eine Wiederaufnahme der neuronalen Funktion sollte möglich sein, wenn diese inhibitorischen Proteine ausgeschaltet werden könnten. Seit 2001 stellt die im folgenden aufgeführte Technik der RNA-Interferenz (RNAi) eine effiziente Methode dar, bestimmte Proteine in einer Zelle zu supprimieren [89]. Für die Entdeckung der Technik der RNAi erhielten Craig Mello und Andrew Fire 2006 den Nobelpreis der Medizin.
Fire *et al.* entdeckten 1998, dass (lange) dsRNA in Pflanzen und Nematoden zur Suppression des zur dsRNA homologen Genes führte [40]. Seit 2001 ist es möglich, auch in Säugetieren ein Protein herabzuregulieren. Dazu müssen 21-23 bp lange dsRNA Stücke in die Zelle gegeben werden [36]. Die Expressionshemmung eines Gens durch Interaktion kurzer RNA-Fragmente mit der homologen mRNA eines Genes wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet [36]. Mittels dieser Technik kann das Expressionsmuster einer Zelle hochspezifisch modifiziert werden, da Proteine sowohl temporär als auch permanent supprimiert werden können. Viele Arbeitsgruppen nutzten die Technik der RNA-Interferenz bislang *in vitro* [66, 89, 11]. Bis heute gibt es jedoch nur eine beschränkte Anzahl an Arbeiten, die durch Einsatz der RNA-Interferenz positive Effekte *in vivo* erzielen konnten [21, 83, 50].

1.5.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Posttranskriptionale Wirkungsweise: Im Zytosol einer Zelle generiert das Enzym Dicer aus „längeren“ dsRNA-Stücke kurze 21-23 bp dsRNA-Stücken (=small interfering RNA, siRNA). SiRNA binden an das Enzym RISC (=RNA induced silencing complex). Dieser Komplex trennt den Doppelstrang auf und einer der beiden Einzelstränge tritt aus dem Komplex aus. Die Wahl, welcher der beiden Stränge an dem Enzym haften bleibt, passiert rein zufällig. RISC führt die an ihn gebundene einzelsträngige siRNA zur komplementären mRNA und die Domäne Slicer des Enzyms (eine RNase H-like Domäne namens Piwi) induziert die Spaltung der mRNA. Die Fragmente werden als Abfallprodukt angesehen und zerstört. Das Protein kann nicht mehr gebildet werden. Indem das Enzym RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) aus dem „übriggebliebenen“, einzelsträngigen siRNA-Strang erneut doppelsträngige RNA produziert und diese wiederum als Substrat für das Enzym Dicer dient, besitzen siRNA-Fragmente eine katalytische Wirkung.

Chromatinebene: SiRNA kann durch Methylierung von Promotor-DNA zur Inhibition der Transkription und somit zur Gensuppression führen [82]. In Experimenten von Kawasaki *et al.* führte die Gabe von siRNA gegen eine Region des Promotor E-cadherin zur Methylierung der DNA und somit zur Stilllegung des Promotors [66].

1.5.2 Aufgaben physiologischer small-interfering-RNA (siRNA) in einer Zelle

Kurze dsRNA-Stücke kommen natürlicherweise in Zellen vor und übernehmen dort mehrere Aufgaben [11]:

1. Sie schützen eine Zelle vor viralen Infektionen. Doppelsträngige virale RNA wird degradiert und unschädlich gemacht.
2. Sie stabilisieren das Genom einer Zelle durch Stilllegung von Transposonen [68, 128]. Ein Transposon ist ein mobiles DNA-Element, das seine Position innerhalb des Genoms verändern und dadurch die Menge der DNA und die Genexpression beeinflussen kann. So nützlich Transposonen für eine Zelle sind, kann ihre exzessive Aktivität das Genom zerstören. Durch das natürliche Vorkommen von siRNA haben Organismen eine Methode gefunden, die Menge an Transposonen auf einem nützlichen Niveau zu halten.
3. MicroRNA (= miRNA) sind kurze einzelsträngige RNA-Moleküle, die an der Steuerung der Genexpression beteiligt sind [142]. Es wird vermutet, dass mindestens 30% der Gene in Säugetierzellen durch miRNA reguliert werden [11]. Sie verhindern durch Translationsstopp die Produktion eines Proteins. Ihre Hauptaufgabe liegt in der Regulation der Entwicklung, der Immunabwehr und in der Verhinderung der Onkogenese. Im Gegensatz zur siRNA, die hundertprozentig zu ihrer Ziel-mRNA komplementär sein muss, genügt bei der miRNA zum Translationsstopp eine teilweise Komplementarität. Auch ist die Biogenese der miRNA anders als die der siRNA. Im Zellkern entstehen aus pri-miRNA eine 70 Nukleotid lange pre-miRNA [29]. Ebenso wie siRNA werden sie von dem Enzym Dicer zu 21-23 bp langen miRNA weiter prozessiert. Auch binden sie an das Enzym RISC, welches sowohl siRNA als auch miRNA zu ihrer Ziel mRNA bringt, und diese durch Spaltung degradieren lässt [50].

1.6 Ziele der Arbeit

Bislang ist es trotz einiger viel versprechender Ansätze noch nicht gelungen, eine therapeutisch relevante axonale Regeneration verletzter Neurone im ZNS zu erzielen:

- Die Transplantion peripherer Nerven oder Stammzellen generiert eine wachstumsfördende Umgebung. Doch selbst unter dem Einsatz dieser „Brücken“ erhöht sich die Anzahl der regenerierenden Axone nicht in einem therapeutisch relevanten Maß. Weiter sind Probleme wie Gewebegewinnung und Applikation unzureichend aufgeklärt. Auch durch die Neutralisation von Myelininhibitoren kann eine deutliche Elongation durchtrennter Neurone nach einer Verletzung erzielt werden. Inhibitorische Substanzen - wie Y-27632 und C3 - sind jedoch mit Nebenwirkungen verbunden und nur bedingt einsetzbar.
- Die Narbenbildung, die als eine unüberwindbare Barriere für eventuell nachwachsende Axone angesehen werden muss, kann bislang nicht komplett verhindert werden, so dass auch dieser Ansatz nur bedingt therapeutisch anwendbar ist.
- Versuchsansätze zur Steigerung der intrinsischen Aktivität sowie zur Verhinderung der Apoptose sind zwar vielversprechend, jedoch bislang unzureichend erforscht.

Die molekularen Mechanismen der Degeneration müssen also weiter entschlüsselt und die bestehenden Ansätze optimiert werden. Eine Kombination verschiedener Ansatzpunkte kann zu einer additiven Regenerationssteigerung führen [118]. Vor diesem Hintergrund soll mit dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, in welchem Maße die Expressionshemmung des „Schlüsselproteins“ ROCK, das sowohl an der inhibitorischen Wirkung der Myelininhibitoren maßgeblich beteiligt ist, als auch die Narbenbildung und die Apoptose fördert, eine erneute Elongation durchtrennter Neurone im ZNS ermöglicht. Die Technik der RNAi eröffnet neue Möglichkeiten, gezielt in die regnerationsinhibitorischen Vorgänge nach einer Verletzung im ZNS einzugreifen und diese in Zukunft im Sinne eines negativen Gentherapeutikums anzuwenden. Mit dieser Arbeit soll auch der Frage der Einsatzmöglichkeiten und „Nebenwirkungen“ dieser Methode nachgegangen werden.

Experimentelle Zielsetzung:

1. Entwicklung einer Methode zur Freisetzung von siRNA innerhalb einer Zelle:
   Es sollte ein siRNA produzierender Vektor hergestellt werden, um durch Expressionshemmung funktionell Proteine untersuchen zu können. Weiterhin sollte dieser Vektor mittels AAV-2 in Lebewesen eingebracht werden können.
2. Es sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Expressionshemmung eines regenerationsinhibitorischen Proteins die axonale Regeneration durchtrennter Neurone verbessern konnte: Die Expression von ROCK sollte mittels siRNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* supprimiert werden. Eine verbesserte Regeneration sollte anhand der Zunahme des Längenwachstums der Axone und anhand einer Morphologieänderung der Nervenzellen quantifiziert werden. *In vivo* sollten zusätzlich die Auswirkungen mittels Immunhistochemie untersucht werden.
3. Weiterhin sollten die Auswirkungen von siRNA bei einer langandauernden Versuchslaufzeit *in vivo* ermittelt werden: Bei dieser Arbeit sollten die Versuche mit siRNA einer 7-9 wöchigen Laufzeit ausgesetzt werden, was eine längeren Laufzeit wie die bislang in der Literatur beschrieben Ansätze darstellt.
4. Ein weiteres Ziel war es, das neu entdeckte Protein LINA genauer zu charakterisieren: Es wurde der Frage nachgegangen, ob LINA immer in einer Zelle vorkommt und welche Auswirkungen die Überexpression und die Expressionshemmung dieses Proteins auf eine Zelle hat. Weiter sollte der Einfluss von Myelin auf LINA untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.0.1 PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen. In mehrfach wiederholten Zyklen aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung (Annealing) und Elongation wird das DNA-Fragment logarithmisch amplifiziert. Kurze Oligonukleotide (Primer), von denen einer zum 5', der andere zum 3'Ende eines gewählten DNA-Abschnitts komplementär ist, rahmen das PCR-Fragment ein. Als Template-DNA können z.B. Plasmide, genomische DNA oder cDNA eingesetzt werden.

Tabelle 1: Pipettieransatz für eine Polymerasekettenreaktion (PCR)

1 μg	Desoxyribonukleinsäure (DNA)
10 μM	je Primer
10 mM	Nukleotidtriphosphat-Mix
5 μl	10xPCR-Buffer
25 mM	$MgCl_2$
0,25 μl	TaqDNA Polymerase (5U/μl)
Gesamtvolumen 50 μl	Wasser

Der Negativkontrolle wurde anstatt DNA nur Wasser zugegeben.
Die DNA wurde nach folgendem Protokoll in einer PCR-Maschine amplifiziert, die Zyklen 2.-4. (je nach gewünschter DNA-Menge) ca. 30 mal wiederholt:

1.	Denaturierung	94°C	2 min
2.	Denaturierung	94°C	30 sec
3.	Annealing	55°C	30 sec
4.	Elongation	72°C	1 min/1000 Basenpaare
5.	Elongation	72°C	10 min
6.	Aufbewahrung	4°C	

Um die Bildung einer Haarnadelkonstruktion bei Primern, die ein RNAi-Konstrukt enthielten, zu vermeiden, wurde die DNA zu Beginn vollständig denaturiert. Die anfängliche Denaturierungszeit verlängerte sich so auf 10 min. Zusätzlich wurden 2 μl DMSO/50 μl Ansatz hinzugegeben.

2.1.0.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich in Agarosegelen entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch auftrennen. Negativ geladene DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode. In einem Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel wird DNA unter UV-Licht sichtbar, da Ethidiumbromid mit der DNA-Doppelhelix interkaliert.

Durchführung Agarose-Gelelektorphorese: Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente (in dieser Arbeit 500-7000 kB) wurde die Konzentration des Agarosegels bestimmt (in dieser Arbeit 1%). Durch Erhitzen wurde die Agarose in 1xTris-Acetat-EDTA(TAE)-Puffer gelöst und Ethidiumbromid (0,067 ml Ethidiumbromid/ml Gel) wurde hinzugefügt. Das Gemisch wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach Erstarren in eine mit Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. Die DNA Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (Verhältnis 1:10) versetzt, in die Taschen des Gels geladen und eine Tasche mit Größenmarker gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 20-45 min. Unter UV-Licht wurde an Hand des Größenmarkers (1Kb Plus DNA Ladder) die Länge der Fragmente bestimmt. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und entsprechend dem Protokoll der Firma Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit) extrahiert. Mittels Spektralphotometer wurde die Konzentration der eluierten DNA-Menge bestimmt. Im folgenden wird die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen aufgeführt:

Tabelle 2: Zusammensetzung des 1x Tris Acetat Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Puffers, pH 8

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA(pH 8,0)	100 ml
mit vollentsalztem Wasser auf 1l auffüllen	

Tabelle 3: Zusammensetzung des 10x Probenpuffers

Bromphenolblau	40 μg
Glycerol	5 ml
destilliertes Wasser	5 ml
0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (pH 8,0)	20 μl

EDTA-Lösung, 0,5 M, pH 8,0, 1l

186,12 g Dinatriumsalz, mit VE-Wasser auf 1l auffüllen

Ethidiumbromid-Lösung (1000x)
10 μg Ethidiumbromidtablette in 1 ml destilliertem Wasser lösen; dunkel lagern

2.1.0.3 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die natürlicherweise in Bakterien vorkommen und DNA sequenzspezifisch schneiden. Dadurch entsteht lineare DNA mit glatten (blunt end) oder überstehenden Enden (sticky end).
Durchführung Restriktionsverdau: Ein Restriktionsansatz enthielt das zu spaltende Substrat, 10xRestriktionspuffer (passend zum Enzym, 1/10 des Volumens) und das gewählte Enzym (1 U/μg DNA). Der Ansatz wurde bei 37°C für mindestens 1 h inkubiert. Die meisten Enzyme konnten durch Hitze inaktiviert werden (65°C für 20 min). Auch eine Phenol/Chloroformaufreinigung führte zur Trennung des Enzyms vom Substrat.

2.1.0.4 Dephosphorylierung von DNA

Das Enzym Alkalische Phosphatase entfernt Phosphatgruppen am 5'Ende eines linearisierten Plasmids und verhindert dadurch eine Religation.
Durchführung Dephosphorylierung:

1. Herstellung des Ansatz aus 10 μg DNA, 1 μl 10xNEB Puffer 3
2. Inkubation für 60 Minuten bei 37°C
3. Hitzeinaktiviation der alkalischen Phosphatase oder Inaktivation durch Phenol-/ Chloroformaufreinigung

2.1.0.5 T_4-Polymerasebehandlung

Besitzen die einzufügende DNA und der geöffnete Vektor nach einem Verdau nicht komplementäre Überhänge, so können diese mittels einer T_4-Polymerasebehandlung geglättet werden. Das Enzym T_4-Polymerase schneidet überstehende Enden (3'Enden) eines DNA-Fragments ab bzw. füllt diese auf (5'Enden), so dass „glatte" Enden entstehen.
Durchführung T_4-Polymerase: Die DNA und/oder der Vektor wurden laut Herstellerprotokoll T_4-DNA-Polymerase (New England Biolabs) mit der T_4-DNA-Polymerase behandelt. Die T_4-Polymerase wurde durch 10 mM EDTA, 20 min bei 72°C oder durch Phenol-/Chloroformfällung inaktiviert.

Tabelle 4: Pipettieransatz zur Behandlung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit T_4-Polymerase

36 μg	DNA-Menge
2 μl	Puffer *New England Biolabs* 2
0,2 μl	BSA
2 μl	Nukleotidtriphosphat-Mix, 10 mM
1 μl(=3 U)	T_4-Polymerase
Gesamtvolumen 20 μl	destilliertes Wasser

2.1.0.6 Gerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese ist es möglich, in einen DNA-Abschnitt ein oder mehrere Nukleotide einzufügen, zu ersetzen oder zu eliminieren. Zur Mutagenese benötigt man den gewünschten DNA-Vektor („ParenteralDNA“) und Oligonukleotide, die partiell komplementär zum DNA-Vektor sind und die gewünschte Mutation enthalten.
Durchführung der gerichteten Mutagenese: Ziel dieser Arbeit war es, die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen EcoRV und SpeI in das Plasmid pAAV-hrGFP (Stratagene) einzubringen. Dafür wurde das QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Die Durchführung wurde gemäß Protokoll des Herstellers vollzogen. Nach der Denaturierung der Parenteral-DNA und der Mutageneseprimer erfolgte die Neusynthese von zirkulärer DNA durch die *Pfu*DNA-Polymerase. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym DnpI durchgeführt, das nur (hemi-)methylierte DNA auftrennen kann und somit ausschließlich ParenteralDNA schneidet. Im allgemeinen entsteht die Methylierung von DNA durch *Dam*-Methylierung in E.coli Stämmen (121). Da die neusynthetisierte DNA jedoch noch nicht in E.coli Stämmen exprimiert wurde, ist sie unmethyliert und somit vor DpnI Restriktion geschützt. Weiter erfolgt die Transformation des neusynthetisierten Plasmids in E.coli Bakterien.

2.1.0.7 Ligation

Ligation ist die Verknüpfung doppelsträngiger DNA durch Bildung einer Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch.
Durchführung Ligation: Nach photometrischer Bestimmung der Konzentrationen des DNA-Fragments und des geöffneten Vektors wurde folgender Ligationsansatz hergestellt.
Der Ansatz wurde inkubiert (sticky end-Ligationen bei 26°C für 1 h, blunt end-Ligationen bei 14°C für 24h) und anschließend zur Transformation verwendet.

Tabelle 5: Pipettieransatz zum Durchführen einer Ligation mit Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Vektoren mit sticky bzw. mit blunt ends

	Sticky end	blunt end
5xLigationspuffer	4 μl	4 μl
DNA Menge	0,01-0,1 μg	0,1-1 μg
T4-DNA-Ligase	0,1 U	1 U
Wasser	bis 20 μl	bis 20 μl

2.1.0.8 Transformation

Bei einer Transformation nehmen Bakterien Plasmide auf. Diese Fähigkeit wird als Kompetenz bezeichnet und kann durch Änderung der Kulturbedingung im Labor (z.B. Hitzeschock) induziert werden.

Durchführung Transformation: Ein Aliquot von 50 μl eines kompetenten *DH5α* Bakterienstammes wurde von -80°C mit 2-4 μl Plasmid-DNA vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für genau 30 sec mit anschließender erneuter Plazierung auf Eis für 2 min. Die Bakterien wurden für 1 h in 200 μl SOCS-Medium oder LB-Medium bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Ausplattierung des Ansatzes auf LB-Agar und eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Alle Kolonien enthielten auf Grund der Selektivität des LB-Agars einen Vektor mit Ampicillin-Resistenz. Abhängig von der Wahrscheinlichkeit, dass ein Bakterium das geklonte Plasmid enthielt, wurden 3-10 Kolonien ausgewählt, in LB-Medium überführt und zur weiteren Verwendung bei 37°C bei 200 rmp im Schüttler kultiviert.

2.1.0.9 Gewinnung der Plasmid-DNA

Mittels einer Mini-, Midi- oder MaxiPrep kann DNA isoliert werden. Welche Methode eingesetzt wurde, war abhängig von der gewünschten Menge und Reinheit der zu isolierenden DNA. Die Isolation basiert auf der Verwendung einer Anionenaustauschsäule. Negativ geladene DNA interagiert mit positiver Ladung auf der Säule. DNA bindet somit fest an die Säule, während Proteine, Kohlenhydrate und andere Verunreinigungen entfernt werden. Eine Kolonie wurde durch Inkubation in LB-Medium für ca. 12 Stunden bei 200 rmp bei 37°C vervielfältigt. Die DNA wurde den Angaben des Herstellers entsprechend isoliert.

Minipräparation: Wurde durchgeführt, um neusynthetiserte Plasmide zu verifizieren.

Midipräparation und Maxipräparation: Fand Anwendung, um größere und reinere Konzentrationen an DNA zu gewinnen. Die eluierte DNA wurde anschließend durch eine Phenol/Chloroformaufreinigung zusätzlich gereinigt und aufkonzentriert.

2.1.0.10 Phenol/Chloroformaufreinigung

Ziel einer Phenol/Chloroformaufreinigung ist es, die DNA von Proteinen zu befreien und aufzukonzentrieren.

Durchführung Phenol/Chloroformfällung: Zur DNA wurde Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und das Gemisch 10 min bei 10 000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Gemisch trennte sich in eine untere Phenolphase, die die denaturierten Proteine enthielt, und in eine obere, wässrige Phase, welche die gelöste DNA enthielt. Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reagenzgefäß erfolgte die Zugabe von 1/10 des Volumens 3 M NH_4Ac und die Zugabe von 100% Ethanol (2,5-fache Menge). Die DNA fällte sich bei der 30 min Inkubation bei - 20°C aus und wurde durch die folgende Zentrifugation für 30 min mit 14 000 rpm bei 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in destilliertem Wasser oder TE-Puffer gelöst.

2.1.0.11 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung kann spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt werden. Dabei entspricht die Einheit bei einer optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260nm}= 1) einer Konzentration von 50 μg/ml Doppelstrang-DNA. Die Konzentration der DNA lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$\text{DNA-Konzentration} = \frac{OD_{260} * 50\mu g * VF}{1000\mu l}$$

Zur Messung einer RNA-Konzentration wird ebenfalls die Extinktion bei 260 nm gemessen. Eine Einheit bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 μg/ml:

$$\text{RNA- Konzentration} = \frac{OD_{260} * 40\mu g * VF}{1000\mu l}$$

VF= Verdünnungsfaktor, OD= optische Dichte

Das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm (=Ratio) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA-Lösung. Reine DNA weist Werte zwischen 1,7 und 1,9 auf. Abweichungen von diesem Wert deuten auf Verunreinigungen hin.

2.1.0.12 Topo TA Cloning

PCR-Produkte können direkt oder nach Gelextraktion in den Plasmidvektor (pCR 2.1-TOPO, Invitrogen) kloniert werden. *Taq*Polymerase besitzt eine *Templat*-unabhängige Transferase Aktivität, die eine einzelne Desoxyadenosine-Base an die 3'Enden des PCR Produkts anfügt. Der linear vorliegende Vektor pCR 2.1-TOPO verfügt über einen

3'Thymidin-Überhang und über eine Topoisomerase I Aktivität, die als Selbstkatalysator dient und so den (A')-Überhang des PCR-Inserts mit dem komplementären (T')-Überhang des Vektors verknüpft.
Durchführung der Topoklonierung: Die Klonierung wurde entsprechend den Angaben des Topo TA Cloning Kits ausgeführt:

1. Reinigung des PCR-Produktes mittels GelExtraktion Kit oder StrataPrep PCR Purifikation Kit
2. Ligation des pCR 2.1-TOPO Vektors mit dem PCR-Produkt
3. Transformation des Ligationsansatzes in TOP10 Bakterien

2.1.0.13 PCR-Scrpit TM Amp Cloning Kit

Auch in diesen Vektor können PCR-Produkte direkt oder nach Gelextraktion eingebaut werden. Bei diesem System ligieren stumpfe PCR-Produkte in den linear vorliegenden, blunt-end-tragenden Vektor pPCR-Scrpit TM Amp SK+. PCR-Produkte werden zunächst durch eine *Pfu*DNA-Polymerase geglättet, da PCR-Amplifikate der *Taq*Polymerase an den 3'Enden des Plus- und Minusstrangs unspezifische Adenin-Überhänge besitzen. Ein vektorspezifischer Verdau (Restriktionsverdau des Vektors pPCR-Scrpit TM Amp SK+ mit dem Enzym SrfI) minimiert die Anzahl falsch positiver Klone. Srf I schneidet den TM Amp SK+ Vektor auf. Ein in den Vektor kloniertes PCR-Fragment unterbricht die Restriktionsschnittstelle SrfI [124].
Durchführung der Klonierung: Die Klonierung wurde gemäß den Angaben des PCR-Script Amp Cloning Kit ausgeführt:

1. Bei Vorliegen eines PCR-Produkts (mit *Taq*Polymerase gewonnen): Reinigung des PCR-Produkts durch GelExtraktion Kit oder StrataPrep PCR Purification Kit -> Glätten der 3'Enden der PCR-Produkte mit *Pfu*DNA Polymerase
2. Bei Vorliegen von Primern: PCR mit *Pfu*DNA-Polymerase -> es entstehen stumpfe Enden
3. Ligation des pPCR-Scrpit TM Amp SK+ Vektors mit dem PCR-Produkt
4. Enzym SrfI schneidet pPCR-Scrpit TM Amp SK+ Vektor
5. Transformation des Ligationsansatzes in Xl 10-Gold Kan Bakterien

2.1.0.14 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung gibt die Nukleotidabfolge eines DNA-Moleküls an. Die DNA-Proben konnten in dieser Arbeit mit dem ABI-System oder durch die Firma MWG (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, D) analysiert werden. Je Sequenzierungsreaktion wurden ca. 500 ng DNA und je 3 pmol der Primer eingesetzt.

2.1.0.15 RT-PCR und cDNA Synthese

Die RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) kann für die semiquantitative Bestimmung der Expression bestimmter Gene eingesetzt werden. Die Reverse Transkriptase, eine RNA abhängige DNA-Polymerase, schreibt isolierte RNA in cDNA um (Protokoll Superscript II RT, Qiagen). In einer PCR werden von der cDNA genspezifische Sequenzen amplifiziert und die Menge quantifiziert.

Durchführung RNA Isolation: Gemäß des Herstellers (RNeasy Mini Handbook, Qiagen) wurden transfizierte Zellen lysiert. Der freigesetzten RNA wurde RNAlater zur Verhinderung der Degradation und Ethanol zur Erhöhung der Bindung an Mini Spin Säulen zugegeben. Die Proben wurden auf Mini Spin Säulen aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung von Proteinen und Verunreinigungen wurde die RNA in destilliertem Wasser eluiert und mittels Spektrometers die Konzentration bestimmt.

Semiquantitative RT-PCR

Da in der PCR die cDNA/DNA-Menge logarithmisch amplifiziert wird, kann die Menge in einem Agarosegel zu unterschiedlichen Zykluszahlen bestimmt werden. Die Stärke der Bande korreliert mit der Menge an DNA.

Durchführung der semiquantitativen RT-PCR: Für diesen Versuch wurden PC-12 Zellen (8 cm^2 Platte) transfiziert, nach 6 h wurde das Medium gewechselt und der Wachstumsfaktor NGF (Endkonzentration 50 μM) zugegeben. Die Zellen wurden nach 3 Tagen mittels Trypsin geerntet und bei 37°C, 900 rmp, 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in RNAlater aufgenommen. Für diesen Versuch wurden die PC-12 Zellen folgendermaßen transfiziert:

Tabelle 6: Transfektionsansätze zur Durchführung der semiquantitativen reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Ansatz	RNAi Rock1 Sk+	RNAi Rock2 Sk+	Sk+	GFP	Ausführung
1	75%	-	-	25%	4x
2	-	75%	-	25%	4x
3	-	-	75%	25%	4x

RNA Isolation und cDNA Herstellung erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers (RNeasy Mini Handbook, Qiagen und Superscript II RT, Qiagen). Um die cDNA/DNA-Menge der einzelnen Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde bei allen Versuchsgruppen die gleiche Menge an DNA eingesetzt. GAPDH, ein *housekeeping gene*, diente als Referenzgen. Die PCR wurde mit den Primern CMVs forward und RNAi ROCK1 bzw. RNAi ROCK2 und dem Referenzgen GAPDH durchgeführt, anschließend wurde das

Agarosegel mit den PCR-Produkten bei Zykluszahl 19, 22, 25, 27 und 29 beladen. Die DNA Menge wurde in Relation zur Stärke der Bande unter UV-Licht beurteilt.

Primer semiquantitative RT-PCR:

Primer CMVs forward	5' CGG ACC GAC GCG TGG AGC TAG TTA TTA A 3'
Primer RNAi ROCK1	5' ACT AGT TTT ATT ATG TCG ACT GGG GAC AGT TTT GAC AGG AAG AAA CTG TCC CCA GTC GAC ATG AAT TGA CGG TTC ACT AAA 3'
Primer RNAi ROCK2	5' ACT AGT TTT ATT ATG CGC TAA CCA AAG ATA TTT GAC AGG AAG AAT ATC TTT GGT TAG CGC ATC AAT TGA CGG TTC ACT AAA 3'
Primer GAPDH reverse	5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA TGT 3'
Primer GAPDH forward	5' GGC CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT 3'

Real time RT-PCR

Bei der real time RT-PCR werden Nukleinsäuren gemäß dem Prinzip der PCR amplifiziert und quantifiziert. DNA-Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. SYBR Green) interkalieren mit der DNA. Da die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte ansteigt, ist eine Quantifizierung während der Amplifizierung möglich. Um einen relativen Mengenvergleich durchzuführen, wird das *housekeeping gene* PBGD (Gene for porphobilinogen deaminase) als Referenzgen mitgemessen.

