

4 Ergebnisse

4.1 Versuche mit siRNA

4.1.1 Austestung der Transfektionsbedingungen von siRNA an primären humanen Myoblasten

Zur Austestung der optimalen Transfektionsbedingungen für primäre humane Myoblasten wurden die in Tabelle 9 genannten Dys+ Muskelzellen verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Dys+ Muskelzellen(Kontrollen). Die Zellen 2/00, 14/01 und 18/01 stammten aus der Zell- und Gewebekulturbank in München. Eine Muskeldystrophie wurde bei den Patienten ausgeschlossen. Die SKMC Zellen wurden von der Firma Promocell bezogen.

Patient	Einstufung	Alter bei Biopsie
SKMC	Kontrolle	9 Jahre
2/00	Kontrolle	1 Jahr
14/00	Kontrolle	2 Jahre
18/01	Kontrolle	9 Jahre

Bei den Transfektionsreagenzien, die zur Austestung zur Verfügung standen, handelte es sich bei Oligofectamine um ein lipidbasiertes Transfektionsreagenz, welches für die Transfektion von DNA in Zellen entwickelt wurde; bei Genesilencer und siPort handelte es sich um Reagenzien, die speziell für die Transfektion von siRNA entwickelt wurden. Die zur Testung verwendete siRNA gegen GapDH stammt aus dem „Constuction Kit“ der Firma Ambion und war bereits an Zellen verschiedener Organismen getestet worden. Es wurde, wenn genügend Zellen zur Verfügung standen, nach 24, 48, 72 und 140 Stunden sowohl Protein als auch RNA isoliert, um die Wirksamkeit der siRNA anhand der Reduktion des GapDH Protein- bzw. mRNA-Niveaus nachzuweisen.

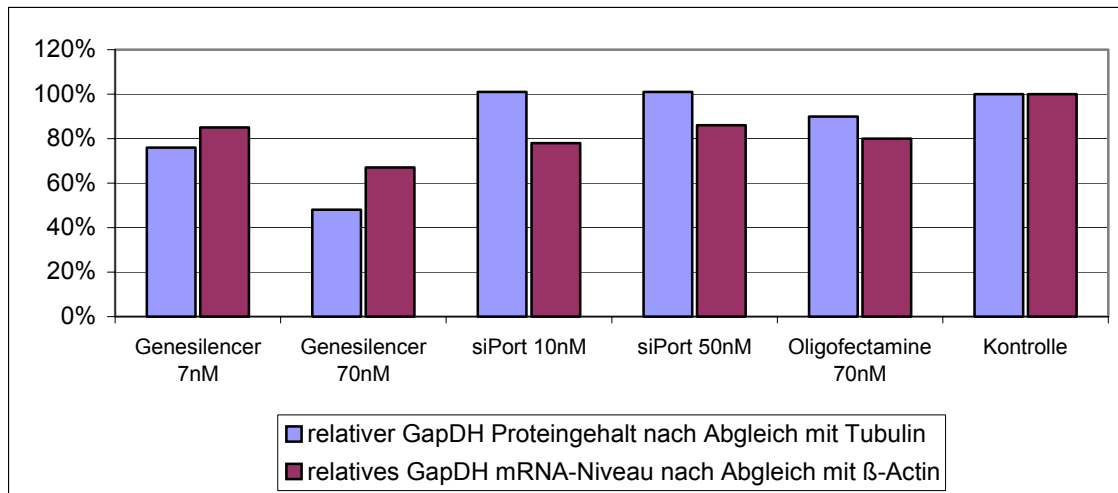


Abbildung 7: Vergleich der Effizienz der Transfektionsreagenzien Genesilencer, siPort und Oligofectamine unter Verwendung einer GapDH siRNA an Dys+ Myoblasten. Für das Reagenz Genesilencer wurden 7nM und 70nM siRNA getestet. Unter Verwendung von siPort wurden 10nM und 50nM siRNA eingesetzt. Mit dem Reagenz Oligofectamine wurden 70nM siRNA transfiziert. Der GapDH Proteingehalt wurde 140 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die GapDH Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Das GapDH mRNA-Niveau wurde durch semiquantitative PCR 24 Stunden nach Transfektion bestimmt und β -Actin wurde als interner Standard verwendet. Die mRNA Daten sind Mittelwerte zweier PCR-Reaktionen. Alle Werte sind in % zur untransfizierten Kontrolle dargestellt.

Die Versuche zeigten, dass die Reduktion des Proteingehaltes erst nach 72 bzw. 140 Stunden detektierbar war, während die Reduktion auf mRNA Ebene schon nach 24 Stunden nachgewiesen werden konnte. Unter Verwendung des Transfektionsreagenz Genesilencer und 70nM siRNA kam es zu einer Reduktion im Proteingehalt um 52% und einer Reduktion im mRNA-Niveau um 38% (Abb. 7 und 8). Bei einer geringeren siRNA Konzentration kam es zu einer Proteinreduktion von 24% und einer mRNA-Reduktion von lediglich 15%. Das Transfektionsreagenz siPort zeigte mit einer siRNA Konzentration von 50nM bzw. 10nM keine Reduktion im GapDH Proteingehalt und eine Reduktion im GapDH mRNA-Niveau von 16% bei 50nM und 23% bei 10nM.

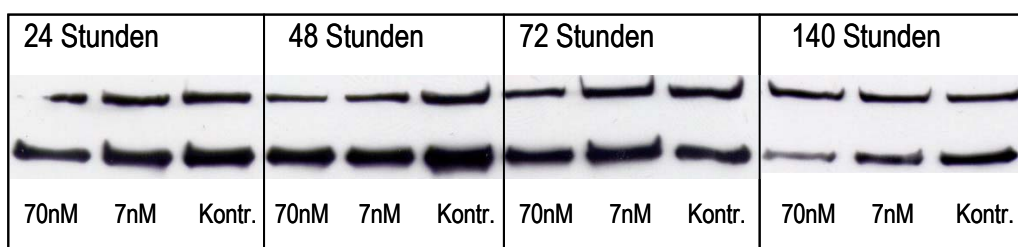


Abbildung 8: Autoradiogramm eines Westernblots mit 20 μ g Protein aus Dys+ SKMC Zellen. Es wurden 7nM und 70nM siRNA gegen GapDH mit Genesilencer transfiziert und Proben nach 24, 48, 72 und 140 Stunden analysiert. Die obere Bande zeigt Tubulin (60kD), die untere Bande zeigt GapDH (30kD). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die Werte nach 140 Stunden sind in Abb 7. dargestellt.

Für das Transfektionsreagenz Oligofectamine wurde lediglich eine Konzentration getestet, da nur eine begrenzte Menge des Reagenzes zur Verfügung stand. Nach 140 Stunden zeigte sich eine Reduktion im GapDH Protein um 10% und eine 20%ige Reduktion im mRNA-Niveau nach 24 Stunden (Abb. 7). In Abbildung 8 ist exemplarisch das Autoradiogramm eines Westernblots von Zellen, transfiziert mit Genesilencer, dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des GapDH Proteins in primären humanen Myoblasten durch die verwendete siRNA erst nach 72 bzw. 140 Stunden erreicht wurde. Unter Verwendung des Transfektionsreagenz Genesilencer kam es zu der größten Reduktion des GapDH Proteins nach 140 Stunden. Eine höhere Konzentration von 70nM siRNA zeigte unter Verwendung von Genesilencer einen größeren Effekt sowohl auf den GapDH Proteingehalt als auch auf das GapDH mRNA-Niveau. Somit erwies sich 70nM siRNA transfiziert mit Genesilencer als wirksamstes Transfektionsreagent innerhalb dieses Tests, um siRNA in primären humanen Myoblasten zu transfizieren.

4.1.1.1 Luciferase siRNA

Zur Verifizierung der spezifischen GapDH siRNA-Wirkung wurde ein weiterer Versuch mit einer siRNA gegen GapDH und einer siRNA gegen Luciferase durchgeführt. Die Sequenz der Luciferase siRNA stammt aus einer bereits publizierten Arbeit⁹⁷ und besitzt keine Homologien im humanen Genom.

Nach 24 und 48 Stunden zeigte sich keine Reduktion im GapDH Proteingehalt durch die verwendeten siRNAs im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen. Nach 72 und 140 Stunden zeigte sich eine Reduktion im GapDH Proteingehalt durch Transfektion von GapDH siRNA auf 38% bzw. 45% gegenüber der Kontrolle. Betrachtet man den Wert der Luciferase siRNA behandelten Zellen nach 72 Stunden, so erkennt man einen Anstieg im GapDH Proteingehalt um 25% (Abb.9).

Zur Quantifizierung des mRNA Gehaltes wurde eine realtime PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine Reduktion der GapDH mRNA Expression zu allen Zeitpunkten. Die Transfektion der Luciferase siRNA führte zu einer Steigerung der GapDH Expression nach 48, 72 und 140 Stunden (Abb.9).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch dieser Versuch die bereits nachgewiesene Reduktion nach Transfektion mit siRNA gegen GapDH mit Genesilencer bestätigte. Jedoch zeigten die Daten einen Anstieg der GapDH mRNA Expression nach Transfektion von Luciferase siRNA, so dass unspezifische siRNA Effekte der Luciferase siRNA nicht ausgeschlossen werden können. Aufgrund der erzielten Ergebnisse in der Austestung mit GapDH siRNA wurde mit Genesilencer und mit einer Konzentration von 70nM siRNA bei der Austestung der siRNA gegen p21 gearbeitet.

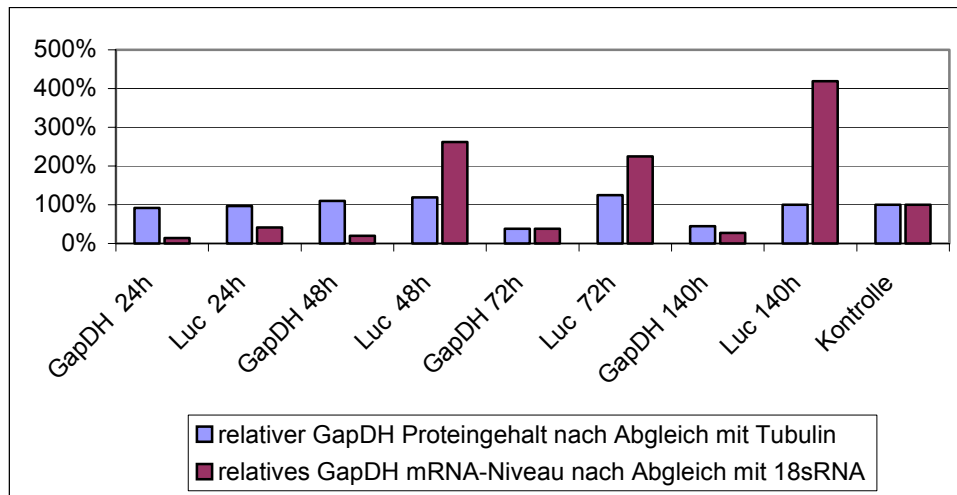


Abbildung 9: Transfektion Dys+ Myoblasten 18/01 mit 70nM siRNA gegen GapDH bzw. 70nM siRNA gegen Luciferase (Luc) unter Verwendung von Genesilencer. Der GapDH Proteingehalt wurde nach 24, 48, 72 und 140 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die GapDH Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Die relative Quantifizierung des GapDH mRNA-Niveaus wurde zu identischen Zeitpunkten mittels realtime PCR durchgeführt. Der Abgleich erfolgte über die 18sRNA Expression und wurde mittels ddCT Methode ausgewertet. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes bezogen, die Kontrolle ist jedoch nur einmal im Diagramm dargestellt.