Durchführung real time RT-PCR: siehe Durchführung semiquantitative RT-PCR (2.1.0.15). Für diesen Versuch wurden die PC-12 Zellen folgendermaßen transfiziert: (Bezug auf Versuch 3.4.0.41)

Tabelle 7: Transfektionsansätze zur Durchführung der real time reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Ansatz	LINA RNAi2	Ires-GFP	Lina-IRES	GFP	Ausführung	NGF
1	75%	-	-	25%	4x	1:500
2	-	75%	-	25%	4x	1:500
3	-	-	75%	25%	4x	1:500
4	75%	-	-	25%	4x	-
5	-	75%	-	25%	4x	-
6	-	-	75%	25%	4x	-

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden alle nicht transfizierten Zellen verworfen, die Anzahl der transfizierten Zellen bestimmt und gemäß dem Protokoll RNeasy Handbook RNA gewonnen. Gleiche Mengen an RNA wurden pro Ansatz verwendet. Die

PCR lief in Glaskapillaren ab. Jede Glaskapillare enthielt 10 μl 2xQuantiTect SYBR Green Master Mix, 0,5 μl von jedem Primer, 2 μl cDNA und RNAse freies Wasser. Ein Primermix enthielt Oligonukleotide für das zu untersuchende Gen (LINA) und das Referenzgen PBGD. Der Lightcycler wurde folgendermaßen programmiert:

Tabelle 8: Programmierung des Geräts LightCycler zur Durchführung der real-time reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Programm	Zyklen	Temperatur	Zeit
Reverse Transkriptase	1	50°C	20 min
Vorinkubation	1	95°C	15 min
Amplifizierung	30	95°C	15 sec
		55°C	30 sec
		72°C	30 sec
Schmelzkurve	1	95°C	15 sec
		65°C	30 sec
		98°C	15 sec
Abkühlung	1	40°C	min 10 min

Ein Computerprogramm berechnete die Mengen der amplifizierten cDNA.

Primer real time RT-PCR:

Primer LINA RT reverse	XXXXX
Primer LINA RT forward	XXXXX
PBGD reverse	5' CTC CTT CCA GGT GCC TCA GA 3'
PBGD forward	5' TGT ATG CTG TGG GTC AGG GA 3'

2.2 Zellkultur

2.2.0.16 Kulturbedingungen, Standardkultur und Passagieren

Alle Arbeitsschritte mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer *Laminar-Flow*. Die Zellen wurden in einem Brutschrank unter Standardbedingungen (37 °C, 95% Luft und 5 % CO_2) inkubiert. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von maximal 80% wurden sie passagiert: Die adhärenten Zellen wurden durch Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung während einer Inkubationszeit von maximal 5 min von der Schale gelöst. (Um die Reaktion zu beenden, wurde Medium zugegeben.) Anschließend wurden die abpipettierten Zellen bei 37°C, 900 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in neue Gewebeschalen transferiert. Zur Konservierung wurden Zellen in „Einfriermedium" (30% FCS + 20% DMSO + 50% DMEM) suspendiert und - nach einer zunächst kontinuierlichen Abkühlung in Einfrierbehälter mit

-80°C - nach 24 h in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Zellen aus flüssigem Stickstoff konnten erneut in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut werden. Die für die Zellkultur verwendeten Medien und Lösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Trypsin/EDTA-Lösung: 0,05%/0,02% in PBS, ohne Ca_2^+ und Mg_2^+
Zellkultur-Vollmedium: 1% Penicillin/Streptomycin (100 μg/ml) und 10% FCS in 500 ml DMEM

2.2.0.17 Transfektion

Bringt man DNA in eukaryontische Zellen ein, wird dies als Transfektion bezeichnet. Bei einer transienten Transfektion wird die eingebrachte DNA nur vorübergehend exprimiert. Sie degradiert und wird nicht in das nukleare Genom der Zelle aufgenommen.

Lipofektamin-Transfektion
Als Vehikel transportieren Liposomen DNA in eine Zelle, indem ihre Lipiddoppelschicht die wässrige DNA umgibt. Die DNA gelangt nach Fusion mit der Zellmembran in die Zelle.
Durchführung Lipofektamin-Transfektion: Am Tag der Transfektion betrug die Konfluenz ca. 80%. Das Medium wurde 6 h vor Durchführung der Transfektion sowie 6 bis 12 h danach erneuert. Bei Versuchen mit PC-12 Zellen wurde 6 h nach der Transfektion zur Stimulation des Neuritenwachstums der Wachstumsfaktor NGF (nerve growth factor) (Endkonzentration 50ng/ml) hinzugeben.
Die einzelnen Transfektionsansätze mit Lipofektamin sind im Anhang detailiert aufgelistet.

Kalzium-Phosphat-Präzipitation
Vermischt man Kalziumchlorid und Natriumphosphat entsteht Kalziumphosphat, an das sich DNA binden kann. Auf bislang ungeklärte Weise können die Kalziumphosphatkristalle (+ DNA) von den Zellen aufgenommen werden.
Durchführung Kalzium-Phosphat-Präzipitation: Die Zellen waren vor Transfektion ca. 80 % konfluent. Zwei Stunden vorher wurde das Medium gewechselt.

1. Herstellung der Transfektionsmischung für eine 10 cm^2 Pertischale:

20 μg	DNA
50 μl	10x TE-Puffer
60 μl	$CaCl_2$ ($CaCl_2$ muss als letztes hizugegeben werden)
Gesamtvolumen 560 μl	Wasser

2. Zugabe des Ansatzes zu 560 μl 2xHBS (pH 7,03) unter Vortexen bei 1000 rmp
3. Inkubation bei 37°C für 10 min

Der Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Das Medium nach 12 bis 16 h gewechselt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsansätze mit Kalzium-Phosphat sind im Anhang detailiert aufgelistet.

2.2.0.18 Poly-D-Lysinbeschichtung bzw. Poly-L-Lysinbeschichtung

Die normalerweise negativ geladenen Kulturschalen erlangen durch die Beschichtung mit PLL bzw. PDL eine positive Ladung. Dadurch wird die Adhäsion von PC-12 Zellen an die Kulturschale verbessert. Im folgenden wird die Beschichtung mit PLL/PDL als regenerationspermissives bzw. regenerationsneutrales Substrat bezeichnet. PDL und PLL wurden in dieser Arbeit gleichbedeutend eingesetzt.
Die in dieser Arbeit verwendeten PC-12 Zellen sind Phäochromozytomzellen der Ratte, die sich durch eine Behandlung mit NGF oder EGF differenzieren und ein Neuritenwachstum aufweisen [131]. Auch in den Experimenten dieser Arbeit wurde NGF in einer 1:500 Verdünnung (Endkonzentration 50 ng/ml) auf PC-12 Zellen gegeben, um Effekte der neuronalen Differenzierung untersuchen zu können. Zur besseren Adhärenz wurden für alle Versuche mit PC-12 Zellen die Kulturschalen immer mit Poly-D-Lysin (PDL) oder Poly-L-Lysin(PLL) beschichtet.
Durchführung Lysinbeschichtung: Petrischalen wurden mit Polylysinlösung (0,1% PLL/PDL in HBSS) für 1 Stunde benetzt, anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

2.2.0.19 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer kann die Zellzahl ermittelt werden. Die Konzentration wird mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ ml} = \frac{10^4\text{x Anzahl Zellen in allen Feldern x Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl Felder(4)}}$$

2.2.0.20 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Anzahl und Eigenschaften von Zellen bestimmt werden. Bestimmte Zellen können aus einer Gesamtheit eliminiert werden. Da in einem FACS-Gerät(**f***luorescence* **a***ctivated* **c***ell* **s***orting*) Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren, kann durch Photonenemission die Anzahl der fluoreszierenden Zellen berechnet werden. Durch Lichtstreuung können Eigenschaften der Zellen bestimmt werden.

Durchführung FACS: Abtrypsinierte, transfizierte Zellen wurden in eine Lösung aus 1xPBS, 10% FCS und 3mM EDTA aufgenommen und zur Separation gefiltert. Da der Zielbereich des FACS-Gerätes so eingestellt war, dass nur fluoreszierende Zellen ausgewertet wurden, erfolgte eine Trennung transfizierter Zellen von untransfizierten Zellen. Alle transfizierten Zellen wurden zur Weiterverarbeitung (RNA-Isolation und cDNA-Synthese) in RNAlater aufgefangen.

2.2.0.21 Myelinbeschichtung

Myelin umhüllt bei Säugetieren die Axone der Nervenzellen und besitzt inhibitorische Eigenschaft auf das Auswachsen von Neuronen (siehe Einleitung). Um in Zellkultur eine dem zentralen Nervensytem vergleichbare Umgebung zu schaffen, wurden Pertrischalen mit Myelin beschichtet.
Durchführung Myelinbeschichtung: Zunächst wurde Myelin von -80°C auf Eis aufgetaut und folgendermaßen angesetzt:

1. Zufügen von 10xPBS (1/10 Volumen) zum Myelin
2. Herstellung steriler Bedingungen durch Zugabe von 60 mM β-octyl glucoside
3. Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden
4. Zentrifugation bei 14 000 rmp bei Raumtemperatur für 10 min
5. Verdünnung mit 1xPBS

Die Pertischalen wurden folgendermaßen mit Myelin beschichtet. Bei der Kontrollgruppe gab man statt Myelin 1xPBS auf die Kulturschalen:

1. Beschichtung der Pertischalen mit Nitrozellulose (40 cm^2+ 50 ml 100% Methanol)
2. Entfernen der Nitrozellulose nach 2 sec, trocknen lassen
3. Poly-L-/D-Lysin Beschichtung der Platten
4. Zugabe des angesetzten Myelins
5. Inkubation für 30 min bei 37°C im Brutschrank
6. Abwaschen des Myelins mit 1xPBS
7. Ausplattierung der Zellen

PC-12 Zellen wurden auf den beschichteten Platten ausgesät. Um die Aktivität des Myelins zu testen, untersuchte man zunächst das Wachstum von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Verdünnungen (1:20, 1:40 und 1:100). Eine Verdünnung von 1:40 erwies sich als am geeignetsten und wurde daher für die folgenden Versuche verwendet.

2.2.0.22 Auswertung der Zellen

3 Tage nach Transfektion wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ungefähr 50 Bildabschnitte (mit ca. 4 Zellen) gleichmäßig über die Pertischale verteilt aufgenommen. Bei der folgenden Auswertung am Computer wurde bei jeder fluoreszierenden Zelle die Länge des längsten Fortsatzes (Gruppen: $>13\ \mu m$, $>25\ \mu m$, $>37\ \mu m$ und $>50\ \mu m$), die Anzahl der Neuriten sowie die Anzahl der Zellkerne bestimmt. Bei jeder Versuchsgruppen wurde der Mittelwert, der Standardfehler, die Standardabweichung sowie die Signifikanz berechnet.

2.3 Herstellung Adeno-Assoziierter-Viren, Subtyp 2

Vektoren viraler Herkunft können verwendet werden, um ein gewünschtes Gen in Säugetierzellen einzubringen. Optimale Eigenschaften bietet das Adeno-Assoziierte-Virus (Serotyp 2, AAV-2), ein replikationsdefizientes Parvovirus. Dieses Virus wird häufig in der Gentherapie eingesetzt, da es folgende Vorteile aufweist [122]:

1. Es infiziert Zellen unabhänig von ihrer Zyklusphase
2. Es vermehrt sich epichromosomal, wodurch langsam- oder sich nicht teilende Zellen das Virus-Genom dauerhaft exprimieren
3. Es produziert keinen Wildtyp-Virus. Die Immunantwort der mit dem Virus transfizierten Zelle verläuft sehr gering. Es werden keine Krankheiten ausgelöst.

AAV-2 wird als Dependovirus bezeichnet, da zu seiner Replikation bestimmte Helferfunktionen benötigt werden (Kodierung auf Herpes- oder Helferviren) [122]. Fehlt einer AAV-2-infizierten Zelle die Kotransfektion mit einem Helfervirus, so kommt es zu einer latenten AAV-2-Infektion. Durch Kotransfektion des rekombinanten Plasmids mit den Helferplasmiden entstehen in den Zellen AAV-2 Virenpartikel, die dann zur Infektion von Säugetierzellen verwendet werden können (vgl. Abb. 3).

In dieser Arbeit wurde zunächst mit Hilfe des AAV Helper-Free-Systems ein funktionstüchtiges Virus unter Verwendung des Plasmids RNAi ROCK mit den Helferplasmiden pAAV-RC und pHelper (Stratgene) hergestellt. Jedoch erwies sich trotz optimierter Bedingungen der Titer im Vergleich zu einem in unserem Labor eingesetzten Virus (Cebpδ) als zu niedrig. So wurde in einem weiteren Versuch das Virus KombiPlasmid mit dem Helferplasmiden pLT-Plasmid und GTI-Plasmid hergestellt. Der Prozeß wird im Folgenden genauer erläutert.

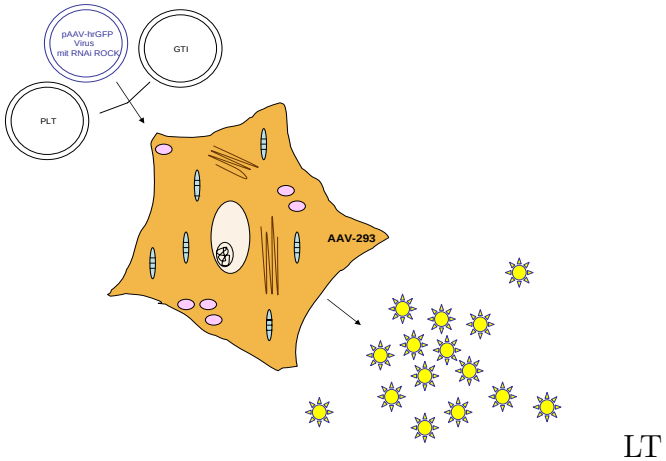

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Virusproduktion: Die zwei Koplasmide pLT und GTI und das modifizierte Plasmid pAAV-hrGFP bilden nach Transfektion in pAAV-293 Zellen funktionstüchtige Viren

2.3.0.23 Transfektion von 293-AAV-Zellen

Die Helferplasmide und der rekombinante Vektor bilden nach Transfektion in AAV-293 Zellen Adeno-Assoziierte-Viren, Subtyp 2. AAV-293 Zellen sind abgeleitet von HEK-293 Zellen, produzieren aber höhere virale Titer.

Durchführung Transfektion: AAV-293 Zellen mit einer möglichst niedrigen Passagennummer (Passagennummer 1-3) wurden in Kultur genommen und bei 50% Konfluenz passagiert, so dass 24 h vor Transfektion die Zellen fünf 15 cm^2 Zellkulturschalen mit einer Konfluenz von 60% füllten. Pro Schale erfolgte eine Zugabe von 25 ml DMEM-Medium. Ein optimaler Virustiter wurde erreicht, wenn die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 80% konfluent waren.

Zur Transfektion wurde die Ca_2PO_3-Methode laut folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 9: Transfektionsansatz zur Produktion Adeno-Assoziierter-Viren, Subtyp 2

62,5 μg	rekombinantes Plasmid (KombiPlasmid)
62,5 μg	pLT Plasmid
187,5 μg	GTI PLasmid
1,25 ml	10x TE-Puffer, pH 7,5
1,5 ml	$CaCl_2$, 2 M
Gesamtvolumen 12,5 ml	Wasser

Der Ansatz wurde vermischt, auf dem Vortexer bei 1000 rmp tropfenweise zu 12,5 ml 2xHBS, pH 7,03 gegeben, für 10 min bei 37 °C inkubiert und gleichmäßig auf Platten mit AAV-293 Zellen verteilt (5,6 ml/Platte). Ein Mediumwechsel erfolgte 12-16 h nach Transfektion mit 25 ml DMEM. Nach 48-56 h wurden die Zellen geerntet.

Wurde der Virus in AAV-293 Zellen produziert, änderte sich die Morphologie der Zellen. Sie wurden rund und lösten sich von der Platte ab. Das normalerweise rote Medium wurde gelborange. Die für die Virusproduktion verwendeten Lösungen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 10: Ansatz zur Herstellung eines TE-Puffers

100 mM	Tris
10 mM	Ethylendiamintetraessigsäure
Zugabe von HCL	auf pH 7,5

Tabelle 11: Ansatz zur Herstellung von 2x HBS

280 mM	NaCl
1,5 mM	Na_2HPO_4
50 mM	HEPES
10 mM	KCl
12 mM	Glucose

2.3.0.24 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der AAV-2

Die in den AAV-293-Zellen produzierten AAV können mittels Schockgefierung aus den Zellen gewonnen, anschließend aufgereinigt und aufkonzentriert werden. Eine Heparinsulfat-Affinitätssäule eignete sich besonders zur Reinigung und Abtrennung von Adenoviren, da Heparinsulfatproteoglykan als zellulärer Rezeptor von AAV identifiziert wurde [127].
Vorbereitung Heparinsäule: Eine Econosäule wurde mit 4 ml Heparin-Agaroselösung gefüllt und zweimal mit je 12,5 ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde 7,5 ml 1 M NaCl zugegeben, um alle an der Säule haftenden Proteine zu eliminieren. Es folgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit 1xPBS.
Im folgenden ist das Protokoll zur Virusaufreinigung und Aufkonzentrierung aufgeführt:

1. Lösen der AAV-293 Zellen durch Abpipetieren
2. Zentrifugation der Zellen bei 4°C für 10 min bei 2000 rmp. Der Überstand wurde verworfen
3. Resuspension des Zellpellets in 12,5 ml DMEM
4. Schockgefrierung der Zellen: Die Zellen wurden für 20 min in ein Kältebad (Trockeneis + 100% Ethanol) und anschließend in 37°C warmes Wasser für 20 min gestellt. Dann wurden sie bei 1600 rmp gevortext; 3-maliges Wiederholen

5. Degradation unverpackter Nukleinsäuren durch Zugabe von Benzonase (Endkonzentration 250 U/ml), Inkubation bei 37°C für 30 min
6. Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 3000 rmp, Überführen des Überstands in ein neues Falkon (50 ml)
7. Reinigung der Viren durch Hinzufügen von Deoxycholinsäure (Endkonzentration 0,5%), Inkubation bei 37°C für 30 min
8. Überführen des Viruslysats auf die Heparinsäule, zweimaliges Waschen der Säule mit 12,5 ml 1xPBS + 0,1 M NaCl
9. Elution der Viren durch Zugabe von 3 ml 1xPBS + 0,4 M NaCl, anschließend von 5 ml 1xPBS + 1 M NaCl

Die aufkonzentrierten und gereinigten Viren wurden zu Fraktionen von je 50 μl aufgefangen.

2.3.0.25 Konzentrationsbestimmung der produzierten Viren

Weisen die hergestellte Viren einen ausreichenden Titer auf, sind sie in der Lage Zellen zu infizieren. Zum Nachweis einer Virusproduktion wurden je 14 μl Viruseluat auf HT-Zellen (in 150 μl Medium, 95% konfluent) gegeben. Eine erfolgreiche Transfektion war nach 24 h mittels Fluoreszenzmikroskop nachweisbar. Je nach Intensität der Fluoreszenz und Anzahl infizierter HT-Zellen konnte der Virustiter bestimmt werden. Der Titer wurde im relativen Vergleich zu einem in unserem Labor verwendeten Virus (Cebpδ) bestimmt. Das Virus Cebpδ ist ein höchst konzentriertes Virus. Das Virus KombiPlasmid erzeugte einen fast ebenso hohen Titer. Die produzierten AAV-2 wurden bei -80°C gelagert und vor ihrer weiteren Verwendung auf Eis wieder langsam aufgetaut.

2.4 Tierversuche

Die Operationen, Perfusionen und Einbettungen wurden von Prof. Dr. Dietmar Fischer und Dr. Thomas Hauk, Universität Ulm, experimentelle Neurologie, durchgeführt.

2.4.0.26 Versuchstiere, Instrumente und Materialien

6 männliche Albinoratten des Spargue-Dawley Stammes (*Rattus norvegicus*) aus eigener Zucht wurden als Versuchstiere verwendet, 2 Albinoratten wurden als Kontrolltiere verwendet. Die Tiere wurden zu dritt oder zu viert in üblichen Zuchtställen bei Raumtemperatur unter einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden gehalten. Sie erhielten Standardfutter und Wasser. Die Firma Aesculpa lieferte die zur Operation notwendigen Instrumente (feine Pinzetten, chirurgische Pinzetten, Mikro-, Kapsel-

Präparationsscheren, Faden- und Skalpellhalter). Die Operationen wurden unter einem Zeiss Operationsmikroskop ausgeführt.

2.4.0.27 Eingriffe am Tier

Die Ratten wurden ca. 15 min vor Operationsbeginn mit Ketamin (80-100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin 2% (12-16 ml/kg Körpergewicht) intraperitoneal narkotisiert. Das Erreichen des Narkosestadiums wurde durch das Ausbleiben des Lidreflexes sichergestellt. Die Haare der Kopfhaut wurden abrasiert, um für die Operation einen einfachen Zugangsweg zu schaffen. Die Ratte wurde mit Hilfe einer Maulklemme auf dem Operationstisch fixiert. Nach Operationsende erfolgte eine funduskopische Analyse der Retina, wofür ein Objektträger auf der Cornea angedrückt wurde, um auszuschließen, dass Gefäße verletzt worden waren. Es besteht v.a. eine große Verletzungsgefahr der Arteria centralis, welche die inneren Schichten der Netzhaut versorgt und im Epineurium des Sehnerven verläuft. Den Ratten wurde eine antibiotikahaltige Augensalbe (Gentamex) zum Schutz vor Infektionen und zur Befeuchtung des Auges aufgetragen, bevor sie in ihre Käfige zurückgelegt wurden.

2.4.0.28 Intravitreale Injektion

In den Glaskörper wurde transskleral und transretinal $14\mu l$ Virus mit Hilfe einer Kapillare injiziert. Der Glaskörper wurde dazu folgendermaßen freipräpariert:

1. 1,5 cm langer, sagitaler Schnitt der Kopfhaut entlang der Medianlinie
2. Lösen des Hautlappens vom Schädel, Wegspannen des Hautlappens mit einem chirurgischen Faden
3. Schnitt entlang des Os frontale oberhalb des Augapfels -> Zugang zur Orbita
4. Partielle Entfernung der Tränendrüse und Durchtrennung der extrabulbären Muskulatur -> Auffinden des Sehnervs
5. Durchstechen der Sklera ca. 2 mm distal des Sehnervansatzes
6. Injektion des Virus mittels einer Kapillare in das Corpus vitreum (Die Kapillaren wurden zuvor durch Auseinanderziehen von Glaskapillaren mittels Elektrodenpuller hergestellt)
7. Verschluss der Kopfhaut durch eine Naht

Da der Glaskörper nur eine zusätzliche Injektion von ungefähr $3\mu l$ zulässt, wurde -um $14\mu l$ Viruseluat einbringen zu können- ein gleiches Volumen an Kammerwasser durch Vorderkammerpunktion entnommen. Die Injektion des Virus erfolgte jeweils in das linke Rattenauge. Den Kontrolltieren wurde statt Viruseluat $14\mu l$ 1xPBS injiziert.

2.4.0.29 Quetschung des Sehnervs

Wird der Nervus opticus durchtrennt, führt dies zu einer irreversiblen Verletzung des Sehnervs und zum Zelltod retinaler Ganglienzellen. Der gleiche Zugangsweg wie zur intravitrealen Injektion wurde angewand und der Sehnerv aufgesucht (siehe 2.4.0.28, 1.-4.). Es wurde bei den Ratten jeweils der linke Sehnerv gequetscht. Die Axotomie erfolgte folgendermaßen:

1. Durchtrennung der oberen extraokularen Muskeln -> Anbringen eines Haltefadens, um das Auge nach unten zu fixieren
2. Schnitt durch die Meningen -> Sehnerv liegt nun frei
3. Umfassen des Sehnervs mit einer Pinzette und Quetschung für 10 sec, so dass eine Läsionsstelle zurückbleibt
4. Verschluss der Kopfhaut durch eine Naht

2.4.0.30 Linsenverletzung

Wird die Axotomie gleichzeitig mit einer Linsenverletzung durchgeführt, können erheblich mehr Axone distal der Läsionsstelle einwachsen (siehe Einleitung) [41].
Durchführung Linsenverletzung: 5 bzw. 7 Wochen nach Injektion des Virus in den Glaskörper wurde die Quetschung durchgeführt, im Anschluß daran ein traumatischer Katarakt induziert. Mit einer Mikrokapillare wurden die Skleren durchstochen und die Linse verletzt. Das Drehen der Kapillare um die eigene Achse vergrößerte den Einstichkanal.

2.4.0.31 Perfusion

Zwei weitere Wochen nach Axotomie wurde die Ratte schmerzlos unter einer Ketanest (80-100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin 2% (12-16 ml/kg Körpergewicht) Narkose getötet und anschließend mit PBS perfundiert.
Durchführung Perfusion: Die Bauchdecke wurde eröffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Über den linken Ventrikel wurde eine Kanüle in die Aorta gelegt und eine Infusion mit 1xPBS angehängt. Der rechte Vorhof wurde eingeschnitten. Es wurde so lange PBS infundiert, bis die Ratte vollständig ausgeblutet war. Mit Hilfe von Paraformaldehyd (PFA) wurde das Tier fixiert. Die Augen und Sehnerven wurden freipräpariert. In die Cornea wurden Löcher mittels einer Kanüle eingefügt, damit später PFA zur Fixierung und Sucrose zur Entwässerung eintreten konnten. Anschließend wurden die Augen für 6 h in PFA gelegt und in ein Falkon mit 30% Sucroselösung überführt. Sie inkubierten so lange darin bis sie zu Boden sanken. Die Augen mit Sehnerv wurden in Tissue-tek eingebettet. Unter Verwendung eines Kryostats wurden 0,14 mm dicke Schnitte angefertigt und diese mit Pinseln auf Objektträger überführt.

2.5 Immunhistochemie

Beruhend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch die Immunhistochemie ein Protein oder Membranantigen sichtbar gemacht. Ein erster unmarkierter Antikörper bindet an ein bestimmtes Epitop eines Proteins. An diesen bindet wiederum ein zweiter fluoreszensgekoppelter Antikörper. Die Schnitte wurden laut folgendem Protokoll angefärbt:

1. Fixierung in 100% Methanol für 10 min
2. Waschen in PBS für 5 min, 3-fache Wiederholung
3. Blockierung unspezifischer Bindungen durch Inkubation in Lösung (5% donkey serum, 2% BSA in TBS-T) für 30 min
4. Zugabe des Erstantikörpers, Inkubation für mindestens 12 Stunden bei 4°C
5. Waschen in PBS für 5 min, 3-fache Wiederholung
6. Zugabe des Zweitantikörpers, lichtgeschützte Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
7. Waschen mit 1x PBS für 5 min, 3-fache Wiederholung
8. Eindeckeln der Schnitte in Mowiol

Die Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und anschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 12: Auflistung verwendeter Primär- und Sekundärantikörper

	Antigen	Nachweis für	Verdünnung
Erstantikörper	Mouse anti rat ßIII-Tubulin	TUJ1	1:1000
	Sheep anti rat GAP 43	regenerierende Axone	1:1000
	Rabbit anti LINA	LINA-Protein	1:100
Zweitantikörper	Goat anti mouse	anti mouse	1:1000
	Goat anti sheep	anti sheep	1:1000
	Goat anti rabbit	anti rabbit	1:100

2.6 Statistische Auswertung

Bei allen quantitativen Daten wurde Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler berechnet.
Ausgewertet wurden *in vitro*:

- Anzahl der Axone pro Zelle
- Länge des längsten Axons einer Zelle in μm

Ausgewertet wurden *in vivo*:

- Anzahl regenerierender Axone eines Sehnervs länger als 0,25 mm, länger als 0,5 mm und länger als 1 mm distal der Läsionsstelle
- Anzahl der retinalen Ganglienzellen pro Schnitt

In den folgenden Diagrammen ist jeweils der Gruppenmittelwert abgebildet. Der Whisker kennzeichnet die Standardfehler. Um eine Aussage über die Signifikanz zu treffen, wurde der Student t-Test durchgeführt; p*= 0,05> α > 0,01 bedeutet signifikant, p**= 0,01 > α> 0,001 sehr signifikant und Werte von p*** = α < 0,001 äußerst signifikant.

2.7 Verwendete Materialien

Nachfolgend findet sich eine vollständige Auflistung aller Materialien und Geräte, die für die Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden unter Angabe des jeweiligen Herstellers, bzw. der Bezugsquelle.

Primer
Alle benötigten Primer wurden von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm, Deutschland) hergestellt.

Medien und Reagenzien für die Zellkultur

DMEM	Invitrogen (GIBCO), Karlsruhe, D
FCS	PANTM Biotech GmbH, Santa Cruz, USA
LipofectamineTM (2 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, USA
LB-Agar	Invitrogen, Carlsbad, USA
NGF	SIGMA, USA
LB Broth Base	GIBCO BRL, Paisley, Scotland, UK
Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrom AG, Berlin, D
Pferde Serum	GIBCO, Paisley, Scotland, UK
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories, Lins, A

Lösungen und Puffer

1 kb plus DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
5xT4 DNA Ligase Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
10xPCR Puffer (- MgCl2)	Invitrogen, Carlsbad, USA
10xReact no. 1-2	Invitrogen, Carlsbad, USA

Reagenziensysteme (Kits)

AAV Helper-Free-System	Stratagene, Amsterdam, NL
PCR-Script Amp Cloning Kit	Stratgene, Amsterdam, NL
PureYieldTM PlasmidMidiprepSystem	Promega, Madison, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, D
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden, D
QuickChangeSite-Directed MutagenesisKit	Stratgene, Amsterdam, NL
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
StrataPrep®PCR PurificationKit	Stratagene, Amsterdam, NL
SuperScriptTM II RT	Invitrogen, Carlsbad, USA
TOPO®TA Cloning® Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Wizard® Plus SV Minipreps	Promega, Madison, USA

Enzyme

T_4Polymerase	NEB, Frankfurt, D
Alkalische Phosphatase	NEB, Frankfurt, D
DpnI, NotI, RsRII, SphI	NEB, Frankfurt, D
EcoRV, NotI, PvuI, SpeI, XbaI, XhoI	Invitrogen, Carlsbad, USA
TaqDNA Polymerase (5U/μl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
PfuDNA Polymerase	Stratgene, Amsterdam, NL
SrfI	Stratagene, Amsterdam, NL

Tier-, Bakterien- und Zellmaterialien

AAV-293	Stratagene, Amsterdam, NL
DH5α Bakterienstamm	Invitrogen, Carlsbad, USA
HEK-293	Abteilung Anatomie und Zellbiologie, Universität Ulm, D
HT-Zellen	Abteilung Anatomie und Zellbiologie, Universität Ulm, D
PC-12	Abteilung Anatomie und Zellbiologie, Universität Ulm, D
Retinale Ganglienzellen 5 (RGC-5)	Universität Gießen
Sprague Dawli Ratten	Charles River, Sulzfeld, D
TOP10 Bakterien	Invitrogen, Carlsbad, USA
Xl 10-Gold Kan Bakterien	Stratagene, Amsterdam, NL

Antikörper

Primärantikörper

Anti-beta-III-Tubulin	Monoklonales Maus-IG2A	Invitrogen, Karlsruhe, D
Anti-GAP 43	Monoklonales Schaf	Invitrogen, Karlsruhe, D
Anti-LINA	Polyklonales-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, D

Sekundärantikörper

AlexaFlour 350-konjugiertes Anti-Maus-IgG (Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe, D
AlexaFlour 488-konjugiertes Anti-Maus IgG (Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe, D
AlexaFlour 594-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	Invitrogen, Karlsruhe, D
HRP-konjugiertes Anti-Maus-IgG (Ziege)	SIGMA, St. Louis, USA
HRP-konjugiertes Anti-Schaf-IgG (Ziege)	SIGMA, St. Louis, USA

Software

Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe Systems, München, D
Axio Vision Rel 4.5	Zeiss, Göttingen, D
Microsoft Office XP	Microsoft, Seattle, USA
Spot Advanced	Heise Software

Chemikalien und Reagenzien

2-ß-Mercaptoethanol (14,3 mol/l)	SIGMA-Aldrich GmbH, Steinheim, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Agarose	GIBCO BRL, Paisley, Scotland, UK
Ampicillin (als Natriumsalz)	SIGMA, St. Louis, USA
Benzonase	MERCK, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
BSA (Bovines Serumalbumin)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Deoxycholinsäure	SIGMA, St. Louis, USA
DMSO (Dimethylsuloxid)	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
EDTA	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Ethanol (vergällt)	Apotheke Uniklinik Ulm, D
Ethidiumbromid 10 mg/Tablette	SIGMA, St. Louis, USA
Gentamex	Cross Vetpharm Group Ltd., Dublin, I
D(+)-Glucose-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt, D

Glycerin (p.a.)	J.T. Baker, Deventer, NL
H2O steril (Ampuwa Plastipur®)	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, D
HCl (> 37%)	Riedel-de Haën, Seelze, D
HEPES (> 99.5%)	SIGMA, St. Louis, USA
HS	GIBCO, Paisley, Scotland, UK
Isopropanol (> 99.8%)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
KCl (> 99.5%)	AppliChem, Darmstadt, D
Ketamin (10%)	CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, D
Methanol (reinst)	MERCK, Darmstadt, D
MgCl2 (50 mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
MOWIOL	Calbiochem, Darmstadt, D
Natriumphosphat (> 99.5%)	Riedel-de Haën, Seelze, D
NaAc (> 99.0%)	MERCK, Darmstadt, D
NaCl (> 99.5%)	AppliChem, Darmstadt, D
β-octyl glucoside	A.G. Scientific Inc, San Diego, USA
Paraformaldehyd (10% Formalin)	SIGMA, Steinheim, D
PBS (10x, pH 7.4, -CaCl2, -MgCl2)	GIBCO, Paisley, Scotland, UK
PFA (10% Formalin)	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Poly-L-Lysin (5 $\mu g/\mu l$)	SIGMA, St. Louis, USA
Poly-D-Lysin (5 $\mu g/\mu l$)	SIGMA, St. Louis, USA
Tris (> 99.8%)	BIO RAD, Hercules, USA
Xylazin (2%)	CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, D

Laborgeräte und Hilfsmittel

Autoklav	Systec GmbH, Wettenberg, D
Auslaufpipetten	Sarstedt Inc., Newton, USA
Deckgläser (24 x 50mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar, D
Econosäule	BIO RAD, Hercules, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	Gilson/Eppendorf Sarstedt, Nümbrecht, D
Eismaschine AF-10 ASB 0600	Scotsman, Mailand, I
Feinwaage BP 110 S	Sartorius, Göttingen, D

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (integrierte Kamera (AxioCam MRm), Fluoreszenzfilter 450 - 490 nm/ 510 - 560 nm/ 395 - 440 nm, Quecksilberhochdrucklampe HBO 100 W)	ZEISS, Oberkochen, D
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach, D
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach, D
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus Instruments, Hanau, D
Geldokumentationssystem Gel Doc 1000	BIO RAD, Hercules, USA
Gelhalter	BIO RAD, Hercules, USA
Gelkammern versch. Größen	BIO RAD, Hercules, USA
Gelschlitten	BIO RAD, Hercules, USA
Glasplättchen (Ø 10mm)	VWR, Darmstadt, D
Handschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
HybondTM-C Extra Nitrucellulose	Amersham Biosciences, Amersham, E
Inkubator (Bakterien) OV 3	Biometra, Göttingen, D
Inkubator (Zellkultur)	HERA cell, Heraeus, Hanau, D
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D
Kryomikrotom CM 1900	Leica, Bensheim, D
Kryoröhrchen (2 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D
Laborwaage PT 610	Sartorius, Göttingen, D
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar, D
Parafilm	American National CanTM, Chicago, USA
PCR-Tubes	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, A
Photometer	Bio Photomete, Eppendorf, Hamburg, D
Petrischalen	Tissue Culture Dish, Sarstedt, D
Pipetus® Standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Pipetten	Abimed HAT, Langenfeld, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Präparierbesteck	Aesulap, Tuttlingen, D
Quarzküvetten (220-1600nm)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäße	Sarstedt Inc., Newton, USA
RNase Zap-Tücher	Ambion®, Austin, USA
Röhrchen (Falcon)	BectonDickinson Labware, Franklin, USA
Schüttler	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D
Sterilbank	Heraeus, Hanau, D
Superfrost Plus Objektträger	Roth, Karlsruhe, D
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, D
Tissue Tek O.C.T.TM Compound	SAKURA Finetek Europe, Zoeterwoude, NL

Trockeneis	Apotheke Uniklinikum Ulm, D
Vortexer	Bender und Hobein, Zürich, CH
Wasserbad + Temperaturregler K 15 + C1	HAAKE, Vreden, D
Zentrifugen Suprafuge 22 + Megafuge 1.OR	Heraeus, Hanau, D
Zellkulturröhrchen (BD FalconTM)	BD Biosciences, Bedford, USA
Zellkulturröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturschalen (4-wells)	NunclonTM, Nunc, Denmark

Vektoren

pAAV-hrGFP	Stratagene, Amsterdam, NL
pAAV-IRES-hrGFP	Stratagene, Amsterdam, NL
pAAV-RC	Stratagene, Amsterdam, NL
pCR2.1-Topo	Invitrogen, Carlsbad, USA
pEGFP-N2	Clontech, Mountain View, USA
pHelper	Stratagene, Amsterdam, NL
pPCR-Skript-Amp-SK+	Stratgene, Amsterdam, NL

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines siRNA-Haarnadelkonstrukts

Am Anfang dieser Arbeit stand die Entwicklung eines einfach anwendbaren Vektors zur Generierung potenter siRNA. Dafür wurde ein siRNA-Haarnadelkonstrukt entworfen, das in jeden beliebigen Vektor kloniert werden kann. Der Aufbau des siRNA-Haarnadelkonstrukts wird im Folgenden erläutert:

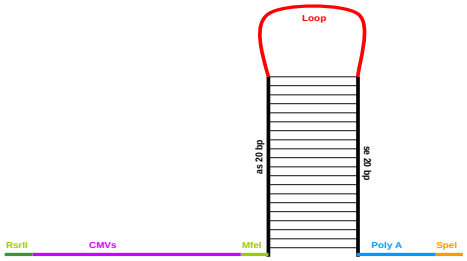

Abbildung 4: Aufbau des small-interfering RNA-Haarnadelkonstrukts

1. **Promotor (593 bp):** Um eine schnelle und sichere Transkription zu erzielen, wurde der CMV-Promotor verwendet. Die Promotorsequenz wurde so verkürzt (=CMVs), dass direkt im Anschluss das siRNA-Haarnadelkonstrukt abgelesen werden konnte [136]. Laut Literatur ist eine Verkürzung des CMV-Promotors auf 593 bp des sonst 662 bp langen Promotors ohne Funktionsverlust möglich [136]. Der Promotor CMVs wurde mittels PCR aus der CMV-Sequenz des Vektors pAAV-hrGFP gewonnen. Vor die Promotorsequenz wurde eine RsrII Schnittstelle eingefügt.
2. **Übergang (6 bp):** Es folgte eine MfeI Schnittstelle.
3. **Antisense siRNA-Sequenz (20 bp):** Die antisense siRNA-Sequenz war komplementär zu der ausgewählten 20 bp langen Nukleotidabfolge der „coding sequence“ des Proteins.
4. **Schleife (10 bp):** Die Schleife bestand aus der Nukleotidsequenz tga cag gaa g [53]. Hier trennte das Enzym RISC das siRNA-Haarnadelkonstrukt, so dass zwei einzelsträngige siRNA-Stränge entstanden.
5. **Sense siRNA-Sequenz (20 bp):** Die sense siRNA-Sequenz war homolog zu der ausgewählten 20 bp langen Nukleotidabfolge der „coding sequence“ des Proteins.
6. **Übergang (6 bp):** Es wurde die Schnittstelle SpeI eingefügt.

7. **Stoppcodon (6 bp):** Das Stoppsignal bestand aus der Nukleotidsequenz aat aaa [53].

In dieser Arbeit wurde die Expression folgender Proteine durch siRNA supprimiert:

- Zur Funktionsüberprüfung des siRNA-Haarnadelkonstrukts wurde die Expression des Proteins eGFP in Zellkultur unterdrückt. Die hierfür verwendete Sequenz lautete: GFP RNAi: ACA AGC TGG AGT ACA ACT AC
- Die Expression von ROCK wurde sowohl in Zellkultur als auch in RGZ in der lebenden Ratte supprimiert. Die hierfür verwendeten Sequenzen lauteten: RNAi ROCK1: ATG TCG ACT GGG GAC AGT TT, RNAi ROCK2: ATG CGC TAA CCA AAG ATA TT
- Die Expression von LINA wurde in Zellkultur supprimiert. Die hierfür verwendeten Sequenzen lauteten: RNAi LINA1: XXXXX, RNAi LINA2: XXXXX

3.1.0.32 Funktionalitätstestung des siRNA-Haarnadelkonstrukts

Zunächst wurde verifiziert, ob das siRNA-Haarnadelkonstrukt in einen Vektor eingebracht und dadurch die Expression eines Proteins unterdrückt werden konnte.
In Anlehnung an die Arbeit Xia et al. wurde auch in dieser Arbeit die Funktionsfähigkeit des Vektors durch die Expressionsunterdrückung des Proteins eGFP verifiziert [136]. Die in der Arbeit von Xia et al. verwendete siRNA-Sequenz wurde bei dieser Arbeit in den Vektor pPCR-Scrpit TM Amp SK+ eingefügt (Vektor RNAi GFP SK+) [136].
Der Versuchsansatz erforderte zwei Gruppen unterschiedlich behandelter Zellen (siehe 19, Transfektion Nr. 1): Bei der Kontrollgruppe wurden RGZ mit dem Kontrollvektor pPCR-Scrpit TM Amp SK+ transfiziert. Da der Vektor pPCR-Scrpit TM Amp SK+ keine Proteine kodierte, die unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren, wurde der Vektor GFP zur Kotransfektion hinzugegeben. Außer der Kodierung für das Protein GFP besitzt der Vektor keine weitere Funktion. In der Versuchsgruppe wurde das siRNA-Haarnadelkonstrukt des Proteins eGFP in das Plasmid pPCR-Scrpit TM Amp SK+ eingebracht (RNAi GFP SK+)(siehe Klonierungen 5, 2.) und RGZ mit diesem Vektor transfiziert. Auch hierbei erfolgte eine Kotransfektion mit dem Vektor GFP. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich Anzahl und Intensität der fluoreszierenden Zellen ausgewertet. In der folgenden Abbildung sind beispielhaft die eGFP-Expressionsunterschiede der einzelnen Gruppen dargestellt.
Die Auswertung ergab eine deutliche Abnahme der Anzahl fluoreszierender Zellen bei der Versuchsgruppe. Auch die Fluoreszenzintensität der Versuchsgruppe war geringer (vgl. Abbildung 5). Da die Anzahl der Zellen pro Kulturplatte und die Menge der

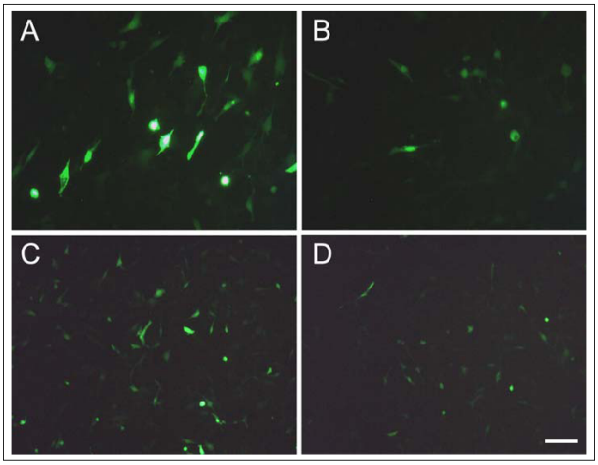

Abbildung 5: Photomontage der Zelllinie RGZ-5 zur Darstellung der Expressionshemmung des Proteins enhancend green fluorescence protein (eGFP): Small-interfering Ribonukleinsäure (siRNA) gegen das Protein eGFP führt auf der Zelllinie RGZ-5 (B+D) zu einer quantitativen und qualitativen Abnahme der Fluoreszenz.
A) Kontrollgruppe bei 40-facher Vergrößerung, B) Versuchsgruppe bei 40-facher Vergrößerung, C) Kontrollgruppe bei 20-facher Vergrößerung, D) Versuchsgruppe bei 20-facher Vergrößerung. Maßstabbalken A+B 25 μm, C+D 50 μm.

zur Transfektion verwendeten Plasmide bei beiden Ansätzen identisch waren, konnte das siRNA-Haarnadelkonstrukt als Ursache für die Reduktion der eGFP-Proteinmenge angesehen werden. Hieraus konnte geschlossen werden, dass das in dieser Arbeit entwickelte siRNA-Haarnadelkonstrukt funktionsfähig war.
Um das Ergebnis zu bekräftigen und um sicherzustellen, dass die Anzahl fluoreszierender Zellen von der Lipofektamintransfektion unabhängig war, wurde eine weitere Zelllinie (HEK 293-Zellen) mittels $CaCl_2$-Transfektion behandelt. Der Versuchsaufbau wurde analog des vorherigen Versuchs durchgeführt (siehe 20, 1. Ansatz). Auch hier war eine deutliche qualitativ und quantitativ verminderte Fluoreszenz des Proteins eGFP bei der Versuchsgruppe mit siRNA-Transfektion zu beobachten (Daten sind nicht abgebildet).
Erwartungsgemäß waren auch bei der Versuchsgruppe fluoreszierende Zellen zu erkennen. Das bedeutet, dass die Proteinexpression durch RNA-Interferenz in Zellen bei einer Versuchslaufzeit von 3 Tagen verringert, jedoch nicht komplett inhibiert wurde. Entsprechend aktueller Publikationen ist die Expressionshemmung eines Proteins durch RNA-Interferenz von der Umsatzrate des Proteins, von der eingesetzten siRNA-Nukleotidsequenz und von der Konzentration der siRNA abhängig [67, 11].

3.2 Einfluss der Expressionsunterdrückung der Kinase ROCK (RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase) auf das neuritogene Wachstumsverhalten in Zellkultur

3.2.0.33 Auswirkung der Expressionsunterdrückung von ROCK unter Verwendung des SK+-Vektors

Bei dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit das Neuritenwachstum durch Expressionsunterdrückung eines regenerationsinhibitorischen Proteins gesteigert werden kann. Für diese Arbeit wurde das Protein ROCK1 gewählt, das an der Regenerationsinhibition im ZNS maßgeblich beteiligt ist (siehe Einleitung). Nach einer Verletzung im ZNS führt ROCK zur Induktion des Wachstumskegelskollaps und zur Förderung der Narbenbildung und der Apoptose. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die ROCK-Inhibition durch das Pyridinderivat Y-27632 zu einer deutlichen axonalen Wachstumssteigerung führte [4, 32, 45]. Auch die ADP-Ribosyl-Transferase C3, ein irreversibler RhoA-Inaktivator, hatte entsprechende Effekte auf verletzte Nervenzellen [34, 32]. Wie in der Einleitung erläutert ist die Anwendung beider Substrate jedoch mit diversen Schwierigkeiten verbunden. Dementsprechend sollte in dieser Arbeit die Expression von ROCK mit Hilfe der Technik der RNA-Interferenz unterdrückt werden, um vergleichbare wachstumsfördernde Effekte hervorzurufen und die bestehenden Schwierigkeiten zu umgehen.

Die 4501 bp lange „coding sequence“ des ROCK-Gens diente als Vorlage, um eine 20 bp lange siRNA-Sequenz zu entwerfen. Für das erste siRNA-Konstrukt wurde die Nukleotidsequenz 110-129 der „coding sequence“ und für das zweite Konstrukt die Nukleotidsequenz 2946-2965 der „coding sequence“ gewählt. Diese Sequenzen wurden per Zufall bestimmt und in den Vektor pPCR-Script TM Amp SK+ kloniert (siehe 5, 3. Klonierung).

Zur Beantwortung der Frage, ob die Expressionsunterdrückung von ROCK in Zellkultur zu einem gesteigerten Neuritenwachstum führte, wurden drei Gruppen unterschiedlich behandelter PC-12 Zellen verglichen: Bei der Kontrollgruppe wurden PC-12 Zellen mit dem Kontrollvektor (pPCR-Scrpit TM Amp SK+) transfiziert (siehe 19, Transfektion Nr. 2). Bei der ersten Versuchsgruppe wurden die PC-12 Zellen mit dem Vektor RNAi ROCK1 SK+, in den die RNA-Interferenz der „coding sequence“ 110-129 kloniert worden war, transfiziert. Bei der zweiten Versuchsgruppe wurde die Nukleo-

tidsequenz 2946-2965 der „coding sequence“ verwendet (RNAi ROCK2 SK+). Alle drei Gruppen erhielten eine Kotransfektion mit dem Vektor GFP. Zur Stimulation des Neuritenwachstums wurden die PC-12 Zellen mit dem Neurotrophin *nerve growth factor* (Endkonzentration 50 μM) behandelt. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen bezüglich des längsten Neuriten, der Anzahl der Neuriten pro Zelle und der Anzahl der Zellkerne fluoreszensmikroskopisch ausgewertet. Die entsprechenden Durchschnittswerte der Anzahl an PC-12 Zellen mit Neuriten länger $40\mu m$ sind für jede Gruppe in dem folgenden Diagramm dargestellt (Abbildung 6).

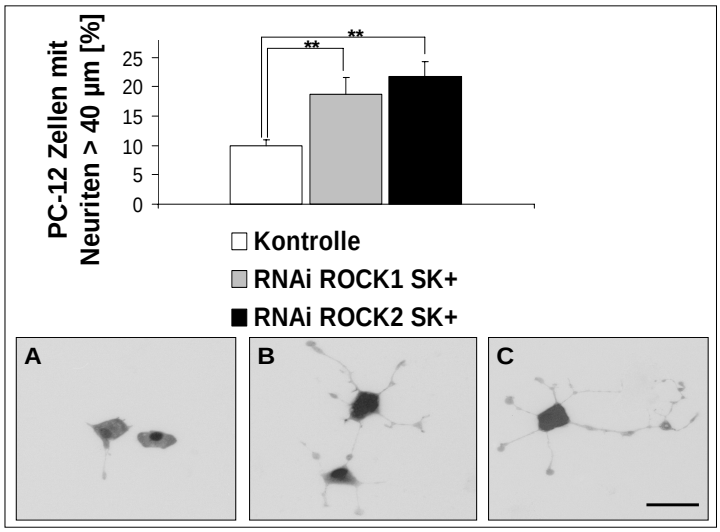

Abbildung 6: Auswirkung der Expressionshemmung der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK) auf die Neuritogenese unter Verwendung von SK+-Vektoren: Abgebildet ist im Diagramm die gemittelte Anzahl an Zellen (Zelllinie PC-12), die Neuriten länger 40 μm ausbilden in Prozent. Darunter sind beispielhaft die Zellmorphologien der einzelnen Gruppen abgebildet. A) Kontrollgruppe, B) Zellen nach Transfektion mit RNAi ROCK1 SK+, C) Zellen nach Transfektion mit RNAi ROCK2 SK+ (Vergrößerung: 40-fach). ** impliziert eine Signifikanz von p<0,01. Der Maßstabbalken entspricht $25\mu m$.
Die Expressionshemmung von ROCK führte zu einer deutlichen Wachstumssteigerung der Neuriten (Abbildung B+C, im Diagramm die Gruppen RNAi ROCK SK+). Der Vektor RNAi ROCK2 SK+ steigerte das Neuritenwachstum effektiver als der Vektor RNAi ROCK1 SK+.

Die Anzahl an PC-12 Zellen, die Neuriten größer $40\mu m$ ausbildeten, verdoppelte sich bei der ersten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der zweiten Versuchsgruppe steigerte sich das Neuritenwachstum um fast das 2,5-fache. Wie in der Abbildung 6 verdeutlicht waren auffällige Unterschiede auch unter morphologischen Gesichtspunkten zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe zu erkennen. Bei der Versuchsgruppe zeigten die PC-12 Zellen längere Neuriten teils mit mehreren Verzweigungen. Eine Zelle besaß dabei meist mehrere Neuriten und der Zellkörper war polygonaler. Bei der Kontrollgruppe war der Zellkörper rundlicher mit weniger Fortsätzen. Es kam fast nie zur Ausbildung eines langen Neuriten.

Hinsichtlich der Neuritenzahl pro Zelle und hinsichtlich der Zellkernanzahl ergaben sich zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass die Applikation des siRNA-Haarnadelkonstrukts zu einer Wachstumssteigerung führte. Es ist anzunehmen, dass die Expression des Proteins ROCK verringert und dadurch die neuritogenen Effekte hervorgerufen wurden.

Da die Nukleotidsequenzen für das siRNA-Haarnadelkonstrukt zufällig gewählt wurden, funktionieren erwartungsgemäß nicht alle Sequenzen gleich gut. Da die zweite Versuchsgruppe das axonale Wachstum stärker verbesserte, ist davon auszugehen, dass durch das zweite siRNA-Haarnadelkonstrukt die Expression des Proteins ROCK effektiver unterdrückt wurde. Für alle folgenden Versuche wurde deswegen nur noch das zweite siRNA-Haarnadelkonstrukt (RNAi ROCK2 SK+) verwendet.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde angewandt, um den Einfluß der RNA-Interferenz auf das Neuritenwachstum RGZ-5 in Zellkultur zu ermitteln. Auch diese Auswertung ergab ein verbessertes axonales Wachstum ähnlich der PC-12 Zellen bei den Gruppen, die mit einem siRNA-Haarnadelkonstrukt für das Protein ROCK transfiziert worden waren (Daten sind nicht abgebildet).

3.2.0.34 Semiquantitative Bestimmung der Expressionsrate von ROCK

Um zu bestätigen, dass die durch RNA-Interferenz hervorgerufene axonale Wachstumssteigerung tatsächlich auf der Expressionshemmung von ROCK beruhte, wurde im nächsten Schritt die ROCK-RNA-Menge der drei Versuchsgruppen drei Tage nach Transfektion mittels RT-PCR semiquantitativ bestimmt. Die drei Gruppen wurden entsprechend dem vorherigen Versuch angesetzt, die RNA der einzelnen Gruppen isoliert, cDNA hergestellt und diese zur RT-PCR verwendet. Die RT-PCR Produkte wurden nach 19, 22, 25 und 27 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Protein GAPDH diente dabei als Referenzgen. Die Kontrollgruppe wies stets die stärkste Bande des Proteins ROCK auf. Die Versuchsgruppen zeigten stets schwächere Banden, so dass die Wirkung der RNA-Interferenz als spezifischer Effekt der Expressionshemmung angesehen werden konnte. Die Bande des Referenzgens GAPDH war bei allen drei Gruppen annähernd gleich stark (vgl. Abbildung 7). Mit diesem Ergebnis konnte bestätigt werden, dass die Zugabe von siRNA zu einer Reduktion der ROCK-Expression führte.