4.1.2 Testung der p21 siRNA an humanen Dystrophin-positiven Myoblasten

Es wurden zwei siRNAs mittels *in vitro* Transkription synthetisiert, da sie in der codierenden Region von p21 lagen. Diese siRNAs werden im folgenden siRNA I und siRNA III genannt. Für den Test der p21 siRNAs wurde auf einen Zeitpunkt nach 24 und 140 Stunden verzichtet, da ein Effekt nach 24 Stunden auf Proteinebene nicht erwartet wurde und aufgrund der Halbwertszeit des Proteines der Effekt früher als 140 Stunden zu erwarten war⁸⁵.

Im Westernblot konnte eine deutliche Reduktion im p21 Proteingehalt durch beide siRNAs beobachtet werden. Nach 48 Stunden konnte bei einem deutlichen Tubulin Signal kein p21 in den mit siRNA behandelten Proben detektiert werden. Jedoch war auch das Signal für die Kontrolle im Vergleich zu dem nach 72 Stunden verringert (Abb.10). Nach 72 Stunden zeigte sich ebenfalls eine Reduktion im p21 Proteingehalt um 49% bei siRNA III und 84% bei siRNA I (Abb.11).

Die Ergebnisse der realtime PCR zeigten eine deutliche Reduktion des p21 mRNA Niveaus bis auf 12% nach 72 Stunden. Der 24-Stunden-Wert für die siRNA III war mit 185% erhöht, zeigte aber wie bei der siRNA I ein abnehmendes mRNA Niveau bis auf 32% 72 Stunden nach der Transfektion. (Abb.10).

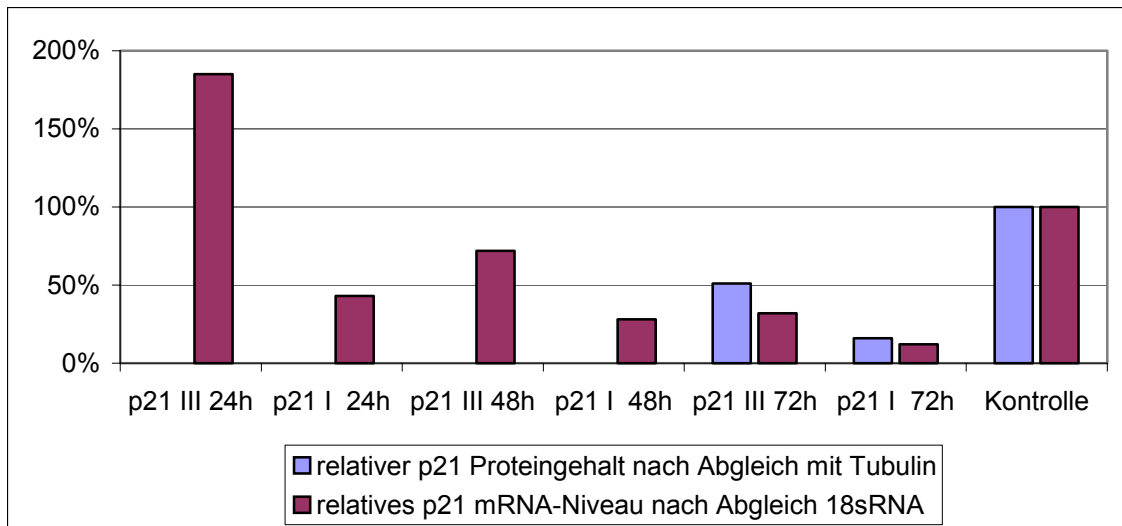


Abbildung 10: Transfektion Dys+ Myoblasten 18/01 mit p21 siRNA I und III unter Verwendung von Genesilencer. Die Zellen wurden mit 70nM siRNA unter Verwendung von Genesilencer transfiziert. Der p21 Proteingehalt wurde nach 48 und 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Die relative Quantifizierung des p21 mRNA-Niveaus wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels realtime PCR durchgeführt. Der Abgleich erfolgte über die 18sRNA Expression und wurde mittels ddCT Methode ausgewertet. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes bezogen, die Kontrolle ist jedoch nur einmal im Diagramm dargestellt.

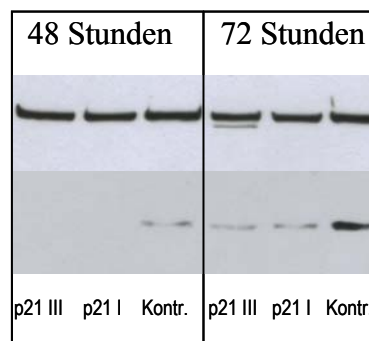


Abbildung 11: Autoradiogramm eines Westernblots mit 20µg Protein aus Dys+ SKMC Zellen transfiziert mit Genesilencer und 70nM siRNA gegen p21. Die obere Bande zeigt Tubulin (60kD), die untere Bande zeigt p21 (20kD). Die Banden der Proben wurden densitometrisch ausgewertet (Abb 10).

Ein weiterer Versuch wurde zur Bestätigung der Reduktion durchgeführt, bei dem auch Luciferase siRNA transfiziert wurde, um zu testen, ob es wiederum zu einem unspezifischen Effekt, wie unter 4.1.1.1 beobachtet, kommt.

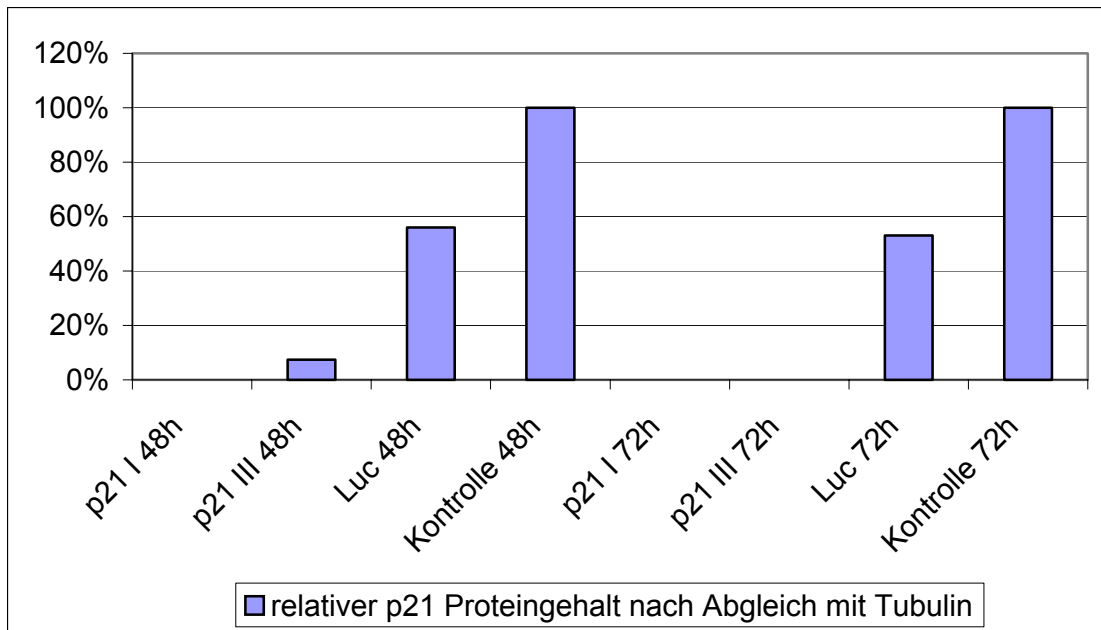


Abbildung 12: Transfektion humaner SKMC 2/00 mit 70nM der siRNA I und III gegen p21 sowie 70nM Luciferase (Luc) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Der p21 Proteingehalt wurde 48 und 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes bezogen.

Wiederum war eine Reduktion im p21 Proteingehalt nach 48 und 72 Stunden zu erkennen. Dabei konnte in den Werten für die p21 I siRNA und dem 72 Stunden Wert für die p21 III siRNA kein p21 detektiert werden (Abb.12). Es kam jedoch auch zu einer Reduktion im p21 Proteingehalt nach Transfektion von Luciferase siRNA. Es ist zu vermuten, dass es sich wiederum um unspezifische Effekte der Luciferase siRNA handelt. Um dies zu überprüfen wurde in einem folgenden Versuch an Dys- Myoblasten neben der Luciferase eine weitere *scrambled siRNA* getestet. Während die Luciferase siRNA 72 Stunden nach Transfektion den p21 Proteingehalt um 43% reduzierte, kam es unter Verwendung der *scrambled siRNA* zu einer Reduktion von lediglich 13%. Das Transfektionsreagenz ohne siRNA hatte keinen Einfluss auf die Transfektion (siehe Abb.15 unter 4.1.3)

Es konnte somit erfolgreich wirksame siRNA gegen p21 identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass beide siRNAs gegen p21 eine Reduktion sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nach 48 und 72 Stunden bewirkten. Die Luciferase siRNA hatte ebenfalls einen Einfluss auf den p21 Proteingehalt. Dieser scheint jedoch Sequenz-spezifisch zu sein, da der Effekt einer anderen siRNA ohne Homologien im humanen Genom weitaus geringer war.

Im weiteren Verlauf wurden deshalb, wenn genügend Material vorhanden war, beide siRNAs in Dys-Zellen transfiziert.

4.1.3 Testung der p21 siRNAs an humanen Dystrophin-negativen Myoblasten

Zum Zeitpunkt der Transfektion waren keine der Dys- Spenderzellen mehr als sechsmal passagiert worden. Das geringe Wachstum schränkte hierbei den Versuchsaufbau ein. Es konnten selten mehrere Versuche mit Myoblasten desselben Spenders durchgeführt werden, da eine Ausgangszellzahl für die Proteinisolierung von mindestens 1×10^5 benötigt wurde. Es wurden Proliferations- (BrdU) und Vitalitätsassays (MTT) durchgeführt. Der Proliferationsassay misst die Veränderung in der Proliferation über die DNA-Synthese der Zelle (siehe 3.2.5) und detektiert die postulierte phänotypische Veränderung einer siRNA bedingten Reduktion von p21. Da die Menge der synthetisierten DNA in den untersuchten Zellen stark von der Zellzahl abhängt, wurde ein Vitalitätsassay durchgeführt, der Auskunft über die Menge an vitalen Zellen gab. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Bezeichnung der verwendeten Patienten Zellen sowie den Krankheitsverlauf der Spender. Die Mutation im Dystrophin konnte in der Routinediagnostik lediglich für den BMD Patienten ermittelt werden. Dort lag eine Deletion der Exons 48-52 vor. Die immunhistologischen Befunde der DMD Patienten waren Dystrophin-negativ. Die Zellen der Patienten 43/01 und 44/01 kamen erst in den Versuchen unter 4.2.2 zum Einsatz.

Tabelle 10: Klinische Symptomatik der verwendeten Dys- Spenderzellen mit Biopsiezeitpunkt

Patient	Art der Dystrophie	Verwandte betroffen	Laufen mit	Sprachentwicklung	Beginn der Muskelschwäche	Verlauf der Krankheit	Alter bei Biopsie
43/01	DMD	Nein	19 Monate	normal	2 Jahre	Stabil	3 Monate
77/02	DMD	Nein	18 Monate	verzögert	3 Jahre	Langsam progredient	4 Jahre
15/01	DMD	Nein	18 Monate	verzögert	5 Jahre	Langsam progredient	5 Jahre
25/01	DMD	Nein	24 Monate	verzögert	3 Jahre	Progredient	4 Jahre
44/01	BMD	Bruder	18 Monate	Leicht verzögert	Schwäche bei Dauerbelastung	Stabil	22 Jahre

Für den Versuch mit Zellen des Spenders **15/01** standen nach einer Kultivierungsdauer von sechs Passagen nicht genug Zellen für einen vollständigen Versuch zur Verfügung. Es wurde daher nur die siRNA I transfiziert und auf den Zeitpunkt nach 48 Stunden verzichtet. Da die Proteinreduktion in den vorausgegangenen Versuchen bei 48 Stunden begann, wurde postuliert, dass eine Proliferationssteigerung erst nach der Reduktion des Proteins, somit frühestens nach 72 Stunden, detektierbar sei.

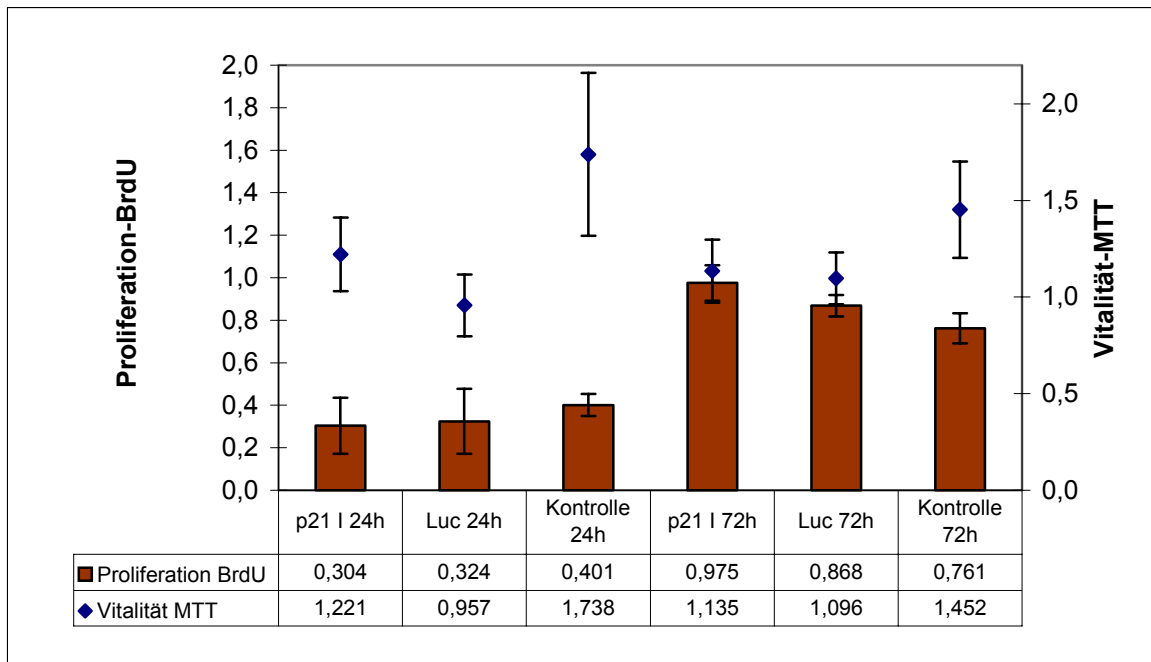


Abbildung 13: Proliferations- und Vitalitätsassay humaner Dys- SKMC 15/01 nach Transfektion von p21 siRNA I und Luciferase (Luc) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Es sind die absoluten Absorptions-Werte zum Zeitpunkt nach 24 und 72 Stunden bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus 6 einzelnen Transfektionen angegeben und die Standardabweichung sind im Diagramm dargestellt.

Nach 24 Stunden war die Proliferation der mit siRNA transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollen reduziert, jedoch waren die Werte des Vitalitäts-Tests der transfizierten Zellen erniedrigt. Nach 72 Stunden zeigte sich eine Proliferationssteigerung in der mit siRNA gegen p21 behandelten Proben um 28% gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die mit Luciferase behandelten Zellen zeigten noch eine Steigerung von 14% (Abb.13).

Der Westernblot zeigte eine Reduktion des p21 Proteingehaltes um 66% nach 72 Stunden, während nach 24 Stunden das Niveau noch auf dem der Kontrolle war. Die Zellen mit Luciferase siRNA zeigten auch im Westernblot eine Reduktion im p21 Gehalt, was die Proliferationssteigerung im BrdU Test erklären würde (Abb.14). Dieser Effekt trat auch schon bei der siRNA Testung mit Dys+ Zellen auf. Das p21 mRNA-Niveau wurde mittels realtime PCR analysiert. Nach 24 Stunden war die p21 Expression in den Zellen mit siRNA gegen p21 um 48% reduziert, während es in den mit Luciferase transfizierten Zellen auf Normalniveau blieb. Nach 72 Stunden war das Niveau an p21 mRNA sowohl in den mit p21 siRNA transfizierten Zellen um 93%, als auch in den mit Luciferase siRNA transfizierten Zellen um 75% reduziert (Abb.14).

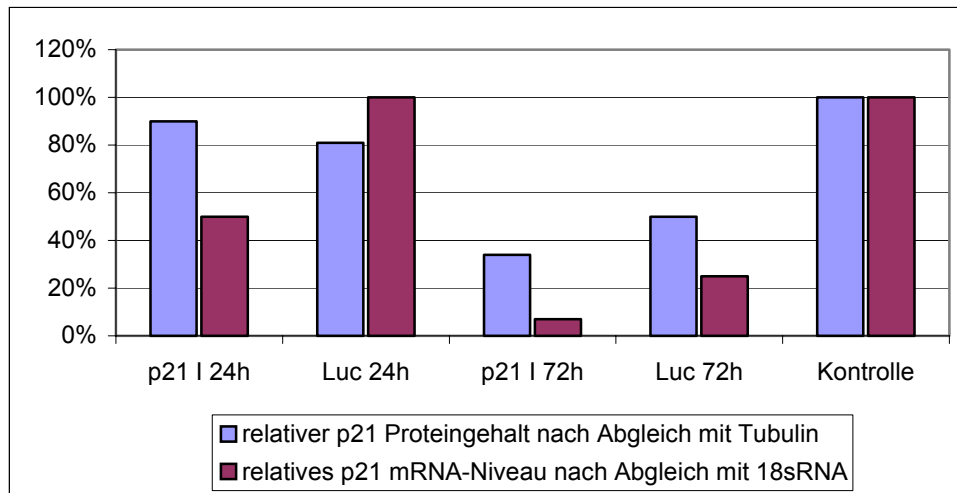


Abbildung 14: Transfektion humaner SKMC Dys- 15/01 mit 70nM p21 siRNA I bzw. 70nM Luciferase (Luc) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Der p21 Proteingehalt wurde 24 und 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Die relative Quantifizierung des p21 mRNA-Niveaus wurde nach 24 und 72 Stunden mittels realtime PCR durchgeführt. Der Abgleich erfolgte über die 18sRNA Expression und wurde mittels ddCT Methode ausgewertet. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes bezogen, die Kontrolle ist jedoch nur einmal im Diagramm dargestellt.

Da aus der Zell- und Gewebekulturbank in München im späteren Verlauf noch einmal Muskelzellen des Spenders 15/01 zur Verfügung standen, konnten die Proteindaten nach 72 Stunden bestätigt werden.

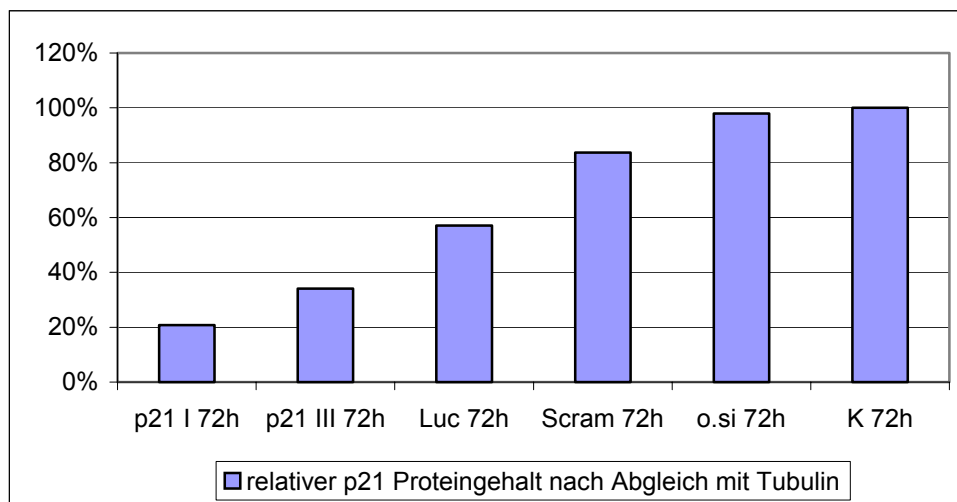


Abbildung 15: Transfektion humaner Dys- SKMC 15/01 mit 70nM der p21 siRNA I, p21 siRNA III, Luciferase (Luc) siRNA sowie scrambled (Scram) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Zusätzlich wurde das Transfektionsreagenz ohne siRNA (o. si) getestet. Der p21 Proteingehalt wurde 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle (K) bezogen.

Der wiederholte Westernblot zeigte eine p21 Reduktion durch beide p21 siRNAs um 79% bzw. 66%. Die siRNA gegen Luciferase zeigte ebenfalls eine p21 Proteinreduktion um 43%, während eine

zusätzlich verwendete *scrambled* siRNA (freundliche Gabe von Frau Büscher, Robert-Koch-Institut) den p21 Proteingehalt um lediglich 13% reduzierte. Das Transfektionsreagenz alleine hatte keinen Einfluss auf den p21 Proteingehalt (Abb. 15).

Beim Spender 77/02 stand eine größere Menge an Zellen zur Verfügung, die es zuließ, sowohl beide p21 siRNAs als auch eine Analyse nach 48 Stunden durchzuführen.

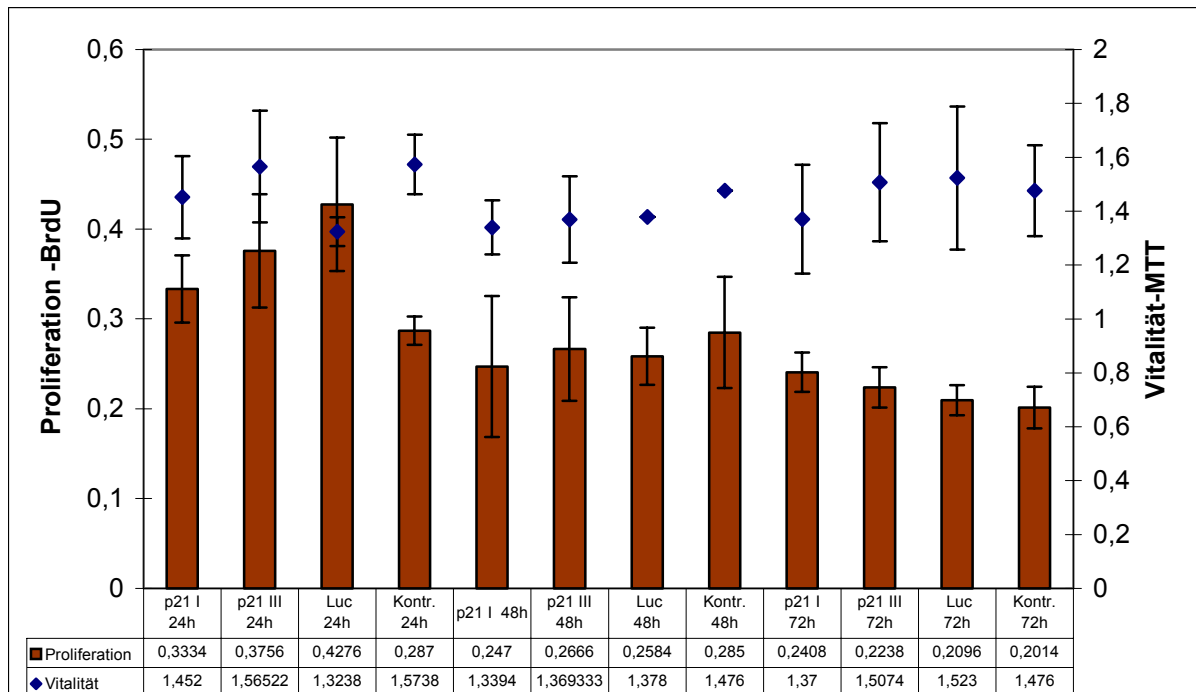


Abbildung 16: Proliferations- und Vitalitätsassay humaner Dys- SKMC 77/02 nach Transfektion von p21 siRNA I, p21 siRNA III und Luciferase (Luc) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Es sind die absoluten Absorptions-Werte zum Zeitpunkt nach 24, 48 und 72 Stunden bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind die Mittelwerte aus sechs einzelnen Transfektionen angegeben und die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt. Die Vitalitätswerte für die mit Luciferase siRNA transfizierten Zellen nach 48 Stunden und der Kontrolle nach 48 Stunden beruhen auf einer Einzelmessung.