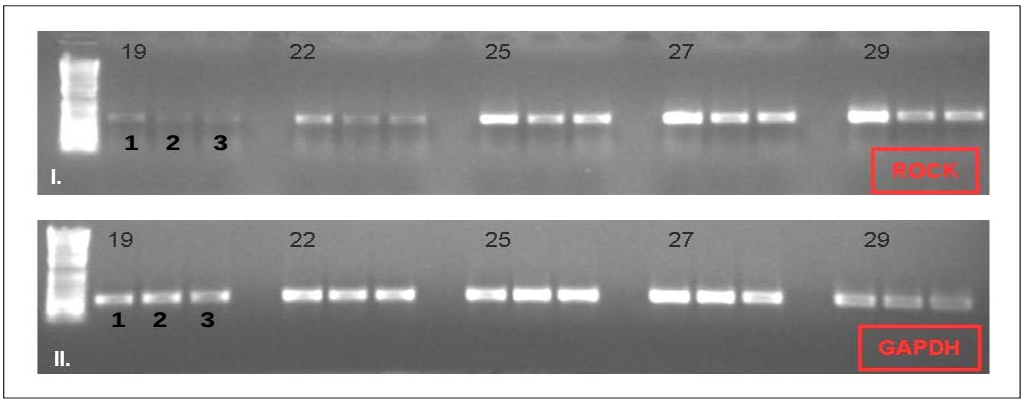

Abbildung 7: Semiquantitative Bestimmung der Expressionsrate der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK) in Zellen (Zelllinie PC-12): Dargestellt ist ein Agarose-Gel, auf welches amplifizierte *complementary* Desoxyribonukleinsäure zu unterschiedlichen Polymerasekettenreaktions-Zyklen aufgetragen wurde. Auf dem oberen Gel (I.) ist die Bande von ROCK bei ca. 500 Basenpaaren (bp) abgebildet, auf dem unteren Gel (II.) die Bande des Referenzgens GAPDH bei 300 bp. Die erste Spalte (1) zeigt die Kontrollgruppe, die zweite Spalte (2) die erste Versuchsgruppe (RNAi ROCK1 SK+) und die dritte Spalte (3) die zweite Versuchsgruppe (RNAi ROCK2 SK+). Die Kontrollgruppe besaß stets die stärkste ROCK-Bande, das Referenzgen war bei allen drei Gruppen vergleichbar. Somit reduzierte die Zugabe von *small-interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) die ROCK-Expressionsmenge.

3.2.0.35 Einfluß der Expressionshemmung von ROCK auf die Neuritogenese unter Verwendung des Vektors pAAV-hrGFP

Nachdem die Funktionalität und Effektivität der RNA-Interferenz auf die Expressionsunterdrückung von ROCK verifiziert worden war, wurde das siRNA-Haarnadelkonstrukt in den Vektor pAAV-hrGFP eingebracht. Dieser Vektor besitzt den Vorteil, das stark fluoreszierende Protein hrGFP zu produzieren und Adeno-Assoziierte-Viren 2 herstellen zu können. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der gerichteten Mutagenese zwei neue Schnittstellen in den Vektor pAAV-hrGFP eingefügt (EcorV und SpeI), das siRNA-Konstrukt ROCK2 wurde aus dem Vektor pPCR-Scrpit TM Amp SK+ gewonnen und in den Vektor pAAV-hrGFP kloniert (RNAi ROCK)(siehe 5, 5. Klonierung). Für dieses Experiment wurden bei der Versuchsgruppe PC-12 Zellen mit dem siRNA kodierenden Vektor RNAi ROCK und bei der Kontrollgruppe mit dem Kontrollvektor (pAAV-hrGFP) transfiziert. Da der Vektor pAAV-hrGFP ein fluoreszierendes Protein kodierte, musste keine Kontransfektion mit dem Vektor GFP erfolgen. Zur Stimulation des Neuritenwachstums wurden die PC-12 Zellen mit dem Neurotrophin NGF (Endkonzentration 50 μM) behandelt. Entsprechend der Auswertung des vorherigen Experiments ergab auch die Auswertung in diesem Fall 3 Tage nach Transfektion ein verbessertes Neuritenwachstum bei der Versuchsgruppe um ungefähr das Zweifache.

Die erhaltenen Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen sind im Diagramm abgebildet (Abbildung 8).

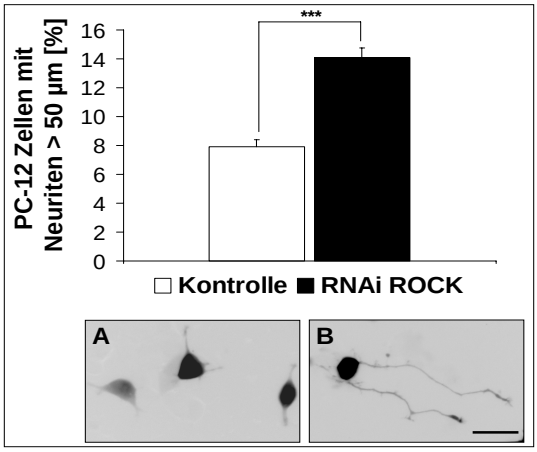

Abbildung 8: Auswirkung der Expressionshemmung der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK) auf die Neuritogenese unter Verwendung von pAAV-hrGFP Vektoren: Dargestellt ist im Diagramm die gemittelte Anzahl an Zellen (Zelllinie PC-12), die Neuriten länger als 50 μm ausbilden in Prozent. Darunter sind beispielhaft die Zellmorphologien der einzelnen Gruppen abgebildet. A) Kontrollgruppe (pAAV-hrGFP), B) Versuchsgruppe (RNAi ROCK). Signifikanz: ***p<0,001. Der Maßstabbalken entspricht 25μm.
Nach ROCK-Expressionshemmung durch *small interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) werden in der Versuchsgruppe deutlich längere Neuriten ausgebildet als in der Kontrollgruppe.

Werden die Anzahl der langen Neuriten der pAAV-hrGFP Vektoren mit der Anzahl der langen Neuriten der SK+ Vektoren verglichen, so besitzen die pAAV-Vektoren sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Versuchsgruppe längere Axone. Dies ist dadurch erklärbar, dass unterschiedliche GFP-Proteine verwendet wurden. Das Protein hrGFP erzeugt laut Literatur eine um das 2,5-fache stärkere Fluoreszenz als das Protein eGFP, so dass unter Verwendung des Proteins hrGFP filigraphere Ausläufer erkennbar sind und ausgewertet werden können (123). Mit diesem Ergebnis konnte die Beobachtung des vorherigen Versuchs und die Funktionalität des Plasmids bestätigt werden, denn auch hier führte die ROCK-Expressionshemmung zu einem deutlich verbesserten Neuritenwachstum. Durch Koexpression des Proteins hrGFP können alle transfizierten Zellen direkt bestimmt werden.

3.2.0.36 Auswirkung der Expressionshemmung von ROCK auf die Neuritogenese unter dem Einfluss von Myelin

Das Protein ROCK wird nach einer Verletzung im ZNS unter anderem durch Myelininhibitoren aktiviert und induziert daraufhin den Kollaps des Wachstumskegels (siehe Einleitung).

Um auch in Zellkultur eine vergleichbare inhibitorische Umgebung zu simulieren, wurden die Kulturplatten mit Myelin beschichtet und die Auswirkungen der ROCK-Expressionshemmung auf das Neuritenwachstum auf Myelin untersucht.
Zunächst wurde mittels einer Verdünnungsreihe die für PC-12 Zellen geeignete Myelinkonzentration bestimmt. Eine Konzentration von 1:40 erwies sich als geeignet, da bei einer zu starken Verdünnung (1:100) die Zellen keine wesentliche Morphologieänderung aufwiesen und bei einer zu geringen Verdünnung (1:10) jegliches Neuritenwachstum verhindert wurde. In allen folgenden Experimenten wurde somit die Verdünnung 1:40 eingesetzt.

Für dieses Experiment wurden zwei Gruppen gebildet, wobei das Experiment mit PC-12 Zellen auf Myelin- und gleichzeitig auf PLL-beschichteten Kulturplatten durchgeführt wurde. Die Kontrollgruppe enthielt das Kontrollplasmid pAAV-hrGFP, die Versuchsgruppe enthielt siRNA für das Protein ROCK (Plasmid RNAi ROCK). Zur Stimulation des Neuritenwachstums wurden die PC-12 Zellen mit dem Neurotrophin *NGF* behandelt. Die Anzahl an PC-12 Zellen mit Neuriten länger als $50\mu m$ wurde 3 Tage nach Transfektion fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Die entsprechenden Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen sind in dem folgenden Diagramm zusammengestellt (siehe Abbildung 9).
Bei den Kontrollgruppen wurde durch die Myelinbeschichtung das axonale Wachstum für Neuriten länger als $50\mu m$ um das 7-fache reduziert verglichen mit dem axonalen Wachstum auf PLL. Morphologisch war die Myelinwirkung daran zu erkennen, dass die PC-12 Zellen kaum Neuriten ausbildeten und der Durchmesser des Zellkörpers etwas kleiner war.
Bei den Versuchsgruppen ergab sich hinsichtlich der absoluten Anzahl an PC-12 Zellen, die Neuriten länger als $50\mu m$ ausbildeten, auf Myelin und auf PLL keine signifikanten Unterschiede. Jedoch zeigte der relative Vergleich der Kontroll- und Versuchsgruppe auf Myelin eine deutliche Zunahme der PC-12 Zellen mit langen Neuriten um das 14-fache. Diese Erhöhung war hoch signifikant ($p<0{,}001$). Im Vergleich dazu erhöhte die Versuchsgruppe auf PLL die Anzahl an PC-12 Zellen mit langen Neuriten nur um das 2-fache verglichen mit der Kontrollgruppe auf PLL ($p<0{,}001$). Dieser Befund verdeutlichte den wachstumssteigernden Effekt der ROCK-Expressionshemmung, der erwartungsgemäß v.a. auf inhibitorischem Substrat eine deutliche Steigerung des axonalen Wachstums erzielte. Durch ROCK-Expressionshemmung konnten inhibitorische Signalwege überwunden werden.

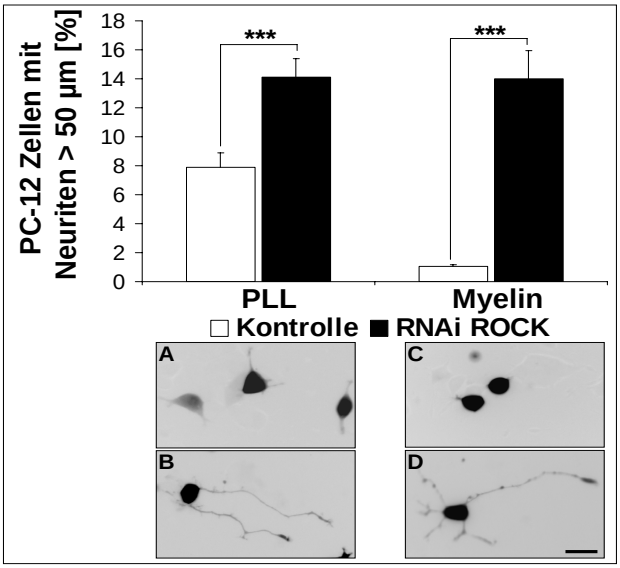

Abbildung 9: Einfluss von Myelins auf das axonale Wachstumsverhalten sowohl bei der Versuchsgruppe (Expressionshemmung der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK)) als auch bei der Kontrollgruppe: Dargestellt ist im Diagramm die gemittelte Anzahl an Zellen (Zelllinie PC-12), die ein Axon länger als $50\mu m$ ausbilden in %. Veranschaulicht werden im linken Diagramm die Durchschnittswerte auf regenerationspermissivem Substrat (Poly-L-Lysin, PLL), im rechten Digramm auf regenerationsinhibitorischem Substrat (Myelin). Darunter sind die Zellmorphologien der einzelnen Gruppen beispielhaft abgebildet. A) Kontrollgruppe auf Poly-L-Lysin, B) Versuchsgruppe auf Poly-L-Lysin, C) Kontrollgruppe auf Myelin, D) Versuchsgruppe auf Myelin. Signifikanz: ***p<0,001. Der Maßstabbalken entspricht $25\mu m$.
Auf Poly-L-Lysin führte die ROCK-Expressionshemmung zu einer Wachstumssteigerung um den Faktor 2, auf Myelin zu einer Wachstumssteigerung um den Faktor 14.

3.3 Einfluss der Expressionsunterdrückung der Kinase ROCK auf das neuritogene Wachstumsverhalten *in vivo*

3.3.0.37 Applikation des siRNA-Haarnadelkonstrukts tragenden Vektors in die retinalen Ganglienzellen einer Ratte mittels AAV-2

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Expressionshemmung des Proteins ROCK auch *in vivo* das axonale Wachstum steigern konnte. Fremde DNA (hier das siRNA-Haarnadelkonstrukt) sollte mit Hilfe von Adeno-Assoziierten-Viren 2 als Transportvehikel in retinale Ganglienzellen der Ratte eingebracht werden. Adeno-Assoziierte-Viren 2 sollten dafür in den Glaskörper injiziert werden.
Die nächsten Schritte bestanden daher in der Produktion und Funktionstestung eines

geeigneten Virus. Die Ergebnisse von Vorversuchen ergaben, dass das in dieser Arbeit eingesetzte Plasmid (RNAi ROCK) mit den Helferplasmiden pAAV-RC und pHelper zwar zur Produktion funktionstüchtiger Adeno-Assoziierter-Viren 2 geeignet war, der Virustiter für den hier vorgesehenen Zweck jedoch nicht ausreichend aufkonzentriert werden konnte. (Da die Aufnahmekapazität des Glaskörpers auf Grund anatomischer Gegebenheiten begrenzt ist, musste ein Virus mit hohem Titer verwendet werden, um in der Ratte möglichst viele Ganglienzellen einer Retina transfizieren zu können.)

Erst nach Klonierung des siRNA-Haarnadelkonstrukts zusammen mit dem Protein hrGPF, das zur Detektion infizierter Zellen notwendig war, in einen „neuen“ Vektor (pAAV-M2-IGFP), konnte ein hoch konzentriertes Virus produziert werden. Es entstand der Vektor KombiPlasmid (siehe Anhang). Der Aufbau des Vektors KombiPlasmid ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 10).

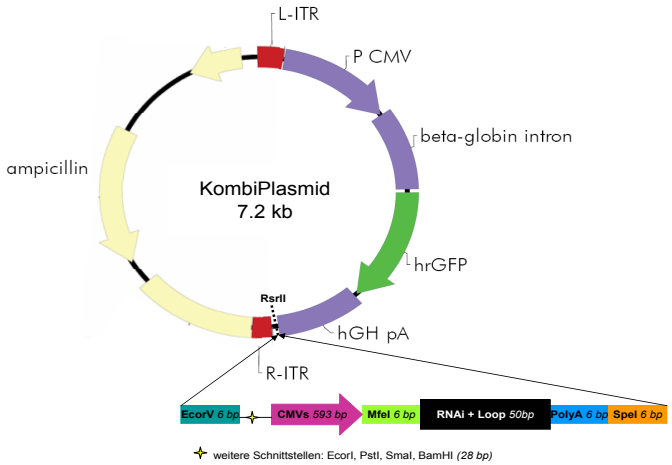

Abbildung 10: Schematischer Aufbau des KombiVektor

Funktionstestung des KombiPlasmids: Analog zum vorherigen Versuch (siehe 3.2.0.36) wurde die Effektivität des neu klonierten KombiPlasmids auf das Neuritenwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu dem zuvor verwendeten Vektor (RNAi ROCK) in PC-12 Zellen auf myelinbeschichteten Platten und gleichzeitig auf PLL-beschichteten Platten bestimmt. Erwartungsgemäß führte auch hier die Transfektion mit dem neu klonierten Plasmid zu einer Steigerung des axonalen Wachstums, die dabei auf myelinbeschichteten und PLL-beschichteten Platten mit den Werten des Plasmids RNAi ROCK vergleichbar war (Daten sind nicht abgebildet).
Im Folgenden konnte mit diesem Vektor (KombiPlasmid) ein hoch konzentriertes Adeno-Assoziiertes-Virus 2 hergestellt und in den Glaskörper einer Ratte injiziert werden.
In einem Vorversuch wurde die erfolgreiche Integration und konstante Expression der durch AAV-2 eingeschleußten DNA in retinalen Ganglienzellen der Ratte verifiziert.

Dafür wurden die Retinae von den Versuchstieren (n=2) sieben Wochen nach Virusinjektion und zwei Wochen nach Axotomie und Linsenverletzung ausgewertet. Die infizierten Zellen einer Retina konnten durch Koexpression des Proteins hrGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Ein erstes Ergebnis zeigte eine Infektion der meisten retinalen Ganglienzellen. Nur wenig andere Zellen der Retina, wie Amakrin-Zellen oder bipolare Zellen, waren fluoreszenzmikroskopisch erkennbar (Abbildung 11).

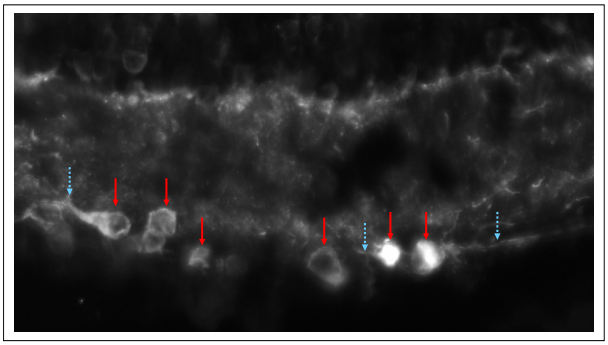

Abbildung 11: Photomontage einer mit dem Vektor KombiPlasmid (Expressionshemmung der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK)) infizierten Retina einer Ratte: Dargestellt ist die Retina einer Ratte 7 Wochen nach Virusinjektion und 2 Wochen nach Linsenverletzung und Sehnervquetschung. Durch die Koexpression des Reporterproteins humanized Renilla reniformis green fluorescence protein (hrGFP) ist ein direkter Nachweis transfizierter Zellen möglich. Die hellen, fluoreszierenden Zellen stellen infizierte retinale Ganglienzellen dar (rote Pfeile). Die blauen Pfeile markieren Axone dieser retinalen Ganglienzellen. GZS=Ganglienzellschicht, IPS=innere plexiforme Schicht, INS=innere nukleäre Schicht, OPS=äußere plexiforme Schicht, ONS= äußere nukleäre Schicht. Vergrößerung: 40-fach. Der Maßstabbalken entspricht $50\mu m$.

Zusätzlich wurden die Schnitte mit der Antikörperfärbung βIII-Tubulin zur spezifischen Darstellung retinaler Ganglienzellen immunhistochemisch gefärbt. Durch βIII-Tubulin-Färbung waren die gleichen Zellen wie unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar, jedoch waren unter der Antikörperfärbung etwas mehr Zellen nachweisbar.
Dieser Befund weißt nach, dass eine konstante Expression der durch Viren eingebrachten DNA in retinale Ganglienzellen der Ratte möglich ist und dass die meisten der RGZ durch das Adeno-Assoziierte-Virus 2 infiziert werden.

3.3.0.38 Quantitative Bestimmung der Auswirkung der ROCK-Expressionshemmung *in vivo*

Im nächsten Versuch sollten die Auswirkungen der ROCK-Expressionshemmung auf verletzte retinale Ganglienzellen der Ratte quantitativ (hinsichtlich Anzahl der RGZ sowie Anzahl und Länge der regenerierenden Axone) ermittelt werden.
Zu diesem Zweck wurden 3 Gruppen gebildet: Bei den Versuchstieren der ersten Gruppe (n=2) wurden Axotomie und Linsenverletzung fünf Wochen nach Virusinjektion in den Glaskörper durchgeführt, bei der zweiten Versuchsgruppe (n=2) sieben Wochen danach. Als Kontrolle dienten Ratten (n=2), die statt Viruseluat 1xPBS in den Glaskörper injiziert bekommen hatten. Bei den Kontrolltieren wurde die Axotomie und die Linsenverletzung fünf Wochen nach PBS-Injektion durchgeführt. Bei allen 3 Gruppen wurden die Augen zwei Wochen nach Linsenverletzung entnommen und Kryostatschnitte der Retina angefertigt. Es erfolgte eine Antikörperfärbung mit βIII-Tubulin zur Darstellung retinaler Ganglienzellen und eine Antikörperfärbung mit GAP-43 zur Darstellung regenerierender Axone. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Anzahl der RGZ und die Anzahl regenerierender Axone 0,25 mm und 0,5 mm distal der Läsionsstelle bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse der Anzahl regenerierender Axone sind im Diagramm 12 dargestellt.

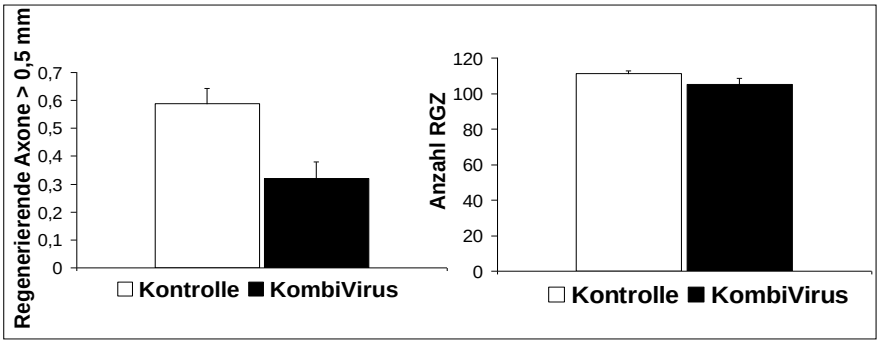

Abbildung 12: Auswirkungen der Expressionshemmung der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK) auf das axonale Wachstum *in vivo*: Linkes Diagramm: Veranschaulicht wird hier die gemittelte Anzahl der Axone, die mehr als 0,5 mm distal der Läsionsstelle regenerieren (2 Wochen nach Axotomie und nach Linsenverletzung, 7 bzw. 9 Wochen nach Virusinjektion). Die Applikation von ROCK-small-interfering-Ribonukleinsäure (siRNA) produzierender Adeno-Assoziierter-Viren-2 reduzierte nach 7 bzw. 9 Wochen die Anzahl regenerierender Axone.
Rechtes Diagramm: Abgebildet ist die Anzahl retinaler Ganglienzellen (RGZ) pro Retina. Die Applikation von ROCK-siRNA-produzierender Adeno-Assoziierter-Viren-2 reduzierte die Anzahl retinaler Ganglienzellen um 5%. Auf Grund der geringen Anzahl an Versuchstieren ist die Signifikanzberechnung nicht aussagekräftig.

Da die Auswertung der beiden Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied ergab, wurden beide Versuchsgruppen zusammengefasst. Tendenziell waren jedoch die Durchschnittswerte bei der Gruppe nach neun Wochen etwas geringer als bei der Gruppe nach sieben Wochen. Hinsichtlich der Anzahl RGZ war die Gesamtzahl bei der Versuchsgruppe um 5% reduziert (Abbildung 12). Dies bedeutet, dass entweder die Anwesenheit des siRNA-Haarnadelkonstrukts in RGZ oder die Expressionhemmung von ROCK zu einem Verlust RGZ führte (siehe Diskussion). Deutliche Unterschiede waren bei den beiden Gruppen auch in Hinblick auf die Anzahl regenerierender Axone feststellbar. Die Anzahl der Axone, die mindestens 0,25 mm regenerierten, war bei der Versuchsgruppe um das 3-fache geringer als bei der Kontrollgruppe. Die Anzahl an Axone, die mindestens 0,5 mm distal der Läsionsstelle regenerieren konnten, war um etwa die Hälfte geringer als bei der Kontrollgruppe. Aus dieser Studie lässt sich ableiten, dass die Expressionshemmung von ROCK, die durch siRNA-Haarnadelkonstrukte erfolgte, in RGZ der Ratte im Gegensatz zu den Ergebnissen in Zellkultur stand. Die ROCK-Expressionshemmung ruft *in vivo* eine Reduktion überlebender RGZ und eine Reduktion regenerierender Axone hervor, (zumindest bei einer Versuchsauswertung sieben bzw. neun Wochen nach Einbringen von siRNA-Haarnadelkonstrukten).

3.4 Charakterisierung des Proteins LINA (lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity)

3.4.0.39 Auswirkungen der Myelininhibitoren auf LINA

Das Protein LINA gehört zu einer Gruppe von Proteinen, deren Expression in einem regenerativen Status hochreguliert wird (Daten sind noch nicht veröffentlicht).
Da dieses Protein erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entdeckt worden ist, liegen zu Beginn dieser Doktorarbeit nur wenig Informationen über das Protein vor. Aus anderen Arbeiten in unserem Arbeitskreis ist u.a. bekannt, dass PC-12 Zellen mit der überexprimierten Form von LINA transfiziert werden können und dass die Überexpression des Proteins in Zellkultur in PC-12 Zellen zu einer Steigerung des Neuritenwachstums führte. Inwiefern dieses Protein bzw. die überexprimierte Form dieses Proteins durch das Vorhandensein von Myelininhibitoren beeinflussbar ist, sollte im nachfolgenden Experiment untersucht werden:
Zur Klärung dieser Frage wurden zwei Gruppen gebildet, die analog zu den Experimenten mit ROCK einmal mit PC-12 Zellen auf myelinbeschichteten Platten und einmal mit PC-12 Zellen auf PLL-beschichteten Platten angesetzt wurden. Durch Klonierung der „coding sequence“ von LINA in das Parenteralplasmid pAAV-IRES-hrGFP (Stra-

tagene) entstand ein Vektor, der das Protein LINA überexprimieren konnte (LINA-IRES). Die Versuchsgruppe erhielt eine Lipofektamintransfektion mit LINA-IRES, die Kontrollgruppe erhielt den Kontrollvektor pAAV-IRES-hrGFP. Zur Stimulation des Neuritenwachstums wurden die PC-12 Zellen mit dem Neurotrophin *NGF* (Endkonzentration 50 μM) behandelt. Die Auswertung erfolgte wie üblich 3 Tage nach Transfektion über die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des längsten Neuriten einer Zelle. Die entsprechenden Durchschnittswerte an PC-12 Zellen mit langen Neuriten sind für jede Gruppe im folgenden Diagramm dargestellt (Abbildung 13).

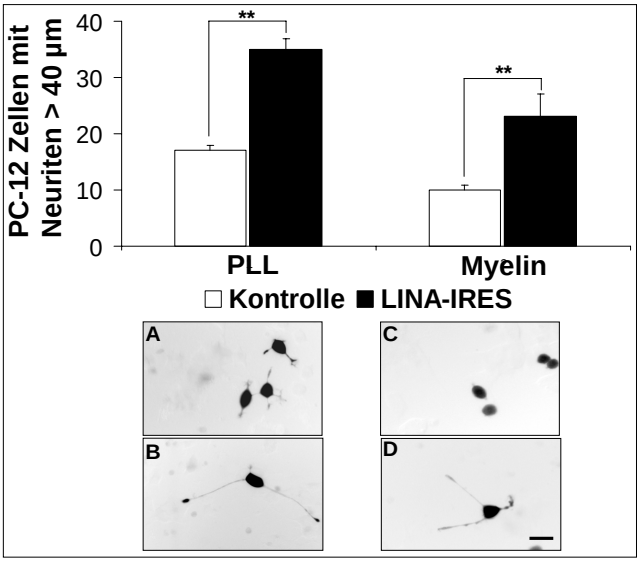

Abbildung 13: Auswirkung der Überexpression des Proteins lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity (LINA) auf das Neuritenwachstum auf regenerationspermissivem und -hemmendem Substrat: Abgebildet ist im Diagramm die gemittelte Anzahl an Zellen (Zelllinie PC-12), die Neuriten länger als 40 μm ausbilden in %, auf Poly-L-Lysin (PLL) und auf Myelin. Veranschaulicht werden im linken Diagramm die Durchschnittswerte auf PLL, im rechten Diagramm auf Myelin. Darunter sind beispielhaft die Zellmorphologien der einzelnen Gruppen abgebildet. A) Kontrollgruppe auf PLL, B) Versuchsgruppe (Vektor LINA-IRES: Überexpression von LINA) auf PLL, C) Kontrollgruppe auf Myelin, D) Versuchsgruppe auf Myelin. Signifikanz: **p<0,01. Der Maßstabbalken entspricht 25 μm.
Die Überexpression von LINA führte auf PLL und Myelin zu einer axonalen Wachstumssteigerung um den Faktor 2. Myelin hat somit keinen Einfluss auf die Wachstumssteigerung, die durch Überexpression von LINA induziert wird.