Nach 24 und 48 Stunden war die Proliferation in den unbehandelten Kontrollzellen leicht höher als die in den mit siRNA transfizierten Zellen. Nach 72 Stunden war die Proliferation bei den mit p21 siRNA I behandelten Zellen um 20% höher als in der untransfizierten Kontrolle. Die Zellen mit p21 siRNA III und die mit Luciferase siRNA behandelten Zellen erreichten einen Wert von 11% bzw. 5% über der Kontrolle nach 72 Stunden (Abb.16).

Der Westernblot zeigte nach 48 Stunden eine deutliche Reduktion des p21 Proteingehalts auf 51% für siRNA I und 36% für siRNA III. Auch nach 72 Stunden ließ sich noch eine Reduktion im Proteingehalt der mit siRNA transfizierten Proben nachweisen. Diese lag mit p21 I bei 32%, mit p21 III bei 28% und für Luciferase bei 32% (Abb.17). Für eine Analytik auf mRNA Ebene wurde bei diesem Versuch nicht genügend RNA isoliert.

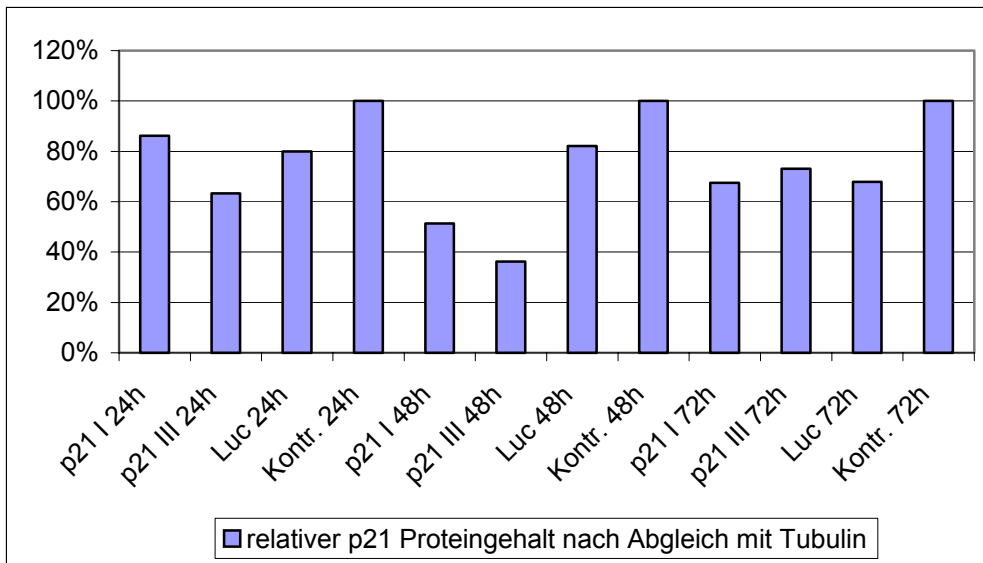


Abbildung 17: Transfektion humaner Dys- SKMC 77/01 mit 70nM der p21 siRNA I, p21 siRNA III und Luciferase (Luc) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Der p21 Proteingehalt wurde 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes bezogen.

Der Versuch mit Zellen des Patienten **25/01** wurde nur mit siRNA 1 und Luciferase siRNA durchgeführt, da die Zellzahl begrenzt war.

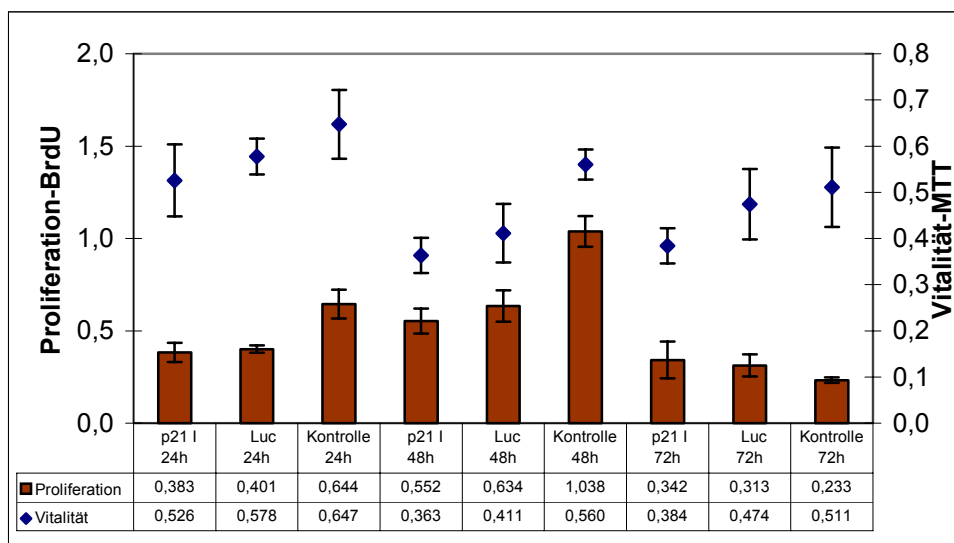


Abbildung 18 : Proliferations- und Vitalitätsassay humaner Dys- SKMC 25/01 nach Transfektion von p21 siRNA I und Luciferase (Luc) siRNA unter Verwendung von Genesilencer. Es sind die absoluten Absorptions-Werte zum Zeitpunkt nach 24, 48 und 72 Stunden bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus sechs einzelnen Transfektionen angegeben und die Standardabweichung im Diagramm dargestellt.

Der Proliferationstest zeigte nach 24 und 48 Stunden eine Proliferationsabnahme der transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Nach 72 Stunden lag die Proliferation der mit siRNA I transfizierten Zellen um 47% über der untransfizierten Kontrolle und noch 13% über den mit

Luciferase siRNA transfizierten Zellen. Diese zeigten jedoch ihrerseits eine um 34% erhöhte Proliferation gegenüber den unbehandelten Zellen nach 72 Stunden (Abb.18).

Zusammenfassend waren die getesteten p21 siRNAs I und III in der Lage, auch in Dys- Myoblasten den p21 Proteingehalt nach 48 und 72 Stunden in Zellen der Patienten 15/01 und 77/02 zu reduzieren. Dies führte zu einer Proliferationssteigerung gegenüber untransfizierten Kontrollen bzw. Luciferase siRNA in allen der drei getesteten Patientenzellen. Diese Reduktion konnte bei den Zellen 15/01 auf mRNA Ebene bestätigt werden. Somit konnte unter Verwendung der ausgetesteten siRNAs die Proliferation von Dys- Myoblasten erfolgreich gesteigert werden. Der Einsatz von Luciferase siRNA führte jedoch auch zu einem Einfluss auf den p21 Proteingehalt und somit auch auf die Proliferation der Zellen. Die Ergebnisse der transienten Transfektionen mit p21 siRNA sowohl mit Dys+ als auch mit Dys- Myoblasten sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Übersicht des erzielten Effektes einer siRNA Transfektion unter Verwendung von Genesilencer auf primäre Dys+ und Dys- Myoblasten bei einer Konzentration von 70nM, 72 Stunden nach Transfektion.

Verwendete Zellen	Eingesetzte siRNA	Proliferationssteigerung	mRNA Reduktion	Protein Reduktion
02/00 Dys+*	siRNA I			100%
02/00 Dys+*	siRNA III			100%
02/00 Dys+*	siRNA Luc			47%
15/01 Dys-	siRNA I	28%	93%	66% / 79%
15/01 Dys-*	siRNA III			66%
15/01 Dys-	siRNA Luc	14%	75%	50% / 47%
18/01 Dys+	siRNA I		88%	84%
18/01 Dys+	siRNA III		64%	49%
25/01 Dys-*	siRNA I	47%		
25/01 Dys-*	siRNA Luc	35%		
77/02 Dys-*	siRNA I	20%		32%
77/02 Dys-*	siRNA III	11%		27%
77/02 Dys-*	siRNA Luc	5%		32%

*Das Material reichte für eine vollständige Untersuchung des siRNA-Effektes auf funktionaler-, mRNA- und Protein-Ebene nicht aus.

4.1.4 Testung muriner p21 siRNA

Es wurden zunächst drei Sequenzen für siRNAs gegen murines p21 nach demselben Prinzip der humanen siRNAs ausgewählt. Dies war nötig, da die Homologie der beiden Sequenzen für p21 nicht groß genug ist um eine siRNA zu identifizieren, die in beiden Organismen wirkungsvoll wäre. Alle drei

lagen innerhalb der codierenden Sequenz, wurden *in vitro* transkribiert und an murinen C2C12 Myoblasten getestet. Die folgenden Tests wurden mit dem Transfektionsreagenz siPort der Firma Ambion durchgeführt. Das Reagenz ist bereits an verschiedenen Zelllinien getestet worden¹²⁵. Es wurde zunächst wieder die siRNA gegen GapDH verwendet, um das Transfektionsreagenz an C2C12 Zellen und verschiedene Konzentrationen von siRNA zu testen. Nach 72 Stunden wurde Protein isoliert.

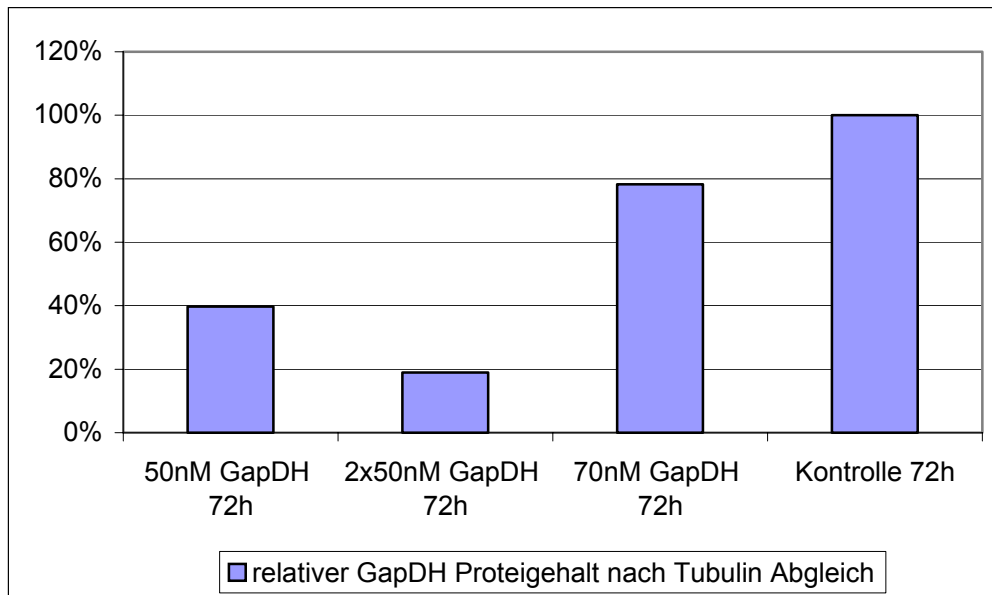


Abbildung 19: Transfektion muriner C2C12 Zellen mit GapDH siRNA unter Verwendung von siPort. Neben den getesteten Konzentrationen von 50nM und 70nM wurde Zellen auch im Abstand von 24h zweimal mit 50nM siRNA transfiziert (2x50nM). Der GapDH Proteingehalt wurde 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die GapDH Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle bezogen.

Nach 72 Stunden zeigte sich eine deutliche Reduktion im GapDH Proteingehalt um 60% durch 50nM siRNA. Eine zweite Transfektion nach 24 Stunden mit 50nM siRNA verstärkte den Effekt, so dass die Reduktion nach zweimaliger Transfektion 81% betrug (Abb.19). Der GapDH Proteingehalt nach Transfektion mit 70nM siRNA zeigte eine geringere Reduktion als bei 50nM. Somit wurde die Konzentration der siRNA auf 50nM gesenkt, da durch die hohe Proliferationskapazität mit einer besseren Aufnahme der siRNA in die Zellen zu rechnen war. Für die weiteren Versuche war die größtmögliche Reduktion jedoch nicht entscheidend, da durch den Einsatz der siRNA Sequenz in einem lentiviralen Vektor die Konzentration der siRNA durch den Promotor vorgegeben wird und nicht beeinflusst werden kann. So wurde für die Identifizierung wirksamer p21 siRNA eine einzelne Transfektion durchgeführt und die Wirkung der siRNAs verglichen.

Es kam neben den drei siRNAs gegen p21 und der Luciferase siRNA wieder eine *scrambled* siRNA zum Einsatz, die auch schon bei der Identifizierung der humanen p21 siRNAs verwendet wurde (siehe 4.1.3), um unspezifische Effekte der Luciferase siRNA zu identifizieren.

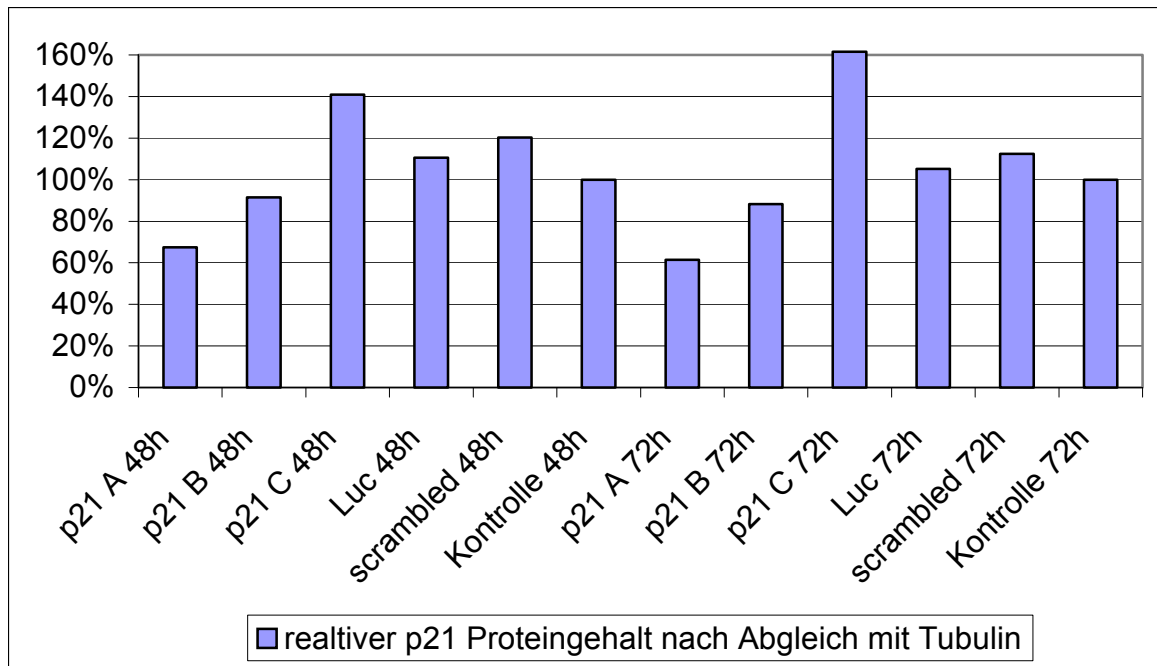


Abbildung 20: Transfektion muriner C2C12 Zellen mit 50nM der p21 siRNAs A, B und C sowie Luciferase siRNA und scrambled siRNA unter Verwendung von siPort. Der p21 Proteingehalt wurde 48 und 72 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle bezogen.

Der Westernblot zeigte sowohl nach 48 Stunden als auch nach 72 Stunden eine Reduktion im p21 Proteingehalt durch siRNA A um 32% bzw. 38%. Die siRNA B zeigte mit 9% und 12% eine geringe Reduktion im p21 Proteingehalt nach 48 bzw. 72 Stunden. Die siRNA C bewirkte hingegen zu beiden Zeitpunkten einen erhöhten Gehalt an p21 Protein. Es konnte kein Unterschied in der p21 Expression durch Luciferase oder scrambled siRNA zu beiden Zeitpunkten beobachtet werden. Die unspezifischen Effekte der Luciferase siRNA auf p21 in humanen Zellen konnten so mit murinen Zellen nicht detektiert werden (Abb.20).

Um die Ergebnisse zu überprüfen wurde der Versuch wiederholt. Es wurden wiederum alle drei siRNA's transfiziert und diesmal lediglich nach 48 Stunden Protein isoliert. Der Westernblot zeigte eine Reduktion des p21 Proteingehaltes um 61% durch Transfektion von siRNA A nach 48 Stunden. Auch siRNA B zeigte eine Reduktion von 28%, während der p21 Proteingehalt durch die Transfektion von siRNA C und Luciferase siRNA unverändert gegenüber der Kontrolle blieb (Abb. 21).

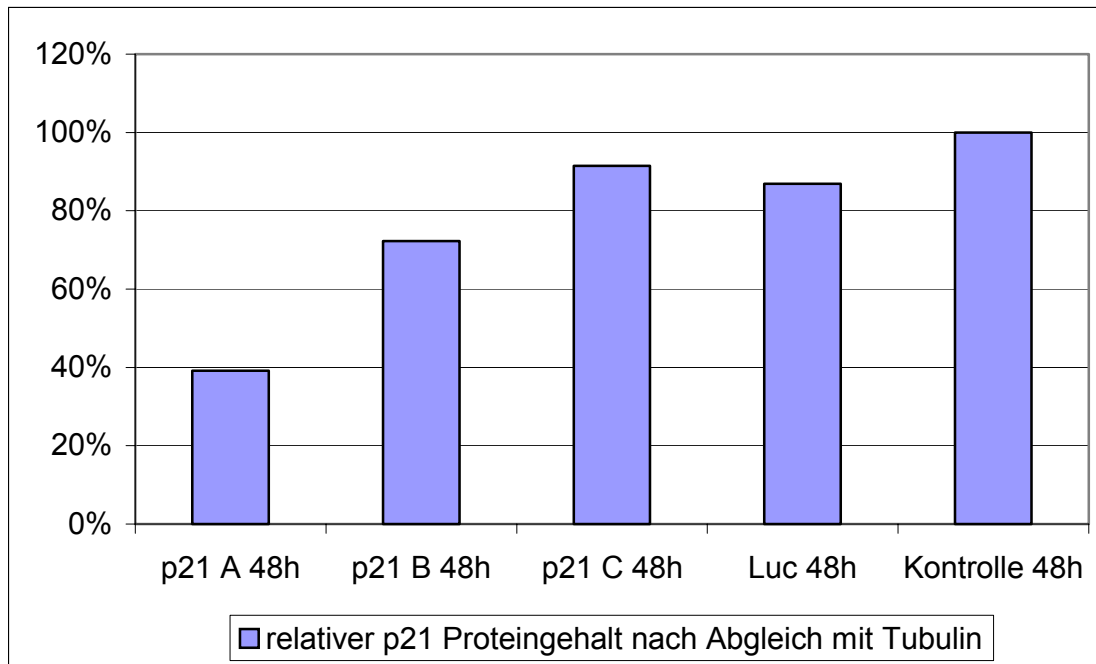


Abbildung 21: Transfektion muriner C2C12 Zellen mit 50nM der p21 siRNAs A, B und C sowie Luciferase siRNA unter Verwendung von siPort. Der p21 Proteingehalt wurde 48 Stunden nach Transfektion durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für Tubulin abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die untransfizierte Kontrolle bezogen.

Zusammenfassend ist das Transfektionsreagenz siPort geeignet um siRNA in C2C12 Zellen zu transfizieren. Von den drei gewählten siRNAs gegen p21 zeigte siRNA A eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes in beiden Versuchen nach 48 Stunden. Die p21 siRNA B zeigte unter identischen Bedingungen eine geringere Wirkung, während es bei der siRNA C zu keiner Reduktion des p21 Protein gekommen war. Somit wurde die Sequenz der siRNA A für die Konstruktion des lentiviralen Vektors verwendet.

4.2 Lentivirale Vektoren

4.2.1 Muriner Vektor

Nach Klonierung der shRNA Sequenz A in den Vektor pLV-THM ermittelte die Sequenzierung die fehlerfreie Sequenz der shRNA.

In der ersten Virusproduktion des Vektors mit der siRNA A Sequenz (pLV-THM-p21-M) wurde ein Titer von 3×10^7 infektiösen Partikeln pro Milliliter ermittelt. Für die Infektion der C2C12 Zellen wurden zunächst zur Bestimmung der notwendigen MOI drei verschiedene Virusmengen getestet. Mit einer MOI von 36 wurden 70% der C2C12 Zellen in der FACS-Analyse GFP-positiv gemessen (Abb.22).

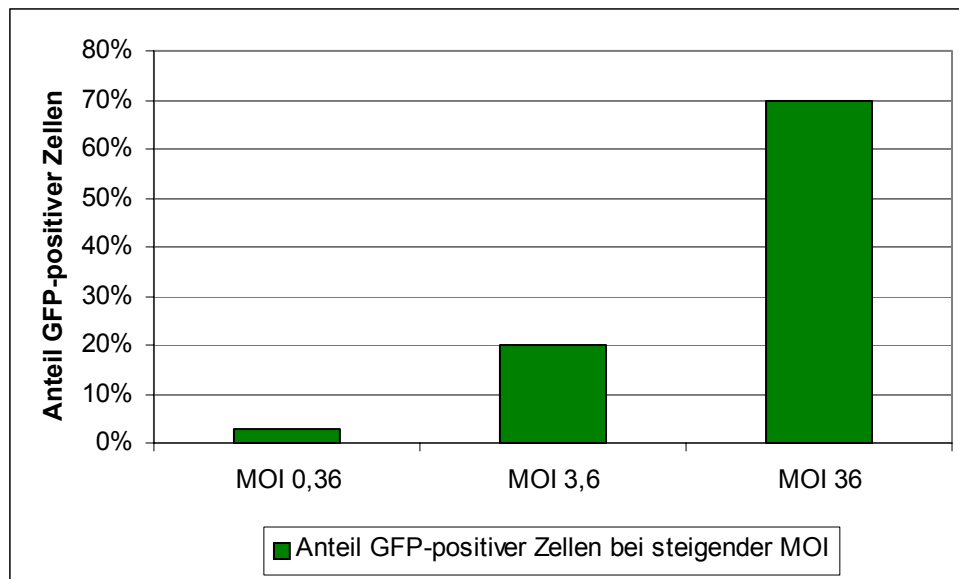


Abbildung 22: GFP-positiven C2C12 Zellen nach Infektion mit verschiedenen MOIs von pLV-THM-p21-M. Die FACS-Messung erfolgte vier Tage nach Infektion der Zellen mit einer MOI von 0,36, 3,6 und 36.

In einem folgenden Versuch wurden C2C12 Zellen mit einer MOI von 40 infiziert und eine FACS-Messung vier Tage nach Infektion detektierte 90% der Zellen als GFP-positiv. Um eine Zelllinie mit identischem Integrationsort zu erhalten, wurden Klone durch Ausverdünnen isoliert. Es wurden sieben Klone mit dem integrierten p21 shRNA A Konstrukt und drei Klone mit dem Leervektor kultiviert. Alle isolierten Klone waren drei Wochen nach Infektion in der FACS-Messung zu mehr als 95% GFP-positiv.