Es zeigte sich, dass die Überexpression des Proteins LINA zu einer neuritogenen Wachstumssteigerung führte. Die Anzahl an PC-12 Zellen mit Neuriten länger 40 μm konnte verdoppelt werden. Zwar reduzierte Myelin die Länge der Neuriten bei Versuchs- und Kontrollgruppe im Vergleich zu beiden Gruppen auf PLL, jedoch war der relative Wert, der die Wachstumssteigerung angibt, mit ungefähr dem Faktor zwei konstant. Die Wachstumssteigerung war damit vom Myelineffekt unabhängig. Dieser Befund legt

nahe, dass die durch Überexpression von LINA hervorgerufene, regenerationsfördernde Wirkung nicht zu einer Desensibilisierung gegenüber Myelin führte, sondern durch die Steigerung des Neuritenwachstums begründet ist.

3.4.0.40 Auswirkungen der Expressionshemmung von LINA

Durch die Herstellung eines siRNA-Haarnadelkonstrukts für das Protein LINA sollte erstens überprüft werden, ob dieses Protein immer in einer Zelle vorhanden ist und zweitens, welche Effekte durch die Expressionshemmung hervorgerufen werden. (Dieser Frage wurde nachgegangen, bevor ein Antikörper für das Protein LINA zur Verfügung stand.) Es wurden zwei siRNA-Nukleotidsequenzen für das Protein LINA entworfen und mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Stratagene) die Vektoren RNAi LINA 1 bzw. RNAi LINA 2 kloniert (siehe 5, Klonierung Nr.3).
Um die Auswirkungen der siRNA-Haarnadelkonstrukte zu ermitteln, wurden PC-12 Zellen mit vier Gruppen transfiziert: Die erste Gruppe war die Kontrollgruppe, bei der die PC-12 Zellen mit dem Kontrollvektor (TOPO TA Vektor) transfiziert wurden. Die zweite Gruppe erhielt eine Transfektion mit dem Vektor mit der ersten siRNA-Nukleotidsequenz (RNAi LINA 1), die dritte Gruppe erhielt den Vektor mit der zweiten siRNA-Nukleotidsequenz (RNAi LINA 2). Da die Plasmide der drei Gruppen kein fluoreszenzmikroskopisch erkennbares Protein exprimierten, wurden die drei Gruppen mit dem Vektor GFP kotransfiziert. Bei der vierten Gruppe wurde -wie im vorherigen Experiment- LINA-IRES zugegeben. Zur Stimulation des Neuritenwachstums erhielten die PC-12 Zellen den Wachstumsfaktor NGF. Die PC-12 Zellen wurden nach 2 und nach 3 Tagen fluoreszenzmikroskopisch nach den in dieser Arbeit üblichen Aspekten ausgewertet. Die entsprechenden Durchschnittswerte für die jeweiligen Gruppen sind im folgenden Diagramm dargestellt (Abbildung 14).
Hinsichtlich der Anzahl an PC-12 Zellen mit lang auswachsenden Axonen ergaben sich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit RNAi LINA1 transfiziert worden war, keine signifikanten Unterschiede. Auch unter morphologischen Gesichtspunkten waren sich beide sehr ähnlich. Die Zellen wiesen wenige Fortsätze auf und bildeten nur vereinzelt längere Fortsätze. Im Vergleich dazu zeigte die Gruppe, die mit RNAi LINA2 transfiziert worden war, eine deutliche Abnahme an Zellen mit Neuriten länger als 40 μm. Der hier ermittelte Wert war nach 2 Tagen um das vierfache ($p<0,01$) und nach 3 Tagen um das zweifache erniedrigt ($p<0,01$). Auffällige Unterschiede waren auch unter morphologischen Gesichtspunkten zu erkennen. Die Zellkörper waren kleiner und besaßen nur wenige Fortsätze und bildeten keine langen Neuriten aus (Abbildung 14). Erwartungsgemäß erhöhte die Überexpression von LINA die Anzahl an PC-12 Zellen mit Neuriten länger als 40 μm. Nach 2 Tagen wurde eine Wachstumssteigerung um den Faktor 2,5 ($p<0,05$) und nach 3 Tagen um den Faktor 3,5 hervorgerufen ($p<0,001$).

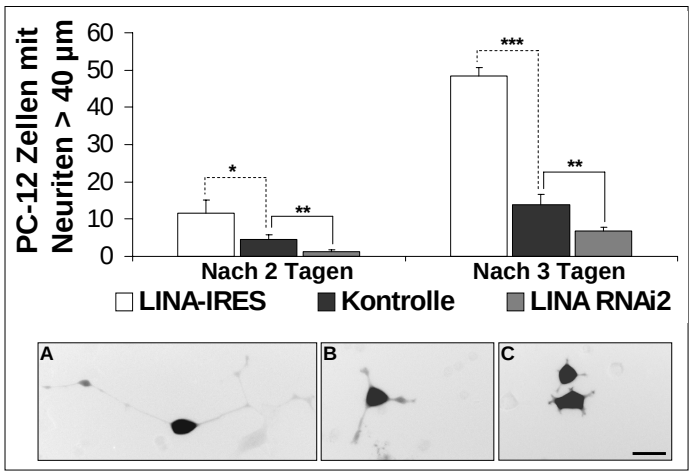

Abbildung 14: Auswirkung der Überexpression und Expressionshemmung des Proteins lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity (LINA) auf die Neuritogenese: Dargestellt ist die gemittelte Anzahl an Zellen (Zelllinie PC-12), die Neuriten länger als 40 μm ausbilden in %. Das linke Diagramm zeigt die Auswertung 2 Tage nach Transfektion, das rechte Diagramm zeigt die Auswertung 3 Tage nach Transfektion. Darunter sind beispielhaft die Zellmorphologien der einzelnen Gruppen nach 3 Tagen abgebildet. A) zeigt beispielhaft PC-12 Zellen, die LINA überexprimieren (LINA-IRES); B) zeigt die Kontrollgruppe und C) zeigt Zellen, bei denen die Expression von LINA durch *small-interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) supprimiert wird (LINA RNAi2). Signifikanz: ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05. Der Maßstabbalken entspricht 25 μm.
Nach 2 und nach 3 Tagen führte die Expressionshemmung von LINA (LINA RNAi2) zu einer Verringerung und die Überexpression (LINA-IRES) zu einer Wachstumssteigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Da durch die zweite siRNA-Nukleotidsequenz eine deutliche Änderung des Wachstumsverhaltens einer PC-12 Zelle hervorgerufen wurde, ist davon auszugehen, dass die erste siRNA-Nukleotidsequenz nicht funktionsfähig war. Die für das siRNA- Haarnadelkonstrukt gewählte Nukleotidsequenz scheint nicht effektiv genug, die Expression unterdrücken zu können.
Der Befund der dritten Gruppe (LINA RNAi2) bekräftigt die Annahme, dass dem Protein LINA eine wichtige Rolle für die Induktion und für das Wachstum von Neuriten zukommt. Dieser Befund konnte in folgenden Arbeiten (siehe 3.4.0.41) bestätigt werden. Weiterhin kann gefolgert werden, dass LINA immer in PC-12 Zellen vorkommen muss.
Zusätzlich zeigte der Versuch, dass die Neuritenbildung durch Zugabe des siRNA-Haarnadelkonstrukts nach 2 Tagen stärker reduziert wurde als nach 3 Tagen. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von LINA nach 3 Tagen zu einer stärkeren Wachstumssteigerung als nach 2 Tagen.

Auswirkung der gleichzeitigen Überexpression und Expressionshemmung von LINA:
Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, inwieweit die neuritogenen Effekte einer LINA-Überexpression durch LINA-Expressionshemmung beeinflusst werden können. Dafür wurden PC-12 Zellen mit den folgenden 4 Gruppen unter NGF-Zugabe transfiziert und diese 3 Tage später bezüglich des axonalen Wachstums fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet:

- Kontrollgruppe: Kontrollvektor pAAV-IRES-GFP, Kotransfektion mit dem Vektor GFP
- Erste Versuchsgruppe: LINA-Expressionshemmung (Vektor LINA RNAi2), Kotransfektion mit dem Vektor GFP
- Zweite Versuchsgruppe: Überexpression von LINA (Vektor LINA-IRES), Kotransfektion mit dem Vektor GFP
- Dritte Versuchsgruppe: Der Transfektionsansatz enthielt in gleichen Mengen den LINA-überexprimierenden Vektor (LINA-IRES) und den LINA-expressionshemmend6en Vektor (Vektor LINA RNAi2), Kotransfektion mit dem Vektor GFP

Erwartungsgemäß wiesen die ersten 3 Gruppen bei der Auswertung bezüglich der Anzahl an PC-12 Zellen mit Neuriten länger als 40 μm vergleichbare Werte wie in den vorherigen Versuchen auf. Die Expressionshemmung von LINA führte zu eine Reduktion um den Faktor 2,2 ($p<0{,}01$) und die Überexpression von LINA führte zu einer Steigerung um den Faktor 3 ($p<0{,}01$). Im Vergleich dazu konnte die vierte Gruppe das Neuritenwachtsum „nur“ um den Faktor 2 erhöhen.

Dieser Befund verdeutlichte die neuritogene Wirkung, die durch Überexpression von LINA erzeugt werden kann. Aber auch die „antagonistische“ Wirkung in Form von Expressionshemmung durch die RNA-Interferenz wird deutlich. Die Funktionsfähigkeit und Effektivität der RNA-Interferenz wird hierbei noch einmal belegt.

3.4.0.41 Quantitative Bestimmung der LINA-Expressionshemmung

Aus der Erkenntnis heraus, dass die Transfektion mit siRNA-Haarnadelkonstrukten für das Protein LINA zu einer deutlichen Morphologieänderung und zu einer Verminderung des axonalen Wachstums führte, sollte nun das Ausmaß der Expressionsunterdrückung von LINA quantitativ ermittelt werden. Hierfür wurde die Technik der real time RT-PCR verwendet. Durch Abnahme der LINA-RNA-Menge sollte verifiziert werden, dass die Modifikation tatsächlich durch Expressionshemmung und nicht z.B. durch unspezifische Effekte von siRNA hervorgerufen wurden.

Der Versuchsansatz erforderte zwei Gruppen: Die Kontrollgruppe, bei der PC-12 Zellen mit dem Kontrollvektor pAAV-IRES-GFP transfiziert wurden, und eine Versuchsgruppe, bei der die LINA-Proteinexpression (RNAi LINA2) unterdrückt wurde. Bei beiden Gruppen erfolgte eine Kotransfektion mit dem Vektor GFP. Analog zu den vorherigen Experimenten wurde der Versuch unter Zugabe des Wachstumsfaktors NGF durchgeführt. Zusätzlich wurde hier jedoch auch die LINA-Expressionrate in der Kontrollgruppe einmal mit und einmal ohne NGF-Zugabe bestimmt. Die PC-12 Zellen wurden 3 Tage nach Transfektion ausgewertet. Mittels FACS-Gerät wurden die fluoreszierenden Zellen von den untransfizierten und degradierten Zellen getrennt. Die Auswertung schloss somit nur transfizierte Zellen mit ein. Nach RNA-Isolation und cDNA-Herstellung wurde die LINA-Expressionsmenge der einzelnen Gruppen durch eine real time RT-PCR bestimmt. Das Protein *gene for porphobilinogen deaminase* (PBGD) diente als Referenzgen. Die cDNA-Menge der LINA-Bande der Kontrollzellen unter NGF-Zugabe wurde als Referenzwert verwendet (entspricht dem Zahlenwert 1) und die anderen Gruppen relativ dazu bestimmt. Die relativen Werte der jeweiligen Gruppen sind im folgenden Diagramm verdeutlicht (Abbildung 15).

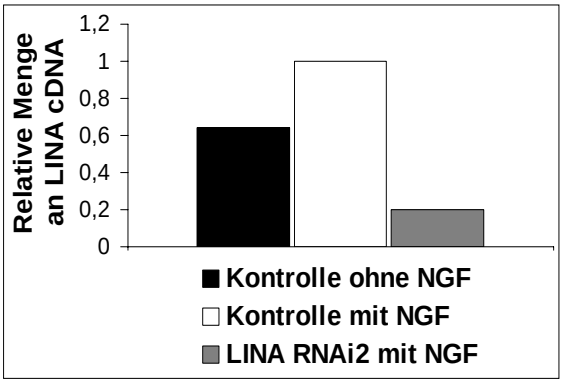

Abbildung 15: Schematische Darstellung der *complementary* **Desoxyribonukleinsäure-Menge (cDNA) des Proteins lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity (LINA) nach Transfektion von PC-12 Zellen mit LINA RNAi2 und nach Zugabe des Wachstumsfaktors neuronal growth factor (NGF):** Dargestellt ist die relative Menge an LINA cDNA auf Zellen (Zelllinie PC-12) 3 Tage nach Transfektion mit LINA RNAi2 bezogen auf die cDNA Menge der Kontrollgruppe 3 Tage nach Transfektion (unter NGF-Behandlung). Weiterhin ist die relative Menge an LINA cDNA von der Kontrollgruppe ohne NGF-Zugabe dargestellt bezogen auf die LINA cDNA-Menge der Kontrollgruppe unter NGF-Zugabe. Durch LINA RNAi2 nimmt die LINA cDNA-Menge um das 5-fache ab. Die Zugabe von NGF erhöht die Mengen an LINA cDNA um das 1,55-fache.

Die Auswertung ergab für die Versuchsgruppe unter NGF-Zugabe einen um den Faktor 5 geringeren Wert. Die Kontrollgruppe ohne NGF-Zugabe besaß eine um den Faktor 0,6 geringere Menge verglichen mit der Kontrollgruppe unter NGF-Zugabe.
Dies zeigte zum einen, dass die morphologischen und wachstumsmodulierenden Effekte eindeutig durch eine verminderte cDNA-Konzentration für LINA verursacht werden. Zum anderen legt die Auswertung die Vermutung nahe, dass die Expressionsrate von LINA durch die Zugabe von NGF hochreguliert werden kann. Dies wurde später durch weitere Arbeiten im Arbeitskreis Prof. Dr. Fischer, Universität Ulm, bestätigt.

3.4.0.42 Verifizierung der Expressionshemmung von LINA durch RNA-Interferenz mittels Antikörperfärbung

Nachdem ein Antikörper für das Protein LINA zur Verfügung stand, sollten die in den vorausgegangenen Experimenten gewonnenen Ergebnisse immunhistochemisch veranschaulicht und verifiziert werden.
Für diese Studie wurden PC-12 Zellen in der Versuchsgruppe mit Vektoren transfiziert, die die Expression von LINA unterdrückten (LINA RNAi2). Die Kotransfektion mit dem Vektor GFP diente dem späteren Nachweis der transfizierten Zellen. Bei der Kontrollgruppe wurden die PC-12 Zellen mit dem Vektor GFP transfiziert. Das Experiment wurde einmal mit NGF-Zugabe und einmal ohne NGF-Zugabe angesetzt. Untransfizierte Zellen dienten als Kontrollzellen, um im Vergleich dazu Aussagen über die Eigenschaften transfizierter Zellen treffen zu können.
3 Tage nach Transfektion und nach immunhistochemischer Anfärbung der fixierten Zellen wurden die transfizierten mit den nicht transfizierten Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop verglichen in Bezug auf Intensität der Antikörperfärbung und Morphologie. Die transfizierten Zellen waren an der Expression des Proteins eGFP erkennbar.
Wie erwartet war das Protein LINA in allen Zellen, d.h. in transfizierten und untransfizierten Zellen, nachweisbar. Dies untermauert die These, dass das Protein LINA immer in einer PC-12 Zelle vorhanden war.
Bei der Kontrollgruppe zeigten sich keine Unterschiede zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen. Damit konnte verifiziert werden, dass der Vektor GFP keinen Einfluss auf die LINA-Proteinkonzentration besitzt. Eine Aussage über einen Intensitätsunterschied der Antikörperfärbung bei der Kontrollgruppe mit bzw. ohne NFG-Behandlung war nicht eindeutig zu treffen. Tendenziell zeigte die NFG-behandelte Gruppe jedoch ein stärke Antikörperfärbung.

Im Vergleich dazu waren bei der Versuchsgruppe deutliche Intensitätsunterschiede zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen erkennbar: LINA-expressionssupprimierte Zellen waren schwächer anfärbbar. Unter NGF-Zugabe waren die Differenzen der einzelnen Gruppen besser erkennbar als ohne NGF-Zugabe. Auch morphologisch waren -v.a. unter NFG-Zugabe- deutlich weniger Neuriten bei den transfizierten Zellen erkennbar. Im Folgenden sind beispielhaft transfizierte und untransfizierte Zellen der Versuchsgruppe unter NGF-Behandlung abgebildet (vgl. Abbildung 16).

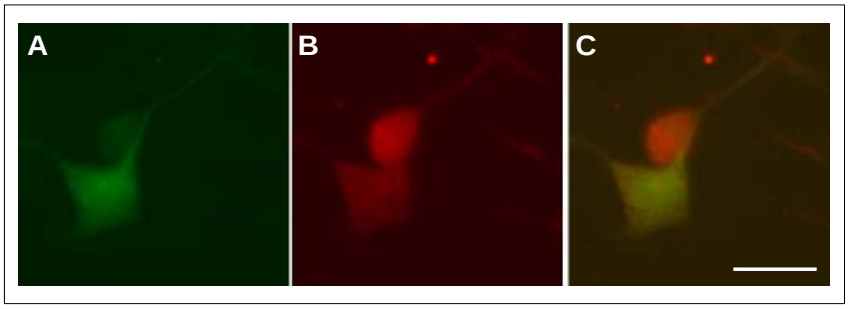

Abbildung 16: Photomontage einer Zelle (Zelllinie PC-12), bei der die Expressionsmenge des Proteins lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity (LINA) durch *small-interfering* **Ribonukleinsäure (siRNA) supprimiert wurde, im Vergleich zu einer Kontrollzelle unter Behandlung mit dem Wachstumsfaktor neuronal growth factor (NGF):**
A) Photomontage einer Zelle, die mit einem LINA-siRNA produzierenden Vektor transfiziert wurde. Diese Zelle bildet keine langen Neuriten aus. Durch Koexpression des Proteins enhanced green fluorscence protein ist diese Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar, untransfizierte Zellen sind nicht erkennbar. B) Photomontage dieser Zellen nach LINA-Antikörperfärbung. In der untransfizierten Zelle ist deutlich mehr LINA nachweisbar als in der LINA-siRNA transfizierten Zelle. Auch bildet die untransfizierte Zelle einen deutlich längeren Neuriten aus als die Versuchszelle. C) Überlagerung der Bilder A und B. Der Maßstabbalken entspricht 25 μm.

Dieses Ergebnis verifizierte folgende Befunde:

1. Das Protein LINA wird in PC-12 Zellen exprimiert
2. SiRNA führt zu einer Reduktion der LINA-Expression
3. Das Protein LINA ist für die zelltypische Morphologie mitverantwortlich
4. Die Expression von LINA ist essentiell für das Neuritenwachstum
5. Es besteht die Vermutung, dass der Wachstumsfaktor NGF zu einer Induktion der LINA-Expression führt

3.5 Versuchsansätze zur axonalen Wachstumssteigerung

In dieser Arbeit konnte das axonale Wachstum in Zellkultur sowohl durch Expressionshemmung von ROCK als auch durch Überexpression von LINA gesteigert werden. Beide Verfahren basieren auf unterschiedlichen Wirkungsmechanismen innerhalb einer Zelle. Die ROCK-Expressionshemmung führte v.a. auf Myelin zu einer deutlichen Wachstumssteigerung. Der genaue Funktionsmechanismus des Proteins LINA ist bislang ungeklärt, beruht aber nicht auf Interaktionen mit der Myelinkaskade.
Unter morphologischen Gesichtspunkten sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Diese sind in der folgenden Abbildung verdeutlicht (Abbildung 17): LINA überexprimierte Zellen weisen meist einen längeren Fortsatz mit wenigen Verzweigungen auf. Das Axon verläuft relativ gerade. Die ROCK-Expressionsunterdrückung führte ebenso zur Ausbildung eines langen Neuriten, dieser wies aber meist mehrere Verzweigungen auf. Der Zellkörper ist polygonaler.

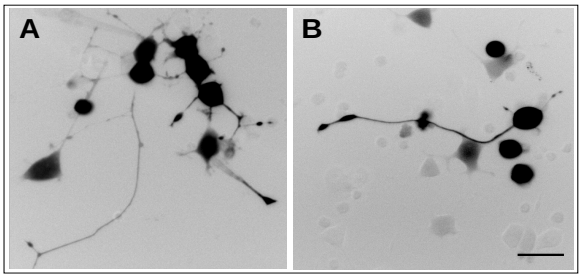

Abbildung 17: Photomontage unterschiedlicher Versuchsansätze zur axonalen Wachstumssteigerung: A) Abgebildet sind Zellen (Zelllinie PC-12), bei denen die Expression der Kinase RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase (ROCK) durch *small-interfering* Ribonukleinsäure (siRNA) supprimiert wurde. Die ROCK-Expressionshemmung führt zur Ausbildung mehrerer langer und verzweigter Neuriten. B) Abgebildet sind PC-12 Zellen, bei denen das Protein lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity (LINA) durch den Vektor LINA-IRES überexprimiert wurde. Die Überexpression von LINA führt zur Ausbildung langer und gerader verlaufenden Neuriten mit nur wenigen Verzweigungen. Vergrößerung: 40-fach. Der Maßstabbalken entspricht 25 μm.

4 Diskussion

Zusammenfassend sind hier die wichtigsten Ergebnisse dargestellt, die die Grundlage der Diskussion bilden:

1. Die Konstruktion eines siRNA produzierenden Vektors ermöglichte eine funktionelle Untersuchung von Proteinen durch Expressionshemmung. Dieser Vektor konnte mittels AAV-2 *in vivo* (in dieser Arbeit in RGZ) eingebracht werden. Da das Protein hrGFP zusätzlich durch den Vektor exprimiert wurde, konnten alle transfizierten Zellen direkt nachgewiesen werden. Dieser Vektor wurde zur Funktionsanalyse der Proteine ROCK und LINA verwendet.

2. ROCK kommt eine wichtige Funktion bei der Regenerationsinhibition verletzter Nervenzellen zu. Es ist maßgeblich an der inhibitorischen Signalkaskade beteiligt, die durch Myelin oder Faktoren des Narbengewebes ausgelöst wird. Weiterhin kommt dem Protein eine wichtige Funktion bei der Induktion der Apoptose zu. Der in dieser Arbeit konstruierte Vektor wurde verwendet, um die Expression von ROCK zu reduzieren. Die Expressionshemmung von ROCK führte in Zellkultur zu einem signifikant verbesserten Auswachsen von Neuriten bei den Zelllinien PC-12 und RGZ-5. Die verminderte Expressionsrate wurde durch eine semiquantitative RT-PCR verifiziert. Im nächsten Schritt wurde dieser Vektor mittels AAV-2 in RGZ eingebracht und nach 5 bzw. 7 Wochen eine Linsenverletzung und Sehnervenquetschung durchgeführt. Es war zu beobachten, dass die Anzahl überlebender RGZ und regenerierender Axone reduziert war.

3. Die Funktionsweise des erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entdeckten Proteins LINA sollte als weitere Zielsetzung dieser Arbeit genauer charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass die Überexpression auf PC-12 Zellen zu einer Verbesserung des Neuritenwachstums führte. Im Gegensatz zu ROCK ist diese Steigerung des Neuritenwachstum nicht durch Myelin beeinflussbar. Mittels RT-PCR und Antikörperfärbung konnte gefolgert werden, dass LINA in PC-12 Zellen exprimiert wird und die Expression von LINA durch die Zugabe von NGF gesteigert werden konnte. In einem weiteren Schritt wurde der in dieser Arbeit konstruierte Vektor zur Expressionshemmung von LINA verwendet. Durch die Expressionshemmung von LINA wurde das Neuritenwachstum reduziert.

4.1 Die Technik der RNA-Interferenz

In dieser Arbeit wurde die Technologie der RNAi angewendet, um durch Expressionshemmung von ROCK eine Verbesserung der axonalen Regeneration zu erzielen. In einem weiteren Schritt wurde durch Expressionshemmung von LINA dessen Funktion in PC-12 Zellen genauer untersucht. In der Einleitung ist bereits auf die Anwendungsmöglichkeit und Funktionsweise von RNAi eingegangen worden. Spezifische Aspekte sollen jedoch im Folgenden nochmals aufgegriffen werden.

4.1.0.43 Methoden zur Expressionshemmung eines Proteins

Die Suppression eines Proteins zur Funktionsanalyse hatte bereits in der Vergangenheit viel Aufmerksamkeit erfahren:

Die Ausschaltung spezifischer Proteine in embryonalen Stammzellen durch das Einführen von Fremdgenen in die Keimbahn führte zur Herstellung so genannter „knock-out“ Tieren [81]. Grundsätzlich können bei diesem 1988 entwickelten Verfahren sämtliche Proteine vollständig eliminiert werden. Allerdings sind mindestens 15% der Proteine eines Säugetieres essentiell für seine Entwicklung, so dass ihre Deletion bereits postnatal zum Tode führt [National Human Genome Research 97]. Auch ROCK kommt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS zu [31, 48]. Folglich ist eine Herstellung von ROCK-knock-out Mäusen nicht möglich.

Die Genregulation (durch An- und Abschalten von Genen) ist für die Funktion einer Säugetierzelle absolut notwendig. In der Zelle wird dies unter anderem durch Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung von DNA oder von Histonen (= Proteine, die die DNA umgeben) aufrechterhalten. Dies führt zu einer Änderung der Chromatinstruktur und damit der Genaktivität [107, 61]. Ein artifizielles Eingreifen in diesen Ablauf durch Modifikation der Chromatinstruktur ist eine weiterere Möglichkeit die Expressionsrate eines Proteins zu beeinflussen. Jedoch ist diese Vorgehensweise auf Grund der vielen mitwirkenden Komponenten sehr difficil, so dass die Anwendung bislang auf wenige Protein limitiert ist.

Ebenso kann die Proteinexpression einer Zelle durch das „Tet-off“ und das „Tet-on“ gesteuert werden. Bei beiden Systemen interagiert ein sythetisch hergestellter „tetracyclin controlled transcription factor“ (tTA oder rtTA) mit einem spezifischen Promotor auf der DNA und leitet so die Transkription ein bzw. verhindert sie [113]. Die Zugabe von Tetracyclin (oder ähnlichen Substraten) fördert beim Tet-On-Sytem die Genexpression, beim Tet-off-System wird diese durch Tetracycline verhindert [113]. Durch

diese Methode wurde die Genexpression bislang nur bei wenigen Proteinen modifiziert [108].

Im Vergleich zu diesen drei Methoden besitzt die Technik der RNAi mehrere Vorteile:

1. Die Applikation von siRNA ist v.a. in Zellkultur relativ einfach möglich. Durch den in dieser Arbeit entwickelten Vektor können siRNA gegen alle Proteine in eine Zelle eingebracht und die Auswirkungen der Expressionshemmung analysiert werden.
2. Durch die Entwicklung siRNA produzierender Vektoren kann die Genexpression dauerhaft supprimiert werden.
3. Da die Proteinexpression erst nach Applikation von siRNA reduziert wird, können auch für die Entwicklung essentielle Proteine wie ROCK untersucht werden.
4. SiRNA kann therapeutisch eingesetzt werden.

4.1.0.44 Applikationsformen von siRNA

Um eine Proteinsuppression durch siRNA zu erreichen, müssen die charakteristischen, 21-23 bp langen dsRNA-Stücke in einer Zelle vorhanden sein [36].
Zum einen können siRNA synthetisch hergestellt und durch Transfektion in Zellen eingebracht werden [36]. Diese Methode ist einfach und schnell durchzuführen, jedoch sind die durch RNAi hervorgerufenen Effekte nur transient. Nach einer 3- bis 5-maligen Zellteilung ist die Konzentration an siRNA zu stark verdünnt, um Effekte hervorrufen zu können [89]. Auch ist ca. 96 bis 120 Stunden nach Transfektion eine Degradation von siRNA zu beobachten [89]. Zur Stabilitätserhöhung wurden Nanopartikel und Lipidkomplexe der siRNA beigefügt, was aber bislang nur in geringem Maße zum Erfolg führte [64, 120].