Um die postulierte Proliferationssteigerung durch p21 Reduktion zu überprüfen, wurde ein Proliferationstest an diesen Klonen durchgeführt. Als Kontrolle dienten C2C12 Zellen, die mit Virus des Vektors pLV-THM ohne eine siRNA unter identischen Bedingungen infiziert wurden. Im Vergleich zum Mittelwert der pLV-THM tragenden Zellen zeigten nur drei der sechs Klone eine leicht erhöhte Proliferation (Klon 4=127%, Klon 5=136%, Klon 13=127%). Diese hatten jedoch gleichzeitig eine höheren Vitalität und eine hohe Standardabweichung. Die anderen drei Klone zeigten eine vergleichbare bzw. leicht reduzierte Proliferation (Klon 1=97%, Klon 2=88%, Klon 12=99%) (Abb.23). Eine Wiederholung des Testes führte zu gleichen Ergebnissen. Die Proteinquantifizierung zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle, den Leervektor tragenden Zellen und den siRNA exprimierenden Zellen (Abb. 24).

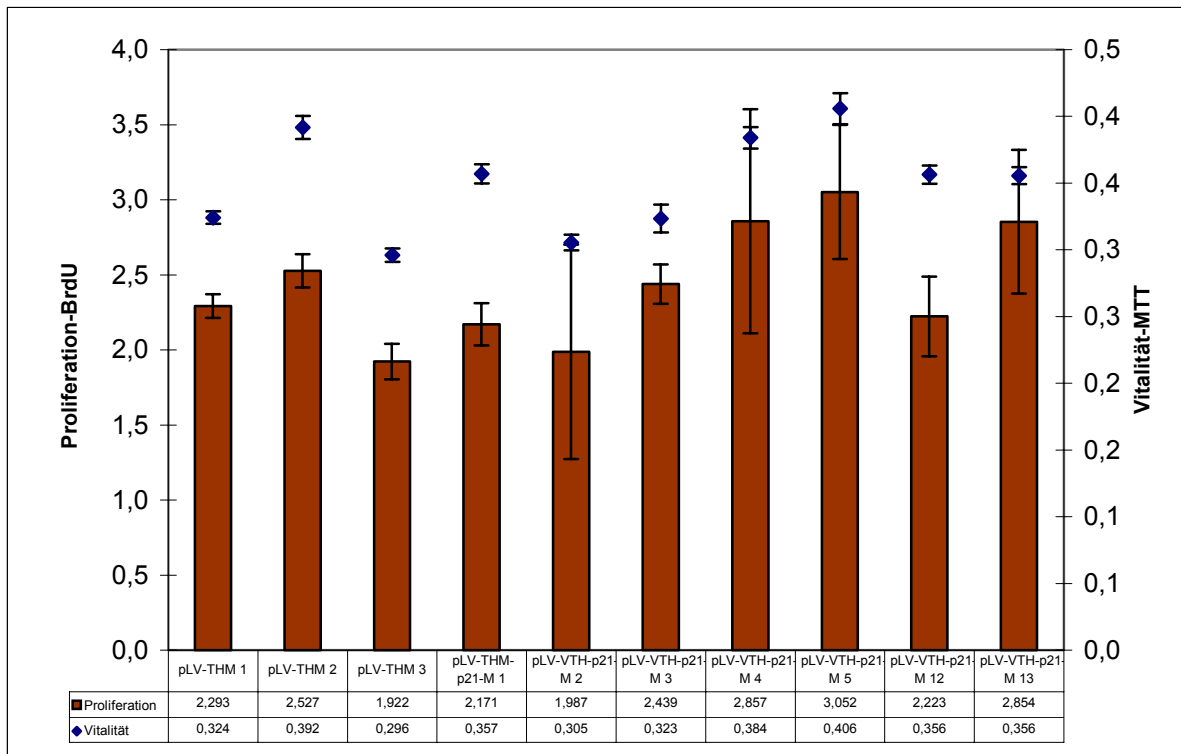


Abbildung 23: Proliferations- und Vitalitätsassay muriner C2C12 Klone nach Infektion von pLV-THM-p21-M und pLV-THM. Es wurden drei isolierte Klone (1-3) mit dem Leervektor pLV-THM als Kontrolle sowie sieben Klone (M1-5, M12, M13) mit dem Vektor pLV-THM-p21 untersucht. Es sind die absoluten Absorptionen bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus acht durchgeführten Assays angegeben und die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

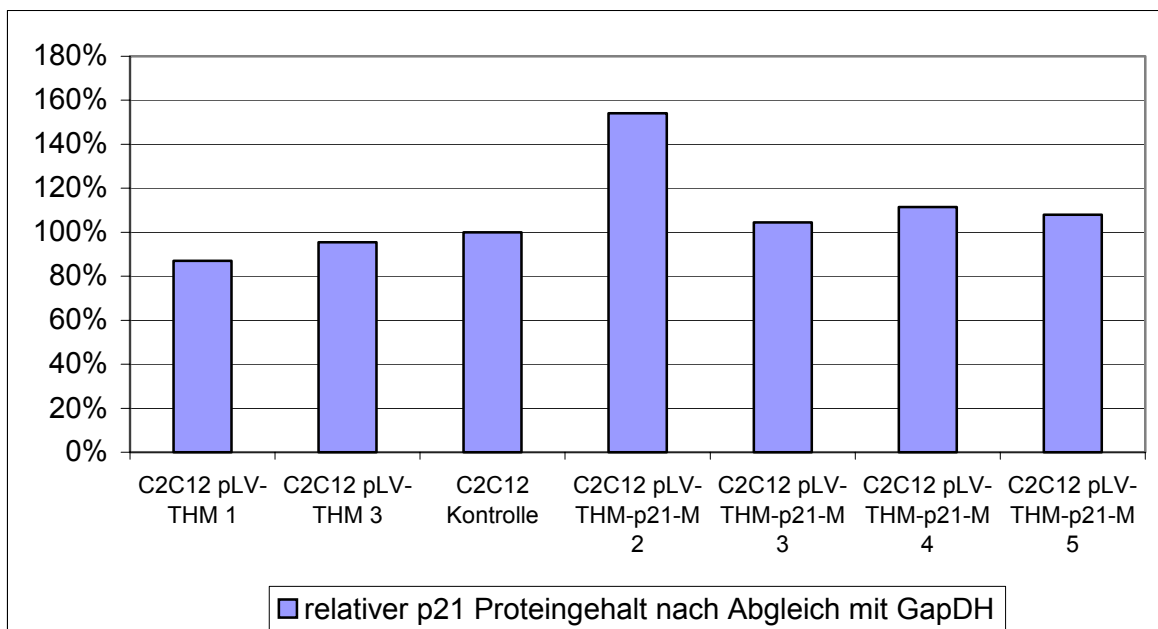


Abbildung 24: Infizierter C2C12 Klone mit pLV-THM und pLV-THM-M. Es wurde Protein aus zwei Klonen isoliert, die den Leervektor pLV-THM tragen, sowie aus vier Klonen, die den Vektor pLV-THM-p21-M tragen. Der p21 Proteingehalt wurde durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für GapDH abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die uninfizierte Kontrolle bezogen.

Von den in Abb. 24 getesteten Klonen wurde mRNA isoliert, um die p21 mRNA Reduktion der vom Vektor exprimierten siRNA in einer semiquantitativen PCR zu überprüfen. Die PCR zeigte jedoch keinen Unterschied im p21 Niveau zwischen den pLV-THM Klonen und den pLV-THM-p21-M Klonen (Daten nicht gezeigt).

Zur Kontrolle wurde die shRNA Sequenz in umgekehrter Orientierung in den Vektor kloniert (pLV-THM-p21-M rev). Die Orientierung ist für die Expression der siRNA nicht entscheidend, da der Loop durch das Enzym Dicer abgeschnitten wird und es ebenfalls zu siRNA kommt¹⁰⁸. Es wurden wiederum zwei positive Klone durch Sequenzierung ermittelt. Nach der Virusproduktion folgte keine Aufkonzentrierung sondern die C2C12 Zellen wurden direkt mit dem virushaltigen Überstand und 8µg/ml Polybrene für zwölf Stunden kultiviert. Die Infektionsrate der C2C12 Zellen lag über 75%.

Die Zellen wurden für 14 Tage kultiviert und im Anschluss Protein isoliert. Der Westernblot zeigte eine Reduktion des p21 Proteingehaltes um 29% (Abb.25).

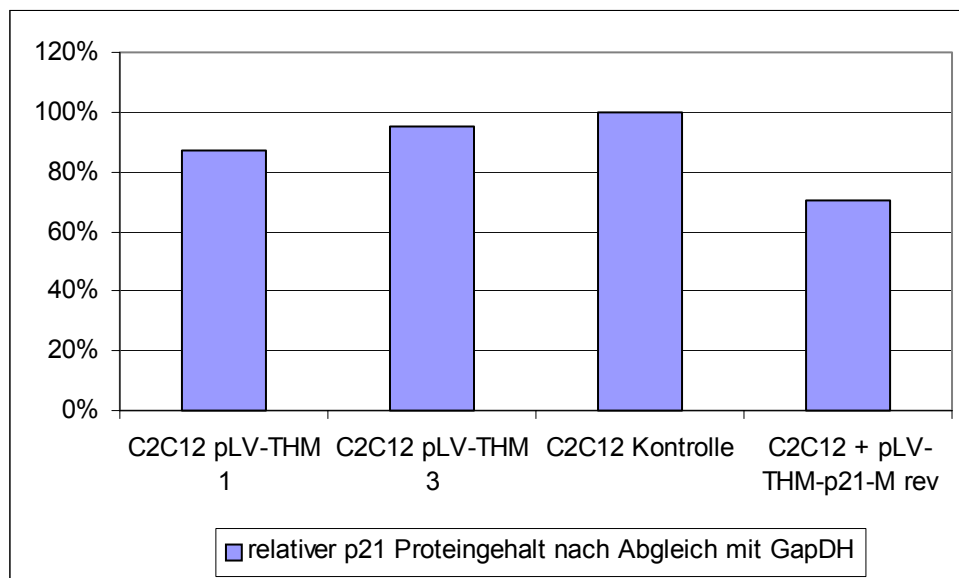


Abbildung 25: C2C12 Klone mit pLV-THM und infizierte c2c12 Zellen mit pLV-THM-M rev. Es wurde Protein aus zwei Klonen isoliert, die den Leervektor pLV-THM tragen, sowie aus C2C12 Zellen, die mit dem Vektor pLV-THM-p21-M rev infiziert wurden. Der p21 Proteingehalt wurde durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für GapDH abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die uninfizierte Kontrolle bezogen.

Die Ergebnisse an murinen C2C12 Zellen zeigten, dass es mit einer MOI 40 erfolgreich zur Infektion von mehr als 85% der Zellen kam. Die in Vorversuchen ermittelte wirksame siRNA A führte zunächst im Vektorsystem jedoch zu keiner p21 Reduktion. Bei Verwendung der gleichen siRNA Sequenz in umgekehrter Orientierung im Vektorsystem kam es zu einer Reduktion des p21 Proteingehaltes um 29%. Die Inhibition der p21 siRNA war somit geringer als bei transienter Transfektion. Es zeigte sich weiterhin, dass die Infektion von C2C12 Zellen mit dem Leervektor pLV-THM eine Varianz in der Zellproliferation verursacht.

4.2.2 Humaner Vektor

Es wurden siRNA I und III für den Einsatz in humanen Zellen in den pLV-THM Vektor kloniert (pLV-THM-p21-H1 bzw. pLV-THM-p21-H3). Zudem wurde eine in der Zwischenzeit publizierte siRNA Sequenz für p21 als Vorlage für die Konstruktion des Vektors pLV-THM-p21-pub verwendet¹²⁶.