Eine zweite Methode stellt die Applikation von shRNA mittels Vektoren dar [126, 43]. Dadurch kann eine konstante Expression von siRNA erreicht werden [19]. Da für die in dieser Arbeit gesetzte Fragestellung eine längere Anwesenheit von siRNA notwendig war, wurde ein shRNA exprimierender Vektor entwickelt. Zusätzlich besitzt der in dieser Arbeit konstruierte Vektor den weiteren Vorteil, dass alle transfizierten Zellen durch Koexpression des Proteins hrGFP detektierbar sind und somit von untransfizierten Zellen unterschieden werden können. ShRNA und SiRNA werden in dieser Arbeit äquivalent verwendet.

4.1.0.45 Konsequenzen der RNA-Interferenz

Die Konsequenzen, der durch RNAi hervorgerufenen Expressionshemmung, wurden in Zellkultur bei funktionellen Tests bei allen Versuchsansätzen deutlich. So führte die Expressionshemmung von ROCK zu einer deutlichen Steigerung des neuritogenen Wachstums. Insbesondere auf Myelin konnte dadurch das Wachstum um das bis zu 14-fache erhöht werden. In einem weiteren Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass die Expressionshemmung von LINA eine reduzierte Anzahl auswachsender Neuriten hervorrief. Durch diese beobachtete Morphologieänderung kann gefolgert werden, dass durch siRNA die Expressionsrate des Proteins modifiziert wurde. Die verminderte RNA-Expression (nach Applikation von siRNA) konnte mittels semiquantitativer bzw. quantitativer RT-PCR verifiziert werden. Dadurch können unspezifische Effekte, die durch siRNA ausgelöst werden können und in der Literatur beschrieben sind [60, 89, 114], ausgeschlossen werden. Diese unspezifischen Effekte werden durch Aktivierung antiviraler Mechanismen oder bestimmter Gene sowie durch Induktion von Zytokinen hervorgerufen [112, 89, 114, 43]. Desweiteren können sogenannte „off-targeting“ Effekte durch siRNA ausgelöst werden, wobei mRNA mit inkompletter Komplementarität degradiert und somit nicht die eigentlichen Zielproteine, sondern andere Proteine in ihrer Expression herabreguliert werden [60]. Dies ist allerdings in dieser Arbeit unwahrscheinlich, denn im Gegensatz zu den hier gewonnen Ergebnissen wäre bei unspezifischen Effekten kein Konzentrationsunterschied der mit siRNA behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar gewesen.

Ein weiteres Indiz dafür, dass die durch siRNA hervorgerufenen Effekte nicht auf unspezifischen Effekten beruhten, ist, dass verschiedene siRNA-Konstrukte für ROCK zur gleichen morphologischen Änderung führten.
Auch die Beobachtung, dass die Applikation von siRNA auf zwei verschiedenen Zelllinien zu dem gleichen Ergebnis führten, weisen auf spezifische Effekte durch siRNA hin.

In Einklang mit der Literatur war auch in dieser Arbeit die durch unterschiedliche siRNA-Konstrukte erzielte Expressionshemmung nicht gleich stark, wobei die erzielte Expressionshemmung entscheidend von der gewählten siRNA-Nukleotidsequenz abhängig ist [67]. In der Literatur schwankt die durch siRNA erzielte Proteinsuppression zwischen 50% bis zu 95% [99, 56, 67]. In dieser Arbeit war durch semiquantitative RT-PCR eine deutlich verminderte cDNA-Konzentration bei den mit siRNA behandelten Gruppen nachweisbar. Dabei zeigte die mit dem zweiten siRNA-Konstrukt behandelte Gruppe weniger cDNA als die mit dem ersten siRNA-Konstrukt behandelte Gruppe. In Zukunft sollte die durch siRNA hervorgerufenen Expressionshemmung auch auf Proteinebene z.B. mittels Western-Blot nachgewiesen werden.

Auch unter morphologischen Aspekten besaßen die verschiedenenen siRNA-Konstrukte ein unterschiedliches Effektausmaß. RNAi ROCK1 SK+ verbesserte das Neuritenwachstum um das 1,9-fache, wohingegen RNAi ROCK2 SK+ eine Steigerung um das 2,2-fache erzielte. (RNAi ROCK1 und RNAi ROCK2 unterscheiden sich nur in der verwendeten siRNA-Nukleotidsequenz). RNAi LINA1 führte zu keiner Änderung des Neuritenwachstums, wohingegen RNAi LINA2 das neuritogene Wachstum um die Hälfte und die cDNA-LINA-Konzentration um 80% reduzierte.

Weiterhin beeinflusst die Versuchslaufzeit das Ausmaß der Expressionshemmung. Analog zu in der Literatur beschriebenen Experimenten, die auf PC-12 Zellen shRNA produzierende Vektoren verwendeten, wurde ein Auswertungszeitpunkt von 3 Tagen gewählt [26]. Da der Vektor nach Transfektion zunächst in das Genom der Zelle integriert und shRNA exprimiert werden muss, sind die Konsequenzen von shRNA später nachweisbar als nach Transfektion synthetisch hergestellter siRNA [19].
Beim Versuch mit LINA-RNAi waren die morphologischen Unterschiede nach 2 Tagen stärker als nach 3 Tagen ausgeprägt. Das zunächst widersprüchlich erscheinende Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass das axonale Wachstum unter NGF-Zugabe nach 3 Tagen stärker sichtbar war als nach 2 Tagen und somit die wachstumshemmende Wirkung durch RNAi LINA nach 3 Tagen bereits teilweise neutralisiert wurde. Daneben war die Überexpression von LINA erst nach 3 Tagen deutlicher zu erkennen als nach 2 Tagen, was die These des „nach 2 Tagen verstärkt einsetzenden Wachstumsschubs“ bestätigt. Durch die Verwendung eines shRNA produzierenden Vektors muss nicht von der Möglichkeit einer reduzierten siRNA-Konzentration nach 3 Tagen ausgegangen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen siRNA-Effektivitäten ergibt sich aus der Relation der Konzentration an siRNA im Verhältnis zur Proteinkonzentration innerhalb einer Zelle. Dieser Quotient hängt zum einen von der siRNA-Konzentration und damit vom Auswertungszeitpunkt ab, aber auch von der Umsatzgeschwindigkeit des Proteins und der Zelle, da durch RNAi „nur“ die Neusynthese eines Proteins verhindert wird. Die anfänglich vorhandene Proteinkonzentration bleibt bis zur Degradation des Proteins bestehen [36]. Wenngleich in der Literatur über die Umsatzrate von ROCK und LINA nichts beschrieben wurde, ist davon auszugehen, dass diese in RGZ und im ZNS allgemein niedrig ist, da sich zentrale Neurone nicht erneuern können. Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt der Sehnervquetschung und Linsenverletzung erst 5 bzw. 7 Wochen nach Virusinjektion gewählt.

Möglicherweise kann die verwendete siRNA-Nukleotidsequenz durch spontane Mutationen verändert werden, was die Effektivität steigern oder verringern kann [138]. In dieser Arbeit sollte jedoch nicht von einer Mutation ausgegangen werden, da verifiziert wurde, dass durch siRNA die Expressionsmenge des Zielgens verringert werden konnte.

Die oben aufgeführten Gründe erklären, warum verschiedene siRNA-Sequenzen unterschiedlich stark ein Protein supprimieren und warum nach kurzer Versuchslaufzeit ein Protein nie komplett ausgeschalten, sondern herabreguliert (knock-down) wird. In künftigen Projekten könnte die durch siRNA verminderte Proteinmenge z.B mittels Western-Blot oder real time RT-PCR zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten bestimmt werden.

4.2 Versuchsansätze zur Neutralisation der inhibitorischen Myelinsignalkaskade

Neben der Regulation des Aktinozytoskeletts kommt der RhoA/ROCK-Signalkaskade ein wichtige Rolle bei der Regenerationsinhibition verletzter Neurone im ZNS zu [32]. Aus diesem Grund hat die Neutralisation dieser inhibitorischen Signalkaskade bereits in der Vergangenheit viel Aufmerksamkeit erfahren [42, 32, 77]. Beispielsweise zeigte Dergham *et al.*, dass in Ratten nach einer Rückenmarksverletzung regenerierende Axone zu beobachten waren, wenn an der Verletzungsstelle die Applikation der ADP-Ribosyl-Transferase C3 (ein irreversibler RhoA-Inaktivator) erfolgte. In gleichem Maße konnte eine axonale Regeneration durch Applikation des ROCK-Inhibitors Y-27632 an der Verletzungsstelle erzielt werden. Auch in RGZ führte die C3-Ribosyl-Transferase zu einem verbesserten axonalen Wachstum [42]. Das Gen für die C3-Ribosy-Transferase wurde dabei mittels Adeno-Assoziierten-Viren in RGZ eingebracht [42, 32, 77]. Trotz dieser erfolgsversprechenden Versuche ist die Einsatzmöglichkeit von C3 und Y-27632 bislang beschränkt: Erstens nimmt die Konzentration von C3 und Y-27632 an der Läsionsstelle rasch ab. Zweitens kann C3 nach einiger Zeit toxisch wirken [42]. Drittens wirkt Y-27632 nicht nur inhibitorisch auf ROCK, sondern auch auf das Protein PKR (protein kinase C-related protein kinase). Da PKR ebenso wie ROCK die Regulation des Zytoskeletts beeinflusst, können die regenerationsfördernden Effekte durch Y-27632 nicht eindeutig dem einen oder dem anderen Protein zugeordnet werden [44, 30].

Auf Zellkulturebene zeigte u.a. die Arbeitsgruppe Cui et al. 2008, dass die Expressionshemmung von RhoA mittels shRNA-produzierender Vektoren auf PC-12 Zellen zu einem verbesserten Wachstum führte [38]. Analog zu diesem Ergebnis führte auch

in dieser Arbeit ein shRNA-produzierender Vektor zu einer Neutralisation der inhibitorischen Myelinsignalkaskade. In dieser Arbeit war durch Expressionshemmung von ROCK auf PC-12 und RGZ-5 Zellen eine deutliche Steigerung des neuritogenen Wachstums zu beobachten.
Da jedoch bislang kein Substrat der inhibitorischen Myelinsignalkaskade durch RNAi *in vivo* erfolgreich supprimiert wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit der hier konstruierte, shRNA-produzierende Vektor mittels AAV-2 in RGZ eingebracht werden. Die Kinase ROCK wurde als Zielprotein für diese Arbeit gewählt, da ROCK nicht nur bei der myelininhibitorischen Signalkaskade -wie oben erläutert-, sondern auch bei der Apoptose und bei der Narbenbildung eine wichtige Rolle zukommt [2, 27, 35, 90].

4.2.1 Auswirkungen der Expressionshemmung von ROCK

Trotz der signifikanten Zunahme des Neuritenwachstums in Zellkultur führte die Expressionshemmung von ROCK in der Ratte wider allen Erwartungen zu keiner verbesserten Regeneration. Das axonale Auswachsen distal der Läsionsstelle verschlechterte sich sogar, obwohl eine erfolgreiche Transfektion der RGZ anhand der Fluoreszenz bei allen Tieren sichergestellt werden konnte. Auch die Zahl der überlebenden RGZ reduzierte sich bei den Versuchstieren.
Die im Folgenden aufgeführten Gründe könnten diese Beobachtungen erklären:

4.2.1.1 Isoformen von ROCK

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert wurde, ist die Inhibition der ROCK-Signalkaskade ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Verbesserung der Regeneration des ZNS. Dabei ist zu beachten, dass zwei Isoformen von ROCK existieren. Diese beiden Isoformen besitzen eine zu 65% identische Nukleotidsequenz und eine zu 92% identische Sequenz der Kinasedomäne [76]. Im Gehirn und im Muskelgewebe wird vermehrt ROCKII exprimiert. ROCKI findet man in höheren Konzentrationen in nichtneuronalem Gewebe wie Niere, Leber und Milz [76, 95]. Neuere Studien zeigten jedoch, dass ROCKI und ROCKII ubiquitär in allen Geweben vorhanden sind [76]. Die Aktivierung der beiden Isoformen erfolgt im ZNS hauptsächlich über die myelininhibitorische Signalkaskade durch RhoA [27, 55]. Beide Isoformen besitzen wichtige Funktionen im ZNS: Bito *et al.* wies beispielsweise nach, dass ROCKI für die Axonogenese unentbehrlich ist [14]. Andererseits zeigte Zhou *et al.*, dass ROCKII knock-out-Mäuse weniger Synapsen und ein verändertes neuronales Zytoskelett ausbildeten [145]. Dementsprechend sind erfolgreich im ZNS angewandte ROCK-Inhibitoren wie Y-27326 oder Fasudil sowohl gegen ROCKI als auch gegen ROCKII gerichtet [76, 59].

Obwohl beide Isoformen weitestgehend dieselben Interaktionspartner besitzen und nach Aktivierung die gleichen Effekte hervorrufen, gibt es auch spezifische Unterschiede [102]. Beispielsweise kann ROCKI durch die Caspase-3 gespalten und in seine aktive Form überführt werden. Die Bildung von apoptotischen Bläschen wird dadurch induziert. Dagegen wird ROCKII, da es die Caspase-3 abhängige-Teilungsstelle nicht besitzt, nicht durch diese Protease aktiviert [76, 117]. Andere Proteasen wie Granzyme B wirken dementgegengesetzt nur auf ROCKII [116]. Lingor *et al.* brachte Bcl-2-associated athanogene-1 (BAG1) mittels AAV in RGZ ein, um nach einer Sehnervenquetschung neuroprotektive Effekte zu beobachten. Dabei führte die Überexpression von BAG1 über eine Translokation von Raf1 zu einer verminderten Aktivität von ROCKII [102]. Auch in weiteren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass Raf1 spezifisch mit ROCKII interagiert und so seine Aktivität regelt [101].
Wenngleich es scheint, dass jede Isoform - zumindest teilweise - spezifisch aktiviert wird und jeder eine spezifische Rolle bei der Axonogenese im ZNS zukommt, ist bislang unklar, welche von beiden Isoformen hauptsächlich im ZNS wirksam ist und nach einer Verletzung die Regeneration verhindert. In dieser Arbeit wurde die Nukleotidsequenz für ROCKI verwendet, da zu Beginn der Arbeit nicht bekannt war, in welchen Zellen im ZNS ROCKII vorhanden ist. Es war allerdings bekannt, dass ROCKI ubiquitär vorkommt [95]. In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der ROCKI-Expressionshemmung auf das Neuritenwachstum beobachtet werden. Neuere Arbeiten zeigten jedoch, dass ROCKII auch in den zentralen Nervenzellen vorhanden ist und dort dieser Isoform eine wichtige Rolle zukommt [102]. Dies würde erklären, warum in dieser Arbeit durch Expressionshemmung von ROCKI die Regenerationskapazität *in vivo* nicht gesteigert werden konnte.
Auch über die Verteilung von ROCKI oder ROCKII in PC-12 Zellen ist bislang nichts beschrieben. Entgegengesetzt zu den Versuchen *in vivo* lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass in PC-12 Zellen vermehrt ROCKI das neuritogene Wachstum beeinflusst. Dort konnte durch die ROCKI-Expressionssuppression ein deutlich verbessertes Neuritenwachstum hervorgerufen werden. In zukünftigen Experimenten könnte die Expression von ROCKII *in vitro* und *in vivo* reduziert und die Auswirkungen mit denen der ROCKI-Expressionshemmung verglichen werden.

4.2.1.2 Die Technik der RNAi kann toxische Effekte hervorrufen

Trotz einer großen Anzahl an Veröffentlichungen, die in Zellkultur erfolgreich durch die Technologie der RNAi die Expression eines Proteins supprimieren konnten, ist die Anwendung von RNAi *in vivo* bislang noch mit Schwierigkeiten verbunden [12, 38, 40, 36, 66, 89, 11]. RNAi kann *in vivo* toxische Effekte hervorrufen. Auf bislang ungeklärte Weise wird durch RNAi die Interferonbildung gesteigert, was zum Zelltod führen kann

[112, 89, 114, 43]. Es zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit solcher Effekte mit der Länge der Versuchslaufzeit zunimmt [21, 83, 50, 136, 126]. Dementsprechend können toxische Effekte bei einer langen Versuchslaufzeit, wie sie in dieser Arbeit mit 7 bzw. 9 Wochen gewählt wurde, vermehrt auftreten. Ein erfolgreicher Einsatz von RNAi *in vivo* wurde aus diesem Grund meist nur bei Versuchen mit einer kurzen Laufzeit von maximal 2 Wochen beschrieben. So gelang es beispielsweise Kong *et al.* bei Mäusen mittels siRNA die Konzentration des Bronchiolitits verursachenden Virus RSV (repiratory syncytial virus) zu reduzieren, wobei die Auswertung nach 5 Tagen erfolgte [72]. SiRNA-Komplexe gegen das RSV-NSI-Gen wurden dabei als Nanopartikel intranasal in Ratten appliziert [72].
McCaffrey *et al.* konnten in Mäusen zeigen, dass bei einer Kotransfektion von HBV und shRNA gegen ein Protein von Hepatitis B Viren (HBV) die HBV-DNA- und RNA-Menge um 77-92% reduziert wurde. Die Auswertung dieses Experiments erfolgte 7 Tage nach Transfektion [83]. Nur wenige Arbeitsgruppen veröffentlichten bislang Studien mit einem längeren Untersuchungszeitraum [109, 135]. Beispielsweise konnte über einen Untersuchungszeitraum von 9 Wochen die Menge des für die neurodegenerative Krankheit „Spinozerebelläre Ataxie “ (SCA) verantwortlichen Proteins Ataxin I in Mäusen reduziert und dadurch die Beweglichkeit verbessert werden [135]. Analog zu der Vorgehensweise dieser Arbeit wurde dabei shRNA mittels Viren eingebracht.

4.2.1.3 SiRNA bzw. shRNA kann miRNA verdrängen

Neben den oben aufgeführten toxischen Effekten kann RNAi dadurch zellschädigend wirken, dass siRNA/shRNA mit physiologischer microRNA (miRNA) um Enzyme (wie z.B. DICER oder RISC) konkurrieren. MiRNA werden durch siRNA/shRNA von Enzymen verdrängt, so dass lebensnotwendige Funktionen -wie z.B. der geregelter Ablauf der Translation oder des Zellzyklus- nicht mehr aufrechterhalten werden können. Als Folge davon kommt es zum Zelltod [50]. Diese These würde erklären, warum in dieser Arbeit in der Versuchsgruppe weniger RGZ zu beobachten sind als in der Kontrollgruppe. Das verminderte axonale Wachstum ist somit als Folge der reduzierten Anzahl an RGZ erklärbar, denn je mehr RGZ zu Grunde gehen, desto weniger Nervenzellen können zum Nachwachsen ihrer Neuriten rekrutiert werden.

4.2.1.4 ROCK-siRNA reduziert die endogene ROCK-Proteinkonzentration

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die verminderte Anzahl überlebender Axone nach Applikation eines shRNA-produzierenden Virus könnte eine zu starke Reduktion der endogenen ROCK-Menge sein. Wenngleich die wachstumsinhibitorische Funktion von aktiviertem ROCK unumstritten ist, wird zur Stabilität des Aktinozytoskeletts eine

geringe Menge an endogenem ROCK benötigt [134, 96, 110]. In diesem Zusammenhang könnte die Expressionshemmung von ROCK 7 bzw. 9 Wochen nach Virusinjektion zu stark gewesen sein.

4.2.1.5 Geringe Anzahl an Versuchstieren

Als weitere Ursache für die schlechte Regeneration in dieser Arbeit kann die geringe Anzahl an Versuchstieren (n=4) angesehen werden. Der Versuch sollte in Zukunft mit einer größeren Anzahl an Ratten durchgeführt werden.

4.2.1.6 Toxische Wirkung des AA-Virus

Gegen die Vermutung, dass das in dieser Arbeit verwendete Virus auf RGZ toxisch wirken kann, sprechen vergleichbare in der Literatur aufgeführte Versuche [42, 45]. Mit Hilfe von AAV, welche den in dieser Arbeit verwendeten Viren entsprechen, konnte z.B. Fischer *et al.* die ADP-Ribosyltransferase C3 in RGZ erfolgreich exprimieren und dadurch RhoA inaktivieren. Als Ergebnis war nach Sehnervenquetschung eine Steigerung des axonalen Wachstums und eine vermehrte Anzahl überlebender RGZ zu beobachten [42]. Auch GPF, welches in dieser Arbeit nach Virusinfektion in RGZ exprimiert wurde, könnte gegebenenfalls toxisch wirken. Jedoch wird diese Möglichkeit durch Verwendung von hrGFP weitestgehend eliminiert [123].

4.2.1.7 Auswirkungen der durch siRNA-reduzierten ROCK-Menge an dem Wachstumskegel

Die siRNA-tragenden-AAV wurden hier in den Glaskörper des Auges eingebracht, so dass sie auf Grund anatomischer Bedingungen den Zellkörper der RGZ infizierten. Da Axonende und Zellkörper oft weit voneinander entfernt sein können, ist es fraglich, ob die reduzierte ROCK-Menge an dem Wachstumskegel in dieser Arbeit überhaupt bemerkbar wurde. Zudem ist davon auszugehen, dass die Umsatzrate aller Proteine in RGZ sehr langsam ist. ShRNA kann jedoch nur die Neusynthese eines Proteins supprimieren und die vorhandene Proteinkonzentration bleibt bis zur Degradation bestehen. So bleibt unklar, inwieweit die vor Infektion des AAV-2 bestehende endogene ROCK-Konzentration zum Auswertungszeitpunkt ausgebaut wurde.

4.2.1.8 Ausblick der Expressionshemmung von ROCK durch RNAi

Zweifelsohne stellt die Expressionshemmung von ROCK einen erfolgsversprechenden Ansatz dar, um das Auswachsen axotomierter Nervenzellen zu verbessern. Ebenso besitzt die Technik der RNAi das Potential zukünftig *in vivo* anwendbar zu sein und möglicherweise als Gentherapeutikum eingesetzt werden zu können. Ein Anreiz für die

Zukunft besteht deshalb darin zu zeigen, auf Grund welcher Mechanismen die Expressionshemmung von ROCK *in vivo* entgegen den Ergebnissen in Zellkultur zu keiner Verbesserung des neuritogenen Wachstums führte. Es könnte untersucht werden, ob Interferone hochreguliert wurden, wie stark die Proteinexpression von ROCK supprimiert wurde und ob sich die Konzentration an miRNA veränderte. Es sollten die Effekte nach einer kürzeren Versuchslaufzeit ausgewertet und die ROCK-Konzentrationen am Wachstumkegel bestimmt werden. Auch könnten Fragen nach einer eventuell möglichen Toxizität durch Auswirkungen der Infektion eines Virus mit leerem hrGPF exprimierenden Vektor erörtert werden.

4.3 Auswirkungen von LINA auf das neuritogene Wachstum

Verletzte Nervenzellen des adulten ZNS können unter natürlichen Bedingungen nicht regenerieren. Entgegengesetzt dazu können sich Neurone im embryonalen Zustand erneuern. Diese Fähigkeit kann auch im adulten ZNS durch geeignete Stimuli zumindest teilweise wiedererlangt werden (siehe Einleitung). Es zeigte sich, dass durch das gezielte Ein- und Umschalten von Genen ein erneutes Wachstum verletzter Nervenzellen ermöglicht werden kann [28, 118]. In diesem Zusammenhang geht man davon aus, dass adulte Neurone grundsätzlich zur Regeneration befähigt sind, jedoch davon keinen Gebrauch machen können. Dementsprechend zeigen verletzte Nervenzellen eine andere Genaktivierung als regenerierende Nervenzellen [42, 28, 118]. Im regenerativen Status ist die Expression von wachstumsassoziierten Proteinen wie z.B. GAP-43 erhöht [42]. Trotz der wichtigen Rolle von GAP-43 bei der Regeneration, kann dieses Protein jene nicht induzieren. Benowitz *et. al* zeigten 1997, dass RGZ, die GAP-43 überexprimierten, keine verstärkte Regeneration aufwiesen [10].
Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe das Protein LINA identifiziert werden, das ebensfalls in regenerierenden Neuronen in einer höheren Konzentration vorliegt als in nicht regenerierenden Neuronen. Die Überexpression von LINA führte entgegengesetzt zu GAP-43 zu einer deutlichen Steigerung der Neuritogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Daten sind noch nicht veröffentlicht). Somit kommt diesem Protein eine wichtige Aufgabe bei der Regeneration und bei der Neuritogenese zu.

4.3.1 Einfluss von Myelin auf LINA

Die Regenerationsunfähigkeit des adulten ZNS ist hauptsächlich auf die hemmende Eigenschaft des Myelins, auf die Induktion der Apoptose und auf die mangelnde intrinsische Fähigkeit zurückzuführen [118, 140, 52]. Auf welche Art LINA die Regenerationsbereitschaft fördert, bleibt bislang ungeklärt. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre -ähnlich der Kinase ROCK- die Neutralisation der myelininhibitorischen Signalkaskade. Gegen diese These sprechen allerdings die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da die durch Überexpression von LINA hervorgerufene Wachstumssteigerung durch Myelin nicht beeinflussbar war. Aus dieser Beobachtung heraus und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass LINA in neugeborenen Ratten und im regenerativen Status in höherer Konzentration vorliegt (Daten sind noch nicht veröffentlicht), kann eine Verbesserung der intrinsischen Kapazität durch das Protein LINA vermutet werden.

4.3.2 Auswirkungen der Expressionshemmung von LINA

Der in dieser Arbeit konstruierte Vektor wurde verwendet, um die Auswirkung der LINA-Expressionshemmung auf das Wachstumsverhalten von PC-12 Zellen zu testen. Dabei zeigte sich, dass diese zu einer deutlichen Morphologieänderung führte. Da die Zellen weniger Fortsätze ausbildeten und auch der Zellkörper rundlicher und kleiner war, konnte mit diesem Experiment erneut die Bedeutung von LINA für die Neuritogenese untermauert werden. Mittels RT-PCT konnte zuvor die erfolgreiche Expressionshemmung von LINA durch siRNA verifiziert werden.
Weiter macht dieses Experiment deutlich, dass LINA von PC-12 Zellen exprimiert wird. (Dieses Experiment wurde durchgeführt, bevor ein Antikörper für LINA zur Verfügung stand.) Diese Beobachtung konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden: So war das Protein LINA auch in unbehandelten Zellen durch Immunhistochemie nachweisbar. Ebenso bestätigte die RT-PCR, dass LINA auch in untransfizierten Zellen identifizierbar war.
Weiterhin war zu beobachten, dass die LINA-Konzentration durch Zugabe von NGF erhöht werden konnte. NGF leitet bei PC-12 Zellen über den Rezeptor Thyrosin-Kinase A (TrkA) die Differenzierung ein, was mit dem Stopp der Proliferation und dem Beginn des Neuritenwachstums assoziiert ist [131]. Dementsprechend kann vermutet werden, dass der regenerationsfördernde Einfluss von LINA auf eine Modifikation der Genexpression zurückzuführen war. Ein Anreiz für die Zukunft wäre beispielsweise, den genauen Funktionsmechanismus von LINA aufzudecken und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren.