4.2.2.1 Infektion mit virushaltigem Überstand

In ersten Versuchen wurde das Virus nicht aus dem Überstand der zur Produktion eingesetzten 293T Zellen isoliert, sondern unter Zugabe von 8µg/ml Polybrene nach Abtrennung von Zellen und Debris direkt auf die Myoblasten gegeben und nach zwölf Stunden durch Wachstumsmedium ersetzt. Es wurde Virus mit den Vektoren für siRNA I, siRNA III und Leervektor produziert und damit Dys- Zellen des Patienten 77/02 infiziert. Mikroskopische Betrachtungen zeigten ein 20%iges Zellsterben nach Infektion. Der Anteil der Zellen, die mindestens eine integrierte Kopie des Virus trugen, wurde anhand der GFP-Expression mittels FACS-Analyse überprüft.

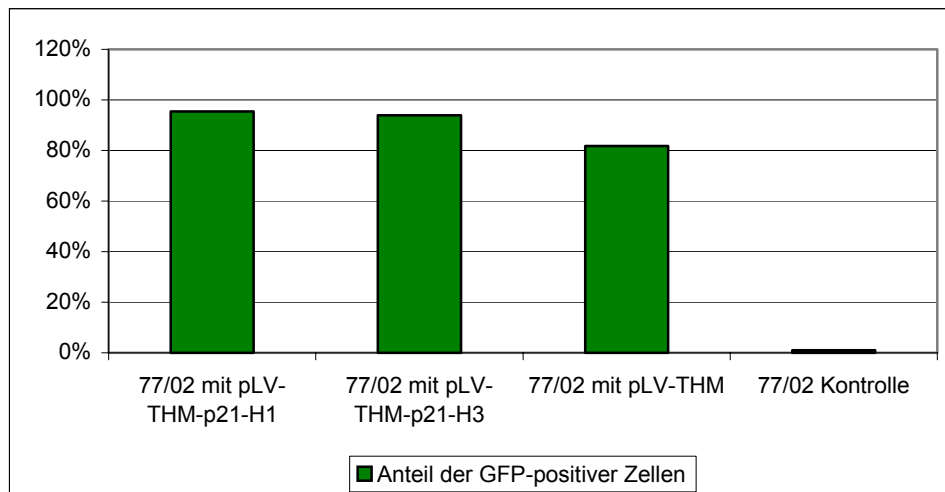


Abbildung 26: GFP-positive 77/02 Zellen nach Infektion mit Überstand der siRNA exprimierenden Vektoren pLV-THM-p21-H1 und pLV-THM-p21-H3 sowie dem Leervektor pLV-THM. Die FACS-Messung erfolgte 18 Tage nach Infektion der Zellen.

Die FACS-Analyse 18 Tage nach Infektion ergab einen Anteil GFP-positiver Zellen von über 90% für die mit Virus für siRNA I und III transfizierten Zellen und über 80% für mit dem Leervektor transfizierte Zellen (Abb. 26). Es wurde ein Proliferationstest zu zwei Zeitpunkten durchgeführt, um den mit der transienten Transfektion erreichten Effekt mit den viralen Konstrukten zu überprüfen.

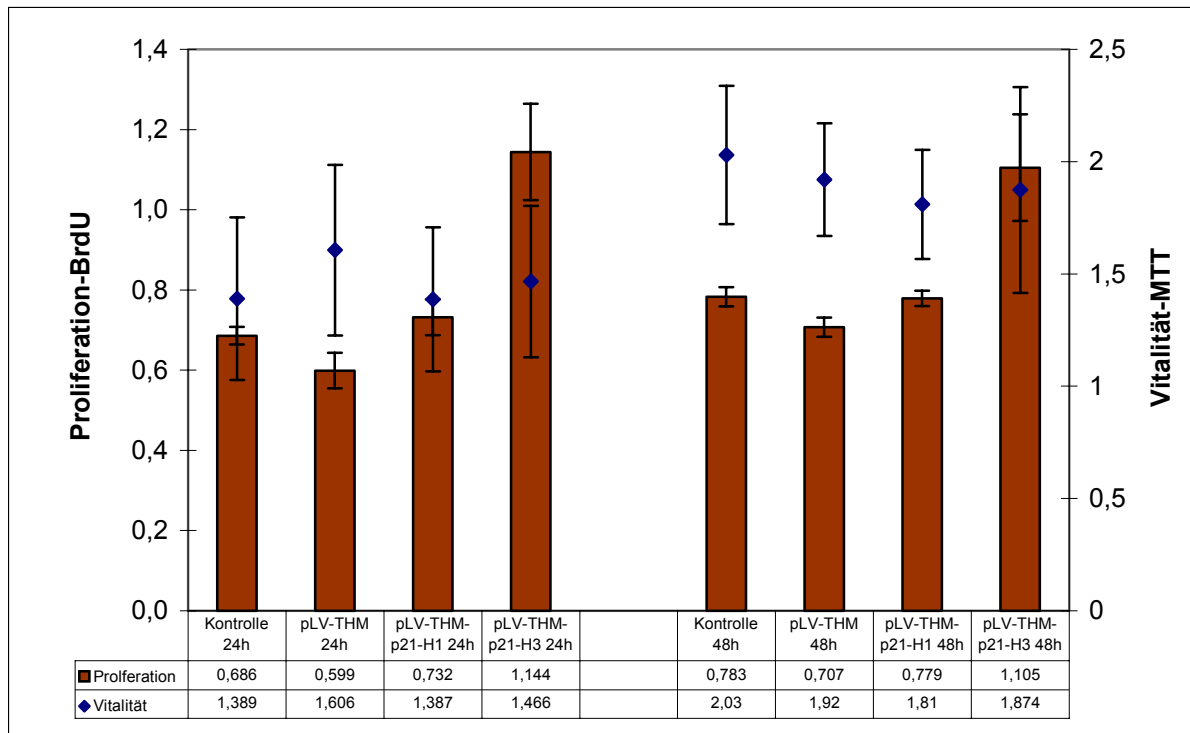


Abbildung 27: Proliferations- und Vitalitätsassay Dys- SKMC 77/02 infiziert mit pLV-THM-p21-H1, pLV-THM-p21-H3 und pLV-THM. Es sind die absoluten Absorptions-Werte bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus acht durchgeführten Assays angegeben und die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

Die Bestimmung der Proliferation der mit Überstand infizierten Zellen zeigte keine Steigerung der Zellen mit pLV-THM-p21-H1 gegenüber der Kontrolle sowie eine leichte Abnahme der Proliferation der Leervektor tragenden Zellen gegenüber der Kontrolle. Die Zellen, die mit pLV-THM-p21-H3 infiziert wurden, zeigten eine deutliche Zunahme der Proliferation um 67% bzw. 41% gegenüber der Kontrolle (Abb.27). Es wurde RNA und Protein aus den infizierten Zellen isoliert um den p21 Gehalt zu überprüfen.

Die mit der isolierten mRNA durchgeführte realtime PCR zeigte eine Reduktion von p21 nach Infektion des Virus mit siRNA1 von 42% und mit siRNA3 von 89%. Jedoch war auch der p21 Gehalt in Zellen, die den Leervektor enthielten, um 35% reduziert. Auf Proteinebene zeigte der Westernblot jedoch nur bei Zellen mit siRNA3 Konstrukt eine leichte Reduktion von 19% im p21 Proteingehalt (Abb. 28).

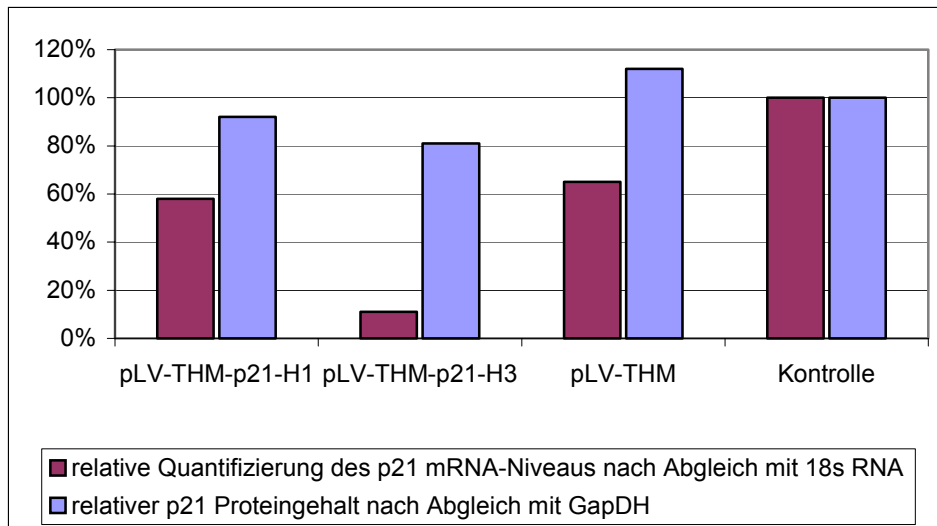


Abbildung 28: Infektion Dys- SKMC 77/02 mit pLV-THM-p21-H1, pLV-THM-p21-H3 und pLV-THM. Der p21 Proteingehalt wurde durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für GapDH abgeglichen. Die relative Quantifizierung des p21 mRNA-Niveaus wurde mittels realtime PCR durchgeführt. Der Abgleich erfolgte über die 18sRNA Expression und wurde mittels ddCT Methode ausgewertet. Alle Werte sind in % auf die uninfizierte Kontrolle bezogen.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch Infektion von Dys- Myoblasten unter Verwendung von virushaltigem Überstand zu einer hohen Infektionsrate der Zellen kommt. Dies ging mit einem Verlust von ca. 20% der Zellen nach Infektion einher. Die Infektion des Leervektors zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation und auf den p21 Proteingehalt. Lediglich eine geringe Reduktion im p21 mRNA Gehalt wurde detektiert (Abb.27 und 28). Unter Verwendung von Überstand des Vektors pLV-THM-p21-H3 kam es zu einer Reduktion im p21 mRNA Niveau auf 11% und zu einer deutlichen Proliferationszunahme um 67% bzw. 41% gegenüber unbehandelten Zellen, die über die Ergebnisse der transienten Transfektion hinausging. Der Proteingehalt war jedoch mit 18% nur leicht reduziert. Unter Verwendung des Vektors pLV-THM-p21-H1 war der Effekt auf mRNA Ebene geringer. Es konnte keine Proteinreduktion oder eine resultierende Proliferationszunahme detektiert werden (Abb.27 und 28) obwohl die FACS-Analyse eine hohe Infektionsrate nachwies (Abb.26). Grund hierfür könnte die Anzahl an integrierten Kopien sein, die für eine effektive p21 Reduktion benötigt werden. Da die Virusproduktion nicht immer zu gleichen Virusmengen im Überstand führt, ist es möglich, dass die Produktion mit dem Vektor pLV-THM-p21-H3 effektiver war. Dies würde zu einer Erhöhung der integrierten Kopien nach Infektion mit Überstand führen und ist möglicherweise der Grund für den Unterschied zwischen den Viren mit siRNA I und siRNA III. Um dies zu überprüfen wurde im nächsten Schritt Virus aufkonzentriert. Dies ermöglichte den Einsatz von identischen Virusmengen und einen direkten Vergleich.

4.2.2.2 Infektion mit aufkonzentriertem Virus

Für weitere Versuche an primären Muskelzellen von Patienten mit Muskeldystrophie wurde Virus mit den Vektoren pLV-THM-p21-H1 und pLV-THM-p21-H3 in größerer Menge hergestellt und mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Es wurden die Zellen der Patienten 77/02 und 43/01 mit einer MOI von 40 infiziert. Die Zellen zeigten nach Infektion eine Apoptoserate von 30% bis 50%. Die Zellen wurden mittels FACS-Analyse nach einer Kultivierung von drei Wochen gemessen. Die Infektionsrate des Vektors lag über 90%. Dies bestätigten auch Fluoreszenzaufnahmen der infizierten Zellen 77/02 (Abb. 29).