4.4 Unterschiedliche Ansatzpunkte zur Verbesserung des neuritogenen Wachstums

Wie in dieser Arbeit verdeutlicht gibt es multiple Strategien, das neuritogene Wachstum zu verbessern. Dieses Ziel konnte in dieser Arbeit in Zellkultur sowohl durch ROCK-Expressionshemmung als auch durch LINA-Überexpression erreicht werden. Jedoch riefen beide experimentelle Vorgehensweisen unterschiedliche Zellmorphologien hervor: In Einklang mit der Literatur erzeugte die Expressionshemmung von ROCK einen polygonalen Zellkörper mit einem langen, verzweigten Neuriten [27]. Diese Veränderung war hauptsächlich durch eine Modifikation des Aktinozytoskeletts bedingt.
Vergeichbar mit diesen Experimenten waren auch bei LINA-überexprimierten Zellen längere Neuriten zu beobachten als bei den Kontrollzellen. Im Gegensatz zu den ROCK-expressionsgehemmten Zellen besaßen dieses Zellen in der Regel einen Neuriten mit nur wenigen Verzweigungen. Die Morphologie war einem „echten“ Axon sehr ähnlich und die Verdichtung am Ende des Axons könnte als Wachstumskegel gedeutet werden. Daher kann angenommen werden, dass die Überexpression von LINA zu einer „echten“ Steigerung der Neuritogenese führt.

4.5 Ausblick

Aus dieser Arbeit gehen 3 wesentliche Aspekte hervor: Zum einen konnte ein siRNA-produzierender Vektor hergestellt werden. Wenngleich diese Technik (und dieser Vektor) sicherlich das Potential für Langzeitversuche besitzt, müssen die Ursachen für die konträren Effekte in Zellkultur und *in vivo* aufgedeckt werden.
Weiter konnte eine deutliche neuritogene Wachstumssteigerung durch die Expressionshemmung von ROCK in Zellkultur aufgezeigt werden. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob auch *in vivo* in gleichem Maß die Regeneration gesteigert werden kann.
Bezüglich der neuritogenen Eigenschaften von LINA könnte die Überexpression dieses Proteins ein neuer Ansatzpunkt für die Überwindung der Nichtregenerierbarkeit adulter Neurone des ZNS darstellen. Eine genauere Charakterisierung von LINA könnte zunächst durchgeführt werden.
Angesichts der komplexen Vorgänge im ZNS, die nach einer Verletzung eine Regeneration verhindern, könnten in Zukunft verschiedene Ansatzpunkte kombiniert werden. Beispielsweise wäre die gleichzeitige Applikation von RNAi ROCK zur Neutralisation der myelininhibitorischen Signalkaskade mit der Applikation von LINA zur Steigerung der Neuritogenese denkbar.

5 Zusammenfassung

Eine Verletzung des Axons führt bei Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) zu einem irreversiblen Funktionsverlust. Das Regenerationsdefizit des ZNS ist hauptsächlich durch folgende Ursachen begründet:

1. Die Nervenzellen des ZNS reagieren auf eine Axotomie mit Apoptose.
2. Die intrinsische Fähigkeit zum erneuten Auswachsen von Axonen ist bei Neuronen des ZNS sehr gering.
3. Das Myelin des ZNS enthält regenerationsinhibitorische Proteine.
4. Es kommt zur Narbenbildung, die für Axone nicht überwindbar ist.

Trotz vielversprechender Ansätze ist es bislang noch nicht gelungen, eine therapeutisch relevante Regeneration von Axonen zu erzielen. Das Protein *RhoA associated coiled-coil serine-threonine kinase* (ROCK) ist maßgeblich an der inhibitorischen Signaltransduktion beteiligt, die durch Myelin oder Faktoren des Narbengewebes aktiviert wird. Auch kommt diesem Protein eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose zu. Von dieser Kinase existieren zwei Isoformen, jedoch ist bislang unklar, welche von beiden die funktionell Bedeutende ist.
In dieser Arbeit sollte die Expression dieser Kinase (Isoform 1) gehemmt und dadurch die Regenerationsfähigkeit von Nervenzellen *in vivo* gesteigert werden. Unter Verwendung von Adeno-Assoziierten-Viren 2 (AAV-2) sollte ein *small-interfering*-RNA (siRNA) produzierender Vektor zur ROCK-Expressionshemmung in retinale Ganglienzellen (RGZ) eingebracht und dadurch eine Verbesserung des axonalen Wachtums erzielt werden.
Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Vektor hergestellt, der durch konstante Produktion von siRNA zur Expressionsunterdrückung von Proteinen eingesetzt werden konnte. Zusätzlich exprimierte dieser Vektor zur direkten Nachweismöglichkeit transfizierter Zellen das Reporterprotein *humanized Renilla reniformis green fluorescent protein* (hrGFP). Nach Herstellung dieses Vektors wurde dessen Effizienz und Funktionalität in Zellkultur getestet. Zunächst wurde ein siRNA-Haarnadelkonstrukt für das Protein *enhanced-green-fluorescent-protein* (eGFP) entworfen und dieses zur Expressionshemmung von eGFP in den Vektor eingebracht. Die Funktionsfähigkeit des Vektors konnte durch die Beobachtung verifiziert werden, dass alle mit dem Vektor transfizierten Gruppen eine deutliche Abnahme an Anzahl und Intensität fluoreszierender Zellen zeigten. Anschließend wurde der Vektor zur Expressionshemmung von ROCK (Isoform 1) verwendet. Die Funktionsfähigkeit dieses Vektors wurde mittels RT-PCR bestätigt, wo-

bei die mit dem Vektor transfizierten Zellen eine deutlich geringere ROCK-RNA-Konzentration aufwiesen als untransfizierte Zellen. Morphologisch führte die ROCK-Expressionshemmung auf PC-12 Zellen und 293-Zellen zu einem deutlich gesteigerten Neuritenwachstum. Auf Myelin (als regenerationsinhibitorisches Substrat) war eine signifikante Wachstumszunahme der Neuritenlänge um das 14-fache zu beobachten.
In einem nächsten Schritt wurde dieser Vektor mittels AAV-2 in RGZ eingebracht. Wenngleich in Zellkultur das verbesserte Neuritenwachstum eindeutig auf die ROCK-Expressionshemmung zurückzuführen war, führte die Applikation des siRNA-tragenden Vektors und die ROCK-Expressionshemmung *in vivo* zu einer reduzierten Anzahl an RGZ sowie zu einer reduzierten Anzahl an regenerierenden Axonen.
Dieser Befund könnte zum einen durch die geringe Anzahl verwendeter Versuchstiere begründet sein. Weiter könnte die die Technik der RNAi toxische Effekte hervorrufen. Auch kann eine hohe siRNA-Konzentration zelleigene microRNA von Enzymen verdrängen, so dass lebensnotwendige Funktionen nicht mehr aufrecht erhalten werden können. Weiterhin könnte dieses Resultat darauf hindeuten, dass in PC-12 Zellen hauptsächlich Isoform 1 an der Regenerationsinhibition beteiligt ist und somit die ROCK-Expressionshemmung zu einer Steigerung des Neuritenwachstums führte. Dementgegengesetzt könnte *in vivo* v.a. Isoform 2 wachstumshemmend wirken. Isoform 1 könnte für die Zelle notwendig sein, so dass eine verminderte ROCK-Konzentration zu einem schlechteren Wachstum und zu einem vermehrten Zelltod geführt hätte.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entdeckten Proteins *lens injury induced factor of neuronal outgrowth promoting activity* (LINA) auf Zellkulturebene.
Hierbei wurde festgestellt, dass PC-12 Zellen mit einem LINA-überexprimierenden Vektor transfiziert werden konnten und die Überexpression von LINA zu einer Steigerung des Neuritenwachstums um das Doppelte führte. Dieser Quotient blieb allerdings auf Myelin als regenerationsinhibitorisches Substrat und auf Poly-L-Lysin als regenerationspermissives Substrat gleich, so dass eine Neutralisation der Myelininhibitoren als Ursache für die Wachstumssteigerung ausgeschlossen werden konnte. Weiter zeigte sich in der quantitativen Bestimmung mittels real time RT-PCR sowie in der immunhistochemischen Färbung, dass LINA immer in einer Zelle vorhanden ist und die Proteinkonzentration durch Applikation des Wachstumsfaktors *nerve growth factor* (NGF) erhöht werden konnte. Der in dieser Arbeit konstruierte Vektor wurde zur Funktionstestung von LINA eingesetzt. Es war zu beobachten, dass die Expressionshemmung von LINA eine Morphologieänderung mit einem deutlich reduziertem Neuritenwachstum hervorrief. Dies deutete darauf hin, dass LINA bei der Neuritogenese und bei der Ausbildung der zelltypischen Morphologie eine wichtige Funktion zukommt.

6 Literaturverzeichnis

[1] Aguayo, AJ ; David, S ; Bray, GM: Influences of the glial environment on the elongation of axons after injury: Transplantation studies in adult rodents. *Journal of Experimental Biology* 95 (1981), 231–240

[2] Ahmed, Z ; Dent, R G. ; Suggate, E L. ; Barrett, L B. ; Seabright, R J. ; Berry, M ; Logan, A: Disinhibition of neurotrophine-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knock-down of NgR, $p75^{NTR}$ and RhoA. *Molecular and Cellular Neuroscience* 28 (2005), 509–523

[3] Amano, M ; Chihara, K ; Nakamura, N ; Fukata, Y ; Yano, T ; Shibata, M ; Ikebe, M ; Kaibuchi, K: Myosin 2 activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-Kinase. *Genes to Cells* 3 (1998), 177–188

[4] Amano, M ; Fukata, Y ; Kaibuchi, K: Regulation and functions of Rho-associated Kinase. *Experimental Cell Research* 261 (2000), 44–51

[5] Amano, M ; Ito, M ; Kimura, K ; Fukata, Y ; Chihara, K ; Nakano, T ; Matsuura, Y ; Kaibuchi, K: Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), 20246–20249

[6] Amano, M ; Maeda, M ; Goto, A ; Takahashi, H ; Ito, K ; Kaibuchi, K: Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase. *Biochemicals and Biophysical Research Communications* 273 (2000), 110–116

[7] Arimura, N ; Inagaki, N ; Chihara, K ; Menager, C ; Nakamura, N: Phosphorylation of collpasin response mediator protein-2 by Rho-kinase: Evidence for two seperate signaling pathways for growth cone collapse. *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), 23973–23980

[8] Aznar, S ; Lacal, J C.: Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Letters* 165 (2001), 1–10

[9] Bartsch, U ; Bandtlow, C E. ; Schnell, L ; Bartsch, S ; Spillmann, A A. ; Rubin, B P. ; Hillenbrand, R ; Montag, D ; Schwab, M E. ; Schachner, M: Lack of evidence that myelin-associated glycoprotein is a major inhibitor of axonal regeneration in the CNS. *Neuron* 15 (1995), 1375–1381

[10] Benowitz, L I. ; Routtenberg, A: GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neuroscience* 20 (1997), 84–91

[11] Bertil, Daneholt: Advanced Information on The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. *http://nobelprize.org* (2006)

[12] Bhargava, A ; Dallmanb, MF ; Pearcec, D ; Choi, S: Long double-stranded RNA-mediated RNA interference as a tool to achieve site-specific silencing of hypothalamic neuropeptides. *Brain Research Protocols* 13 (2004), 115–125

[13] Bhatt, D H. ; Otto, S J. ; Depoister, B ; Fetcho, J R.: Cyclic AMP-induced repair of zebrafish spinal circuits. *Science* 305 (2004), 254–258

[14] Bito, H ; Furuyashiki, T ; Ishihara, H ; Shibasaki, Y ; Ohashi, K ; Mizuno, K ; Maekawa, M ; Ishizaki, T ; Narumiya, Sz: A Critical Role for a Rho-Associated Kinase, p160ROCK, in Determining Axon Outgrowth in Mammalian CNS Neurons. *Neuron* 26 (2000), 431–441

[15] Bradbury, E J. ; Moon, L D. ; Popat, R J. ; King, V R. ; Bennett, G S. ; Patel, P N. ; Fawcett, J W. ; McMahon, S B.: Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416 (2002), 636–640

[16] Bray, G M. ; Villegas-Perez, M P. ; Vidal-Sanz, M ; Aguayo, A J.: The use of peripheral nerve grafts to enhance neuronal survival, promote growth and permit terminal reconnections in the central nervous system of adult rats. *Journal of Experimental Biology* 132 (1987), 5–19

[17] Bregman, B S. ; Kunkel-Bagden, E ; Reier, P J. ; Dai, H N. ; McAtee, M ; Gao, D: Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Experimental Neurology* 123 (1993), 5–16

[18] Brösamle, C ; Huber, A B. ; Fiedler, M ; Skerra, A ; Schwab, M E.: Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *Journal of Neuroscience* 20 (2000), 8061–8068

[19] Brummelkamp, T R. ; Bernards, R ; Agami, R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296 (2002), 550–554

[20] Cajal y, R ; May, R M.: Degeneration and regeneration of the nervous system. *University Press, London* 2 (1928), 52–58

[21] Campochiaro, PA: Potential Applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorder. *Gene Therapy* 13 (2006), 559–562

[22] Caroni, P ; Schwab, M E.: Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1 (1988), 85–96

[23] Chan, W Y. ; Yew, D T.: Apoptosis and Bcl-2 Oncoprotein Expression in the Human Fetal Central Nervous System. *The Anatomical Record* 252 (1998), 165–175

[24] Chen, M S. ; Huber, A B. ; Haar, M E. van der ; Frank, M ; Schnell, L ; Spillmann, A A. ; Christ, F ; Schwab, M E.: Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403 (2000), 434–439

[25] Cheng, H ; Cao, Y ; Olson, L: Spinal cord repair in adult paraplegic rats: Partial restoration of hind limb function. *Science* 273 (1996), 510–513

[26] Chivatakarn, O ; Kaneko, S ; He, Z ; Tessier-Lavigne, M ; Giger, RJ: The Nogo-66 Receptor NgR1 Is Required Only for the Acute Growth Cone-Collapsing But Not the Chronic Growth Inhibitory Actions of Myelin Inhibitors. *The Journal of Neuroscience* 27 (2007), 7117–7124

[27] Coleman, M L. ; Olson, M F.: Rho-GTPase signaling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 9 (2002), 493–504

[28] Condic, M L.: Adult neuronal regeneration induced by transgenic integrin expression. *Journal of Neuroscience* 21 (2001), 4782–4788

[29] Cullen, B R.: Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular Cell* 16 (2004), 861–865

[30] Davies, S P. ; Reddy, H ; Caivano, M ; Cohen, P: Specifity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* 351 (2000), 95– 105

[31] De Vries, M ; Cooper, H M.: Emerging roles for neogenin and its ligands in CNS development. *Journal of Neurochemistry* 10 (2008), 1111–1121

[32] Dergham, P ; Ellezam, B ; Essagian, C ; Avedissian, H ; Lubell, W D. ; McKerracher, L: Rho Signaling Pathway Targeted to Promote Spinal Cord Repair. *Journal of Neuroscience* 22 (2002), 6570–6577

[33] Dheen, S T. ; Kaur, C ; EA, Ling: Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Current Medical Chemistry* 14 (2007), 1189–97

[34] Dillon, S T. ; Feig, L A.: Purification and assay of recombinant C3 transferase. *Toronto: Academic* 6 (1995), 127–134

[35] Dubreuil, C I. ; Winton, M J. ; McKerracher, L: Rho activation pattern after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *Journal of Cell Biology* 162 (2003), 233–243

[36] Elbashir, S M. ; Harborh, J ; Lendeckel, W ; Yalcin, A ; Weber, K ; Tuschi, T: Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediated RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (2001), 494–498

[37] Esteve, P ; Embade, N ; Perona, R ; Jimenez, B ; Peso, L del ; Leon, J ; Arends, M ; Miki, T ; Lacal, J C.: Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene* 17 (1998), 1855–69

[38] Fan, YM ; Pang, CP ; Harvey, AR ; Cui, Q: Marked effect of RhoA-specific shRNA-producing plasmids on neurite growth in PC12 cells. *Neuroscience Letters* 440 (2008), 170–175

[39] Fawcett, J W. ; Asher, R A.: The glial scar and CNS repair. *Brain Research Bulletin* 49 (1999), 377–391

[40] Fire, A ; Xu, S ; Montgomery, M K. ; Kostas, S A. ; Driver, S E. ; Mello, C C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* 391 (1998), 744–745

[41] Fischer, D ; Heiduschka, P ; Thanos, S: Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats. *Experimental Neurology* 172 (2001), 257–272

[42] Fischer, D ; Petkova, V ; Thanos, S ; Benowitz, L I.: Switching Mature Retinal Ganglion Cells to a Robust Growth State In Vivo: Gene Expression and Synergy with RhoA Inactivation. *The Journal of Neuroscience* 24 (2004), 8726–8740

[43] Fish, R J. ; Kruithof, E K.: Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Molecluar Biology* 5 (2004), 276–284

[44] Flynn, P ; Mellor, H ; Casamassima, A ; Parker, P J.: Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), 11064–11070

[45] Fournier, A E. ; Takizawa, B T. ; Strittmatter, S M.: Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS. *Journal of Neuroscience* 23 (2003), 1416–1423

[46] Gehrmann, J: Microglia: a sensor to threats in the nervous system? *Virology* 147 (1996), 79–88

[47] Giulian, D: Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia* 7 (1993), 102–110

[48] Govek, EE ; Newey, S E. ; Van Aelst, L: The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes and Development* 19 (2005), 1–49

[49] GrandPre, T ; Nakamura, F ; Vartanian, T ; Strittmatter, S M.: Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403 (2000), 439–444

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

[51] Gustafsson, B A. ; Gottlieb, R A.: Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *American Journal of Physiology* 292 (2007), 45–51

[52] Harel, N Y. ; Strittmatter, S M.: Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? *Nature Reviews Neuroscience* 7 (2006), 603–616

[53] Harper, L ; Davidson, B L.: (Unveröffentlichte Befunde).

[54] Hauk, T G. ; Müller, A ; Lee, J ; Schwendener, R ; Fischer, D: Neuroprotective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or the presence of large numbers of activated macrophages. *Experimental Neurology* 209 (2008), 469–482

[55] Hirose, M ; Ishizaki, T ; Watanabe, N ; Uehata, M ; Kranenburg, O ; Moolenaar, W H. ; Matsumura, F ; Maekawa, M ; Bito, H ; Narumiya,

S: Rho Kinase Inhibition Enhances Axonal Regeneration in the Injured CNS. *Journal of Neuroscience* 23 (1998), 1416

[56] Hommel, J D. ; Sears, R M. ; Georgescu, D ; Simmons, D L. ; DiLeone, R J.: Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nature Medicine* 9 (2003), 1539–1544

[57] Huang, J K. ; Phillips, G R. ; Roth, A D. ; Pedraza, L ; Shan, W ; Belkaid, W ; Mi, S ; Fex-Svenningsen, A ; Florens, L ; Yates, J R. ; Coleman, D R.: Glial membranes at the nodes of ranvier prevent neurite outgrowth. *Science* 310 (2005), 1813–1817

[58] Hulsebosch, C E.: Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education* 26 (2002), 238–255

[59] Ishizaki, T ; Uehata, M ; Tamechika, I ; Keel, J ; Nonomura, K ; Maekawa, M ; Narumiya, M: Pharmacological Properties of Y-27632, a Specific Inhibitor of Rho-Associated Kinases. *Molecular Pharmacology* 57 (2000), 976–983

[60] Jackson, A L. ; Linsley, P S.: Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends in Genetics* 20 (2004), 521–524

[61] Jenuwein, T ; Allis, C D.: Translating the histone code. *Sciene* 293 (2001), 1074–1080

[62] Jimenez, B ; Arends, M ; Esteve, P ; Perona, R ; Sanchez, R ; Cajal, S Ramon y ; Wyllie ; Lacal, J C.: Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene* 10 (1995), 811–816

[63] Julian, N G. ; Liqun, L: RhoGTPase regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathway. *Neuron* 44 (2004), 779–793

[64] Juliano, R ; Alam, MR ; Dixit, V ; Kang, H: Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 36 (2008), 4158–4171

[65] Kandel, E R. ; Schwartz, J H. ; Jessell, T M.: Principles of Neural Science. *McGraw- Hill Medical* 4 (2000), 12–14

[66] Kawasaki, H ; Kazunari, T: Inducing of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 43 (2004), 211–217

[67] Kawasaki, H ; Taira, K: Short hairpin type of dsRNA that are controlled by $tRHA-Val$ promotor significantly induce RNAi mediated gene silencing in the cytoplasma of human cells. *Nucleid Acids Research* 31 (2003), 700–707

[68] Ketting, R F. ; Haverkamp, T H. ; Luenen, H G. van ; Plasterk, R H.: Mut-7 of C. elegans, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase D. *Cell* 99 (1999), 133–141

[69] Kim, J E. ; Li, S ; GrandPre, T ; Strittmatter, S M.: Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron* 38 (2003), 187–199

[70] Kim, J E. ; Liu, B ; Park, J H. ; Strittmatter, S M.: Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury. *Neuron* 44 (2004), 439–451

[71] Kimura, K ; Ito, M ; Amano, M ; Chihara, K ; Fukata, Y ; Nakafuku, M ; Yamamori, B ; Feng, J ; Nakano, T ; Okawa, K ; Iwamatsu, A ; Kaibuchi, K: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273 (1996), 245–248

[72] Kong, X ; Zhang, W ; Lockey, R F. ; Auais, A ; Piedimonte, G ; Mohapatra, S S.: Respiratory syncytial virus infection in Fischer 344 rats is attenuated by short interfering RNA against the RSV-NS1 gene. *Genetic Vaccines and Therapy* 5 (2007), 278–284

[73] Kottis, V ; Thibault, P ; Mikol, D ; Xiao, Z C. ; Zhang, R ; Dergham, P ; Braun, P E.: Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *Journal of Neurochemistry* 82 (2002), 1566–1569

[74] Koyama ; Ito, M ; Feng, J ; Seko, T ; Shiraki, K ; Takase, K ; Hartshorne, D J. ; Nakano, T: Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Letters* 475 (2000), 197–200

[75] Krajewska, M ; Mai, J K. ; Zapata, J M. ; Ashwell, K W S. ; Schendel, S L. ; Reed, J C. ; Krajewski, S: Dynamics of expression of apoptosis-regulatory proteins Bid, Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak during development of murine nervous system. *Cell Death and Differentiation* 9 (2002), 145–157

[76] Kubo, T ; Yamaguchi, A ; Iwata, N ; Yamashita, T: The therapeutic effect of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Therapeutic Clinical Risk Manager* 4 (2008), 605–615

[77] Lehmann, M ; Fournier, A ; Selles-Navarro, I ; Dergham, P ; Sebok, A ; Leclerc, N ; Tigyi, G ; McKerracher, L: Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. *Journal of Neuroscience* 19 (1999), 7537–7547

[78] Leon, S ; Yin, Y ; Nguyen, J ; Irwin, N ; Benowitz, L I.: Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *Journal of Neuroscience* 220 (2000), 4615–4626

[79] Li, S ; Kim, J E. ; Budel, S ; Hampton, T G. ; Strittmater, S M.: Trangenic inhibition of Nogo-66 receptor function allows axonal sprouting and improved locomotion after spinal injury. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29 (2005), 26–39

[80] Maekawa, M ; Ishizaki, T ; Boku, S ; Watanabe, N ; Fujita, A: Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinase ROCK and LIM-kinase. *Science* 285 (1999), 895–898

[81] Mansour, S L. ; Thomas, K R. ; Capecchi, M R.: Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336 (1988), 348–352

[82] Matzke, M A. ; Birchler, J A.: RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nature* 6 (2005), 24–35

[83] McCaffey, A P. ; Nakai, H ; Pandey, K ; Huang, Z ; Salazar, F H. ; Xu, H ; Wieland, S F. ; Marion, P L. ; Kay, M A.: Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nature Biotechnology* 21 (2003), 639–44

[84] McDonald, J W. ; Liu, X Z. ; Qu, Y ; Liu, S ; Mickey, S K. ; Turetsky, D ; Gottlieb, D I. ; Choi, D W.: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine* 5 (1999), 1410–1412

[85] McKeon, R J. ; Schreiber, R C. ; Rudge, J S. ; Silver, J: Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scaring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *Journal of Neuroscience* 11 (1991), 3398–3411

[86] McKerracher, L: Spinal cord repair: strategies to promote axon regeneration. *Neurobiology of Disease* 8 (2001), 11–18

[87] McKerracher, L ; David, S ; Jackson, D L. ; Kottis, V ; Dunn, R J. ; Braun, P E.: Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13 (1994), 805–811

[88] Menet, V ; Prieto, M ; Privat, A ; Ribotta, M Giménez y: Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), 8999–9004

[89] Mocellin, S ; Maurizio, P: RNA interference: learning gene knock-down form cell physiology. *Journal of Translational* 2 (2004), 39–40

[90] Monnier, P P. ; Sierra, A ; Schwab, J M. ; Henke-Fahle, S ; Mueller, B K.: The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth inhibitory associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Molecular and Cellular Neuroscience* 22 (2003), 319–330

[91] Moreau-Fauvarque, C ; Kumanogoh, A ; Camand, E ; Jaillard, C ; Barbin, G ; Boquet, I ; Love, C ; Jones, E Y. ; Kikutani, H ; Lubetzki, C ; Dusart, I ; Chédotal, A: The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *Journal of Neuroscience* 23 (2003), 9229–9239

[92] Mueller, A ; Hauk, T G. ; Fischer, D: Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain* 130 (2007), 3308–3320

[93] Mukhopadhyay, G ; Doherty, P ; Walsh, F S. ; Crocker, P R. ; Filbin, M T.: A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13 (1994), 757–767

[94] Nagata, K ; Takei, N ; Nakajima, K ; Saito, H ; Kohsaka, S: Microglia conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *Journal of Neuroscience* 34 (1994), 357–363

[95] Nakagawa, O ; Fujisawa, K ; Ishizaki, T: ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Letters* 392 (1996), 189–193

[96] Nakamura, T ; Aoki, K ; Matsuda, M: FRET imaging in nerve growth cones reveals a high level of RhoA activity within the peripheral domain. *Molecular Brain Research* 139 (2005), 277–287

[97] National-Human-Genome-Research-Institute: *Knockout Mice*. http://www.genome.gov/12514551: , 2007. – [Online; Stand 25. Juni 2008]

[98] Neumann, H ; Schweigreiter, R ; Yamashita, T ; Rosenkranz, K ; Wekerle, H ; Barde, Y A.: Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience* 22 (2002), 854–862

[99] Nybakken, K ; Vokes, SA ; Lin, TY ; McMahon, AP ; Perrimon, N: A genome-wide RNA interference screen in Drosophila melanogaster cells for new components of the Hh signaling pathway. *Nature Genetics* 37 (2005), 1323 – 1332

[100] Ohashi, K ; Nagata, K ; Maekawa, M ; Ishizaki, T ; Narumiya, S: Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), 3577–3582

[101] Piazzolla, D ; Meissl, K ; Kucerova, L ; Rubiolo, C ; Baccarini, M: Raf1 sets the threshold of Fas sensitivity by modulation Rock-alpha signaling. *Journal of Cell Biology* 171 (2005), 1013–1022

[102] Planchamp, V ; Bermel, C ; Tönges, L ; Ostendorf, T ; Kügler, S ; Reed, JC ; Kermer, P ; Bähr, M ; Lingor, P: BAG1 promotes axonal outgrowth and regeneration in vivo via Raf-1 and reduction of ROCK activity. *Brain* 131 (2008), 2606–2619

[103] Profyris, C ; Cheema, S S. ; Zang, D ; Azari, M F. ; Boyle, K ; Petratos, S: Degenerative and regenerative mechanism governing spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 15 (2003), 415–436

[104] Profyris, C ; Cheema, S S. ; Zang, D ; Azari, M F. ; Boyle, K ; Petratos, S: Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* 15 (2004), 415–436

[105] Rabchevsky, A G. ; Streit, W J.: Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience Research* 47 (1997), 34–48

[106] Raibon, E ; Sauve, Y ; Carter, D A. ; Gaillard, F: Microglial changes accompanying the promotion of retinal ganglion cell axonal regeneration into peripheral nerve grafts. *Journal of Neurocytology* 13 (2002), 57–71

[107] Razin, A: CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *The EMBO Journal* 17 (1998), 4905–4908

[108] Reboredo, M ; Kramer, MG ; , C ; Prieto, J ; De Las Rivas, J: Transcriptomic effects of TET-on and Mifepristone inducible systems in mouse liver. *Human Gene Therapy* 21 (2008), 563–572

[109] Reich, S J. ; Fosnot, J ; Kuroki, A ; Tang, W ; Yang, X ; Bennett, H J. ; Tolentino, M J.: Small interferning RNA (siRNA) targeting VEGEF affevtively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Molecular Vision* 9 (2003), 210–216

[110] Ridley, A J. ; Schwartz, M A. ; Burridge, K ; Firtel, R A. ; Ginsberg, M H. ; Borisy, G ; Parsons, J T. ; Horwitz, A R.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302 (2003), 1704– 1709

[111] Ritter, M R. ; Banin, E ; Moreno, S K. ; Aguilar, E ; Dorrel, M I. ; Friedlander, M: Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *Journal of Clinical Investination* 116 (2006), 3266–3276

[112] Robbins, M A. ; Rossi, J J.: Sensing the danger in RNA. *Nature Medicine* 11 (2005), 250–251

[113] Salucci, V ; Scarito, A ; Aurisicchio, L ; Lamartina, S ; Nicolaus, G ; Giampaoli, S ; Gonzalez-Paz, O ; Toniatti, C ; Bujard, H ; Hillen, W ; Cilibert, G ; Palombo, F: Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2s-M2 tetracycline transactivator and repressor system. *Gene Therapy* 9 (2002), 1415–1421

[114] Scacheri, P C. ; Rozenblatt-Rosen, O ; Caplen, N J. ; Wolfsberg, T G. ; Umayam, L ; Lee, J C. ; Hughes, C M. ; Shanmugam, K S. ; Bhattacharjee, A ; Meyerson, M: Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (2004), 1892–1897

[115] Schnell, L ; Schwab, M E.: Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an anitbody against myelin- associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343 (1990), 269–272

[116] Sebbagh, M ; Hamelin, J ; Bertoglio, J: Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in caspase independent manner. *Journal of Experimental Medicine* 201 (2005), 465–471

[117] Sebbagh, M ; Renvoize, C ; Hamelin, J: Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation wnd apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* 3 (2001), 346–352

[118] Silver, J ; Miller, J M.: Regeneration beyond the glial scar. *Nature* 5 (2004), 146–156

[119] Song, X Y. ; Zhong, J H. ; Wang, X ; Zhou, X F.: Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice. *Journal of Neuroscience* 24 (2004), 542–546

[120] Spagnou, S ; Miller, AD ; Keller, M: Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 43 (2004), 834–841

[121] Stratagene: *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit.* 200518-12. California: Stratagene (Veranst.), 2005

[122] Stratagene: *AAV Helper-Free System.* 240071. California: Stratagene (Veranst.), 2006

[123] Stratagene: *Don't let a toxic GFP skew your results.* 2006. – URL `http://www.stratagene.com/newsletter/pdf`. – [Online; Stand 27. Dezember 2006]

[124] Stratgene: *PCR-Script Amp Cloning Kit.* California: Stratagene (Veranst.), 2006

[125] Su, Y ; Wang, F ; Zhao, S ; Pan, S ; Liu, P ; Teng, Y ; Cui, H: Axonal regeneration after optic nerve crush in Nogo-A/B/C knockout mice. *Molecular Vision* 14 (2008), 268–273

[126] Sui, G ; Soohoo, C ; Affar, E B. ; Gay, F ; Shi, Y ; Forrester, W C. ; Shi, Y: A DNA vector-based RNAi technology to supress gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Science* 99 (2002), 5515–5520

[127] Summerford, C ; Samulski, R J.: Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology* 72 (1998), 1438–1445

[128] Tabara, H ; Sarkissian, M ; Kelly, G W. ; Fleenor, J ; Grishok, A ; Timmons, L ; Fire, A ; Mello, C C.: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans. *Cell* 99 (1999), 123–132

[129] Thuret, S ; Moon, L D F. ; Gage, F H.: Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature* 7 (2006), 628–643

[130] Tom, V J. ; Doller, C M. ; Silver, J: Promoting regeneration of dystrophic axons. *Society for Neuroscience abstract* 635 (2002), 14–17

[131] Vaudry, D ; Stork, S P J. ; Lazarovici, P ; Eiden, L E.: Signaling pathways for PC-12 cell differentiation: making the right connection. *Science* 296 (2002), 1648–1649

[132] Verdier, V ; Chen, G C. ; Settleman, J: Rho-kinase regulates tissue morphogenesis via non-muscle myosin and LIM-kinase during *Drosophila* development. *BMC Developmental Biology* 6 (2006), 865–671

[133] Wang, L H. ; Strittmatter, S M.: A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *Journal of Neuroscience* 16 (1996), 6197–6207

[134] Woo, S ; Gomez, T M.: Rac1 and RhoA promote neurite outgrowth through formation and stabilization of growth cone point contacts. *Journal of Neuroscience* 26 (2006), 1418–1428

[135] Xia, H ; Mao, Q ; Eliason, S L. ; Harper, S Q. ; Martins, I H. ; Orr, H T. ; Paulson, L P. ; Yang, L ; Kotin, R M. ; Davidson, B L.: RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a modle of spinocerebellar ataxia. *Nature Medicine* 8 (2004), 816–820

[136] Xia, H ; Mao, Q ; Paulson, H L. ; Davidson, B L.: siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology* 20 (2002), 1006–1010

[137] Yamashita, T ; Tohyama, M: The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature Neuroscience* 14 (2003), 14–15

[138] Yao, K ; Lu, H ; Cheng, H ; Zhou, R: Mutation of siRNA results in thermodynamically unstable duplex which influences knockdown of dmrt1 by RNA interference. *Frontiers in Bioscience* 11 (2006), 2623–30

[139] Yin, Y ; Cui, Q ; Li, Y ; Irwin, N ; Fischer, D ; Harvey, A R. ; Benowitz, L I.: Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *Journal of Neuroscience* 23 (2003), 2284–2293

[140] Yiu, G ; He, Z: Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature* 7 (2006), 617–627

[141] Yuan, Q: Review: Strategies for Neuronal Regeneration after Spinal Cord Injury. *Journal of Young Investigators* 16 (2007), 135–144

[142] Zhao, Y ; Srivastava, D: A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Science* 32 (2007), 189–197

[143] Zheng, B ; Atwal, J ; Ho, C ; Case, L ; He, X-L ; Garcia, K C. ; Steward, O ; Tessier-Lavigne, M: Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo. *The Proceedings of National Academic Sciences USA* 102 (2005), 1205–1210

[144] Zheng, B ; Ho, C ; Li, S ; Keirstead, H ; Steward, O ; Tessier-Lavigne, M: Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice. *Neuron* 38 (2003), 213–224

[145] Zhou, Z ; Meng, Y ; Asrar, S ; Todorovski, Z ; Jia, Z: A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function. *Neuropharmacology* 8 (2008), 712–719

[146] Zubair, A ; Mazibrada, G ; Seabright, R J. ; Dent, R G. ; Berry, M ; Logan, A: TACE-induced cleavage of NgR and $P75^{NTR}$ in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin. *The FASEB Journal* 20 (2006), 1939–1941

Anhang

Klonierungen

1. Klonierung Plasmid: CMVs in SK+, Größe: 3.6 kb

Tabelle 13: Herstellung des Plasmids CMVs in SK+

	gewonnen durch	Größe
Insert (CMVs)	Polymerasekettenreaktion Primer CMVs reverse und CMVs forward Template DNA: pAAV-hrGFP (Stratgene)	621 bp
Backbone	pPCR-Script Amp SK+ (Stratagene)	3.0 kb

Primer CMVs reverse	5' CGG ACC GAC TAG TAT CAA TTG ACG GTT CAC TAA ACG AGC 3'
Primer CMVs forward	5' CGG ACC GAC GCG TGG AGC TAG TTA TTA A 3'

2. Klonierung Plasmid: RNAi GFP SK+, Größe: 3.6 kb (vgl. Abb 18)

Tabelle 14: Herstellung des Plasmids RNAi GFP SK+

	gewonnen durch	Größe
Insert	Polymerasekettenreaktion Primer RNAi GFP und CMVs forward Template DNA: CMVs in SK+	680 bp
Backbone	pPCR-Script TM Amp SK+ (Stratagene)	3.0 kb

Primer RNAi GFP	5' ACT AGT TTT ATT ACA AGC TGG AGT ACA ACT ACT GAC AGG AAG GTA GTT GTA CTC CAG CTT GTC ATT TGA CGG TTC ACT AAA 3'



Abbildung 18: Klonierung des Plasmids RNAi GFP SK+

3. Klonierungen Plasmide: RNAi ROCK1 SK+ bzw. RNAi ROCK2 SK+, Größe: 3.6 kb

Tabelle 15: Herstellung der Plasmide RNAi ROCK1 SK+ und RNAi ROCK2 SK+

	gewonnen durch	Größe
Insert 1	Polymerasekettenreaktion Primer RNAi ROCK1 und CMVs forward Template DNA: CMVs in SK+	680 bp
Insert 2	PCR Primer RNAi ROCK2 und CMVs forward Template DNA: CMVs in SK+	680 bp
Backbone	pPCR-Script TM Amp SK+ (Stratagene)	3.0 kb

Zur Konstruktion der siRNA-Sequenz diente die Nukleotidabfolge des Genoms *Rattus norvegicus Rho-associated coiled-coil forming 1 (ROCK)* als Vorlage.
Die 20 bp der RNAi Expression sind identisch mit folgenden Stellen:
ROCK1: Nukleotidnummer 110-129: ATG TCG ACT GGG GAC AGT TT
ROCK2: Nukleotidnummer 2946-2965: ATG CGC TAA CCA AAG ATA TT

Primer RNAi ROCK1 5' ACT AGT TTT ATT ATG TCG ACT GGG GAC AGT TTT GAC AGG AAG AAA CTG TCC CCA GTC GAC ATG AAT TGA CGG TTC ACT AAA 3'

Primer RNAi ROCK2 5' ACT AGT TTT ATT ATG CGC TAA CCA AAG ATA TTT GAC AGG AAG AAT ATC TTT GGT TAG CGC ATC AAT TGA CGG TTC ACT AAA 3'

4. Klonierungen Plasmide: LINA RNAi1 bzw. LINA RNAi2, Größe: 4.6 kb

Tabelle 16: Herstellung der Plasmide LINA RNAi1 und LINA RNAi2

	gewonnen durch	Größe
Insert 1	Polymerasekettenreaktion Primer RNAi LINA1 und CMVs forward Template DNA: CMVs in SK+	680 bp
Insert 2	PCR Primer RNAi LINA2 und CMVs forward Template DNA: CMVs in SK+	680 bp
Backbone	pCR 2.1-TOPO (Invitrogen)	3.9 kb

Primer RNAi LINA1 XXXXX

Primer RNAi LINA2 XXXXX

5. Klonierung Plasmid: RNAi ROCK, Größe: 5.9 bp

Tabelle 17: Herstellung des Plasmids RNAi ROCK

	gewonnen durch	Größe
Insert	Verdau: Plasmid RNAi ROCK2 SK+ Restriktionsstellen: EcorV und SpeI (enthält CMVs und RNAi Rock2)	714 bp
Backbone	Verdau: „mutierter“ Vektor: pAAV-hrGFP Restriktionsstellen: EcoRV und SpeI	5.3 kb

Mit Hilfe des Mutagenesis Kit (Invitrogen) wurde vor Klonierung in den Vektor pAAV-hrGFP an Stelle 2573 die zusätzlichen Schnittstellen EcoRV, XbaI und SpeI (insgesamt 20 bp) eingefügt.

6. Klonierung Plasmid: KombiPlasmid, Größe 7.2

Tabelle 18: Herstellung des Plasmids KombiPlasmid

	gewonnen durch	Größe
Insert	Verdau: Vektor RNAi ROCK Restriktionsstellen: PvuI und NotI T_4-Polymerase: blunt end Alkalische Phosphatase-Behandlung	3161 bp
Backbone	Verdau: Plasmid AAV-M2-IGFP Restriktionsstellen: SphI und SpeI T_4-Polymerase: blunt end	4087 bp

Die Vorgehensweise der Klonierung sind im folgenden Diagramm ersichtlich (vgl. Abb. 19).

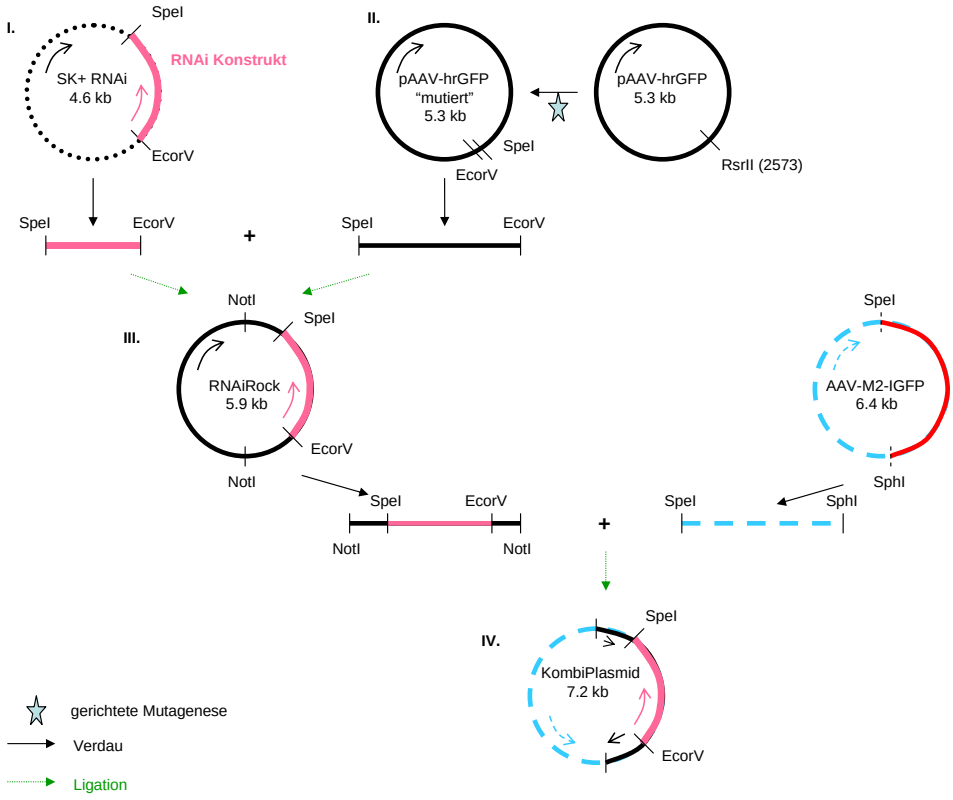

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Klonierungen:
I. Klonierung des Plasmids RNAi ROCK SK+
II. Gerichtete Mutagenese: In den Vektor pAAV-hrGFP wurden die zwei zusätzlichen Schnittstellen SpeI und EcorV eingefügt
III. Nach Ligation entstand der Vektor RNAi ROCK. Dieser wurde mit dem Enzym NotI geöffnet und mit dem Plasmid AAV-M2-IGFP nach T_4-Behandlung ligiert, das an den Restriktionstellen SpeI und SphI aufgeschnitten worden war
IV. Nach Ligation entstand das KombiPlasmid.

Transfektionsansätze

Tabelle 19: Transfektionsansätze mit Lipofektamin

Ansatz	Plasmide	Menge	Anzahl	Zusätze	Zellart
1	RNAi GFP SK+ GFP	50% 50%	4 x	-	PC-12, RGZ
Kontrolle 1	SK+ GFP	50% 50%	4 x	-	PC-12, RGZ
2a	RNAi ROCK2 Sk+ GFP	75% 25%	4 x	-/NFG	RGZ, PC-12
2b	RNAi ROCK1 SK+ GFP	75% 25%	4 x	-/NGF	RGZ, PC-12
Kontrolle 2	SK+ GFP	75% 25%	4 x	-/NGF	RGZ, PC-12
3	RNAi LINA2 Topo GFP	75% 25%	8 x	NGF	PC-12
Kontrolle + 3	LINA-HA GFP	75% 25%	4 x	NGF	PC-12
Kontrolle - 3	IRES GFP	75% 25%	4 x	NGF	PC-12
4	RNAi ROCK2	100 %	4 x	NGF	PC-12
4a	RNAi ROCK2 SK+ GFP	75% 25%	4 x	NFG	PC-12
Kontrolle 4	pAAV-hrGFP	100%	4 x	NGF	PC-12
5	KombiPlasmid	100%	4 x	NGF	PC-12
5a	pAAV-hrGFP	100%	4 x	NGF	PC-12
6	RNAi LINA1 GFP	75% 25%	2 x	NGF	PC-12
Kontrolle 6	IRES GFP	75% 25%	2 x	NGF	PC-12
7	LINA-HA GFP	75% 25%	4 x	NGF	PC-12
Kontrolle 7	IRES GFP	75% 25%	4 x	NGF	PC-12

NGF-Zugabe (Endkonzentration 50 μM)

Tabelle 20: Transfektionsansätze mit Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Ansatz	Plasmide	Menge	Anzahl	Zusätze	Zellart
1	RNAi GFP SK+	50%	4 x	-	293
	GFP	50%	4 x	-	293
Kontrolle 1	SK+	50%	4 x	-	293
	GFP	50%	4 x	-	293
2a	RNAi ROCK2 SK+	75%	4 x	-	RGZ
	GFP	25%			
Kontrolle 2	SK+	75%	4 x	-	RGZ
	GFP	25%			

Verwendete Vektoren

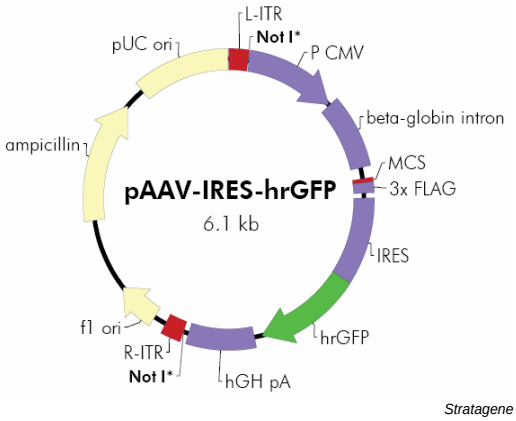

Abbildung 20: Schematische Darstellung des Vektors pAAV-IRES-hrGFP (Ires-GFP, IRES)

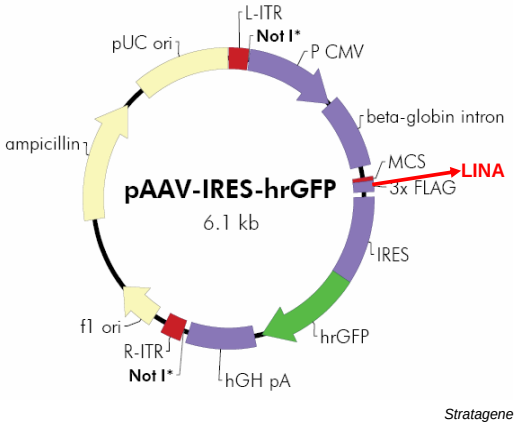

Abbildung 21: Schematische Darstellung des Vektors LINA-IRES (Lina-HA)

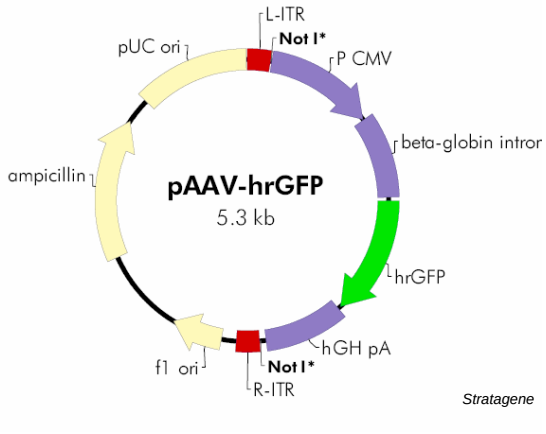

Abbildung 22: Schematische Darstellung des Vektors pAAV-hrGFP

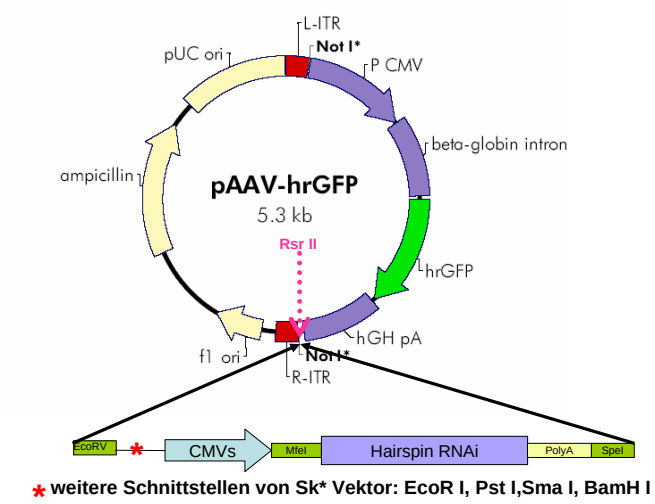

Abbildung 23: Schematische Darstellung des Vektors RNAi ROCK

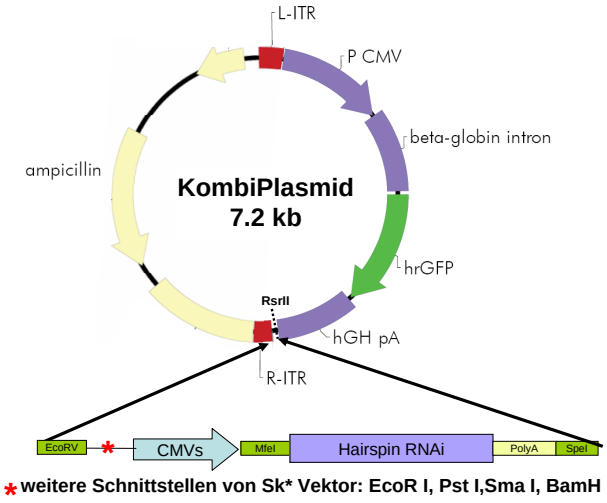

Abbildung 24: Schematische Darstellung des Vektors KombiPlasmid

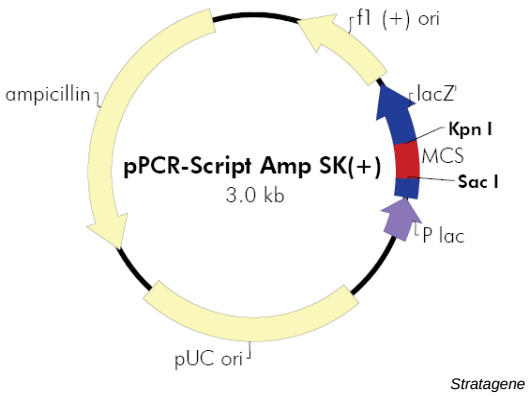

Abbildung 25: Schematische Darstellung des Vektors pPCR-Skript-Amp-SK+ (Sk+)

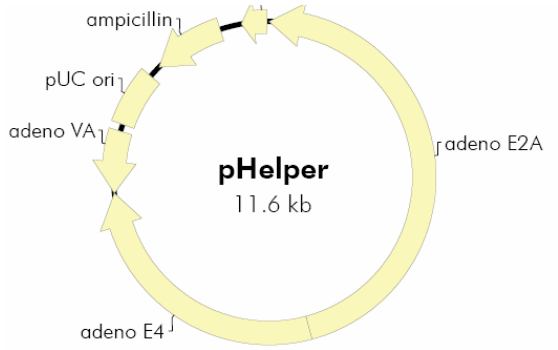

Abbildung 26: Schematische Darstellung des Vektors pHelper

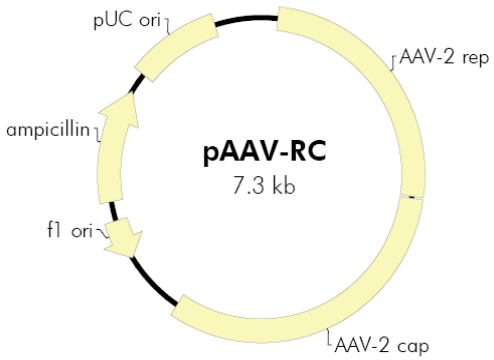

Abbildung 27: Schematische Darstellung des Vektors pAAV-RC

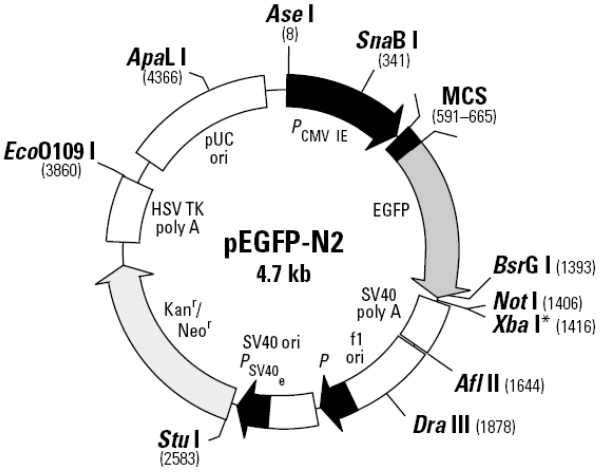

Abbildung 28: Schematische Darstellung des Vektors GFP

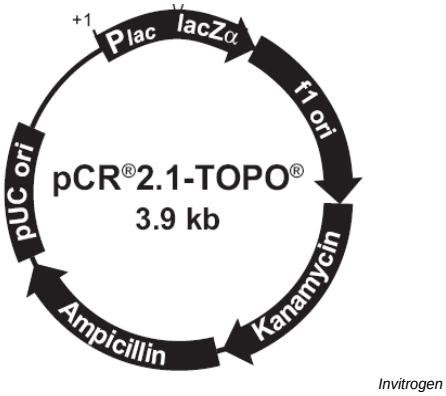

Abbildung 29: Schematische Darstellung des Vektors Topo

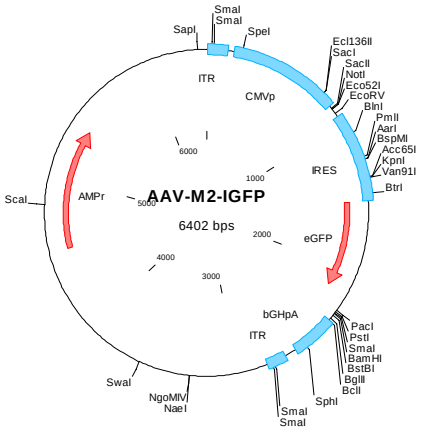

Abbildung 30: Schematische Darstellung des Vektors pAAV-M2-IGFP

Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dietmar Fischer für das interessante Thema meiner Doktorarbeit und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Motivation und Erfahrung immer wieder vorangetrieben.

Ein Dankeschön auch an meine Kollegen Dr. Thomas Hauk, Dr. Jieun Lee und Adrienne Müller, die mir die Grundsätze der Laborarbeit beibrachten und mich stets fachlich und moralisch bei meiner Doktorarbeit unterstützten.

Vor allem möchte ich aber meinen Eltern Prof. Dr. Albert und Barbara Nonnenmacher dafür danken, dass sie mir stets bei all meinem Tun helfen und an mich glauben.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann Stefan. Er stand mir tatkräftig bei der Fertigstellung der Arbeit zur Seite und hat mir die dafür nötige Kraft und Ausdauer gegeben.

Lebenslauf

Name	Lisa Nonnenmacher
Geburtsdatum	02.06.1982
Geburtsort	Filderstadt
Anschrift	An der kleinen Donau 3 89231 Neu-Ulm
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulische Ausbildung	1989-1993 Grundschule der Pestalozzi-Schule Rohr 1993-2001 Hegel-Gymnasium Rohr 2001 Allgemeine Hochschulreife
Studium	2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm Austauschsemester in Oulu, Finnland, 2004 Wissenschaftliches Forschungsprojekt in London, Canada, 2005 Abschnitt des Praktischen Jahrs in Boston, USA, 2007 Abschnitt des Praktischen Jahrs in Frauenfeld, Schweiz, 2007 2008 Approbation
Beruflicher Werdegang	Seit 2008 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Ulm