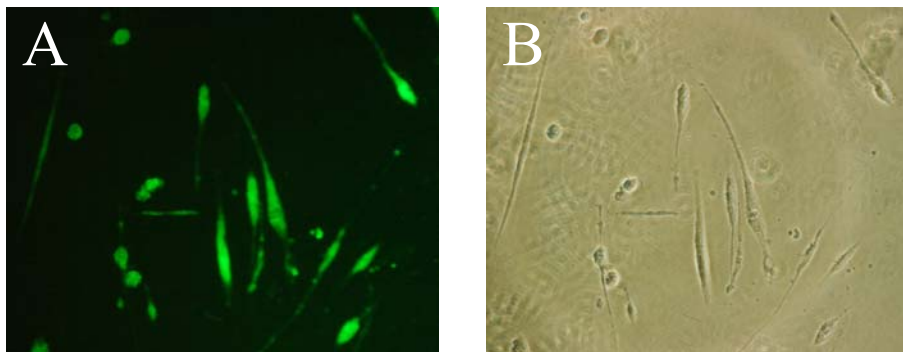


Abbildung 29: Mikroskopischer Nachweis der Infektion von SKMC 77/02 mit pLV-THM-p21-H1. Bei einer MOI von 40 waren nahezu alle Zellen GFP-positiv. Die Abbildungen A (FITC-Filter) und B (Hellfeld) zeigen den selben Bereich der Kultur. Die Vergrößerung betrug 200-fach.

Es wurde ein Proliferationstest der infizierten Zellen durchgeführt. Bei den Dys- Zellen 43/01 zeigte sich durch die Infektion mit pLV-THM-p21-H1 eine Abnahme in der Proliferation von 40%, während es bei den Dys- Zellen 77/02 zu einer Proliferationssteigerung von 63% kam (Abb. 30).

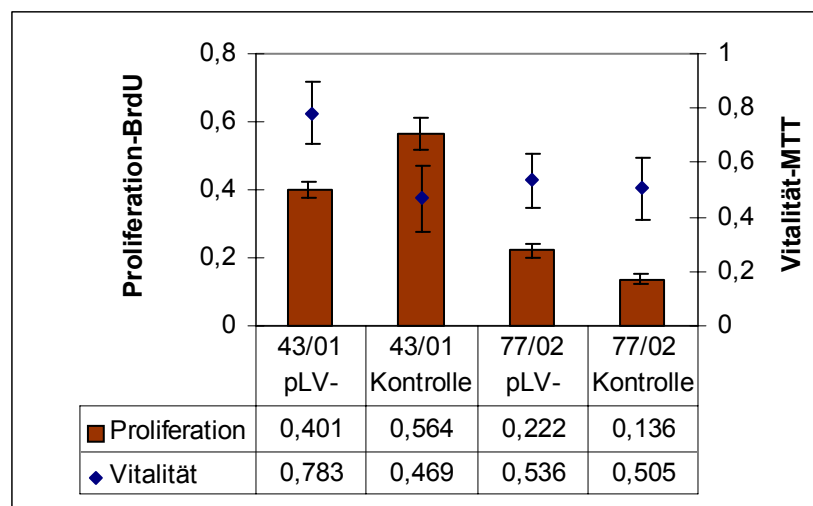


Abbildung 30 : Proliferations- und Vitalitätsassay Dys- SKMC 43/01 und 77/02 infiziert mit pLV-VTH-p21-H1. Es sind die absoluten Absorptions-Werte bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus acht durchgeführten Assays angegeben und die Standardabweichung im Diagramm dargestellt.

Im weiteren Verlauf des Versuches wurde das Verhalten der Zellen des Patienten 77/02 unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen in einem zeitlichen Verlauf ermittelt um festzustellen, ob die infizierten Zellen in der Lage sind zu differenzieren. Es wurde über sechs Tage alle 24 Stunden ein Test durchgeführt. Es konnte eine Steigerung der Proliferation sowohl unter Wachstums-Medium als auch unter Differenzierungs-Medium gemessen werden.

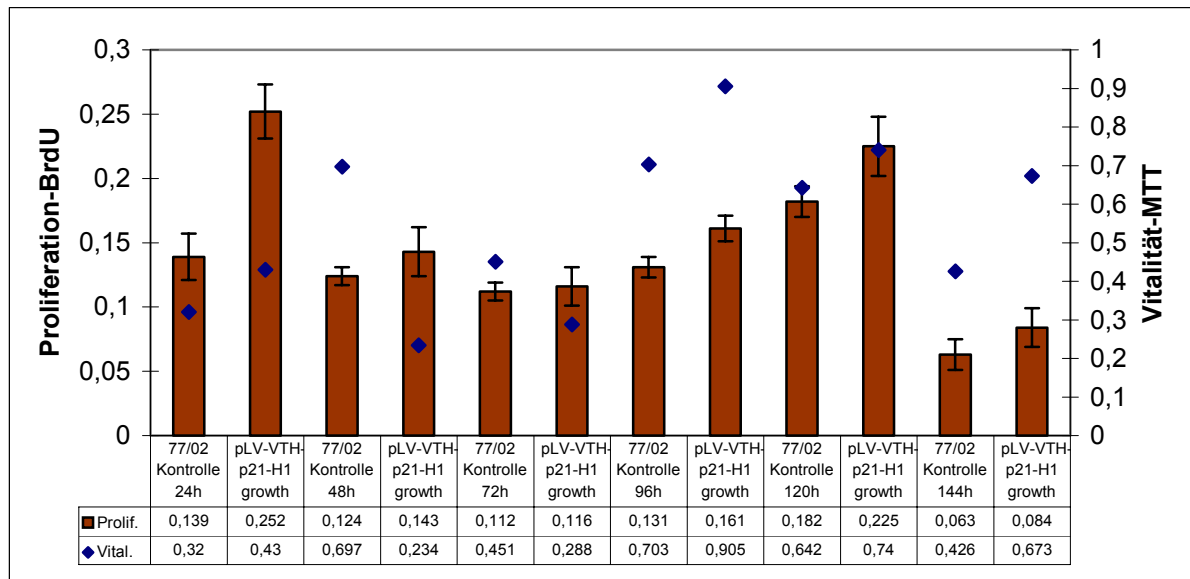


Abbildung 31: Infektion Dys- SKMC 77/02 mit pLV-VTH-p21-H1 kultiviert mit Wachstumsmedium. Die Analyse erfolgte nach je 24 Stunden bis 144 Stunden. Es sind die absoluten Absorptions-Werte bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus acht durchgeführten Assays angegeben und die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

Unter Wachstumsmedium zeigten die infizierten Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine höhere Proliferation als die Kontrollzellen. Nach 24 Stunden wurde der größte Unterschied mit 81% Steigerung zu den Kontrollzellen gemessen. Nach 72 Stunden wurde das Medium gewechselt, was Ursache für höhere Vitalitätswerte nach 96 Stunden sein könnte (Abb. 31).

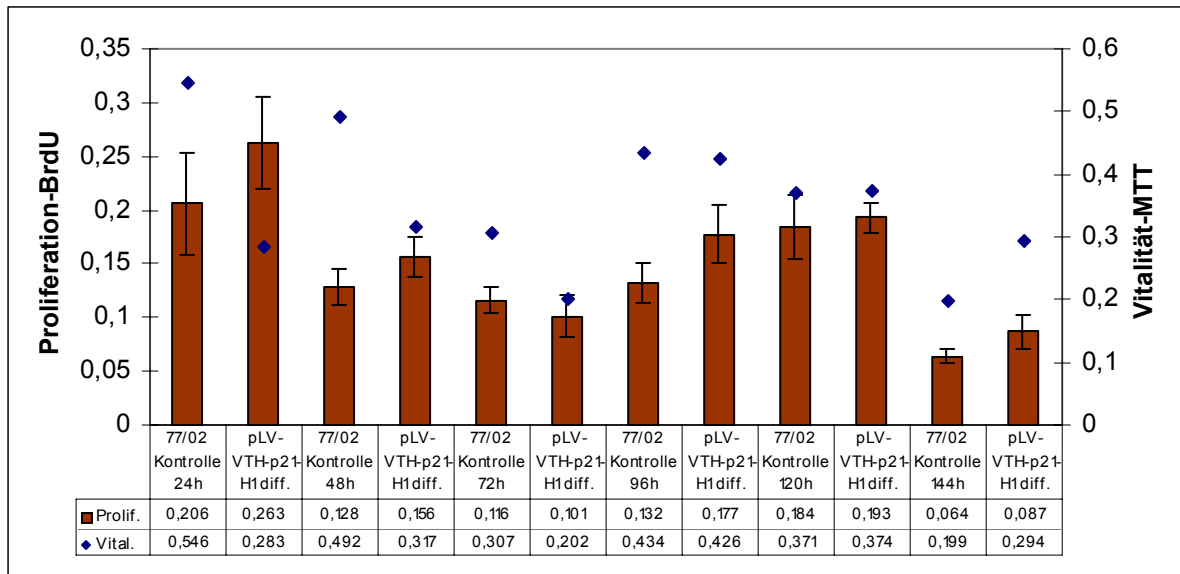
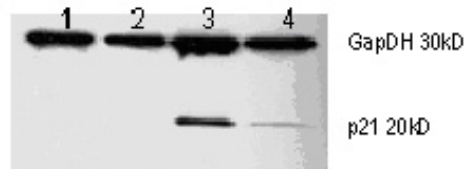


Abbildung 32: Infektion Dys- SKMC 77/02 mit pLV-VTH-p21-H1 kultiviert mit Differenzierungsmedium. Die Analyse erfolgte nach je 24 Stunden bis 144 Stunden. Es sind die absoluten Absorptions-Werte bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus acht durchgeführten Assays angegeben und die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

Auch im Differenzierungsmedium zeigten die infizierten Zellen stärkeres Wachstum als die Kontrollzellen. Nach 24 Stunden lag die Proliferation bei 27% über den Werten der Kontrolle, die höchste Proliferationssteigerung zeigte sich nach 96 und 144 Stunden mit 34% bzw. 36% (Abb.32). Es wurde ein Westernblot durchgeführt, um den p21 Gehalt zu überprüfen.



1: 77/02 mit pLV-VTHM-p21-H1 Wachstumsmedium
 2: 77/02 mit pLV-VTHM-p21-H1 Differenzierungsmedium
 3: 77/02 Differenzierungsmedium
 4: 77/02 Wachstumsmedium

Abbildung 33: Autoradiogramm eines Westernblots infizierter Dys- Zellen 77/02.

Der Westernblot zeigte eine vollständige Reduktion des p21 Gehaltes in den infizierten Zellen. Zwischen den Kontrollzellen ist ein Unterschied im p21 Gehalt erkennbar, welcher auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen ist, da in ausdifferenzierten Zellen der p21 Gehalt erhöht ist (Abb.33). In den infizierten Zellen 43/01 konnte keine Proteinreduktion detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Infektion von Zellen 77/02 unter Verwendung von pLV-VTH-p21-H1 wurde unter identischen Bedingungen wiederholt. Es konnte eine Proliferationssteigerung um 35% detektiert werden, jedoch zeigte sich der p21 Proteingehalt mit 97% unverändert.

Der Versuch unter Wachstums- und Differenzierungsbedingungen zeigte, dass die mit pLV-VTH-p21-H1 infizierten Zellen des Patienten 77/02 auch unter Differenzierungsbedingungen proliferieren und einen ähnlichen Verlauf wie unter Wachstumsbedingungen zeigen. Somit verhinderte der p21 *knockdown* eine vollständige Differenzierung der Zellen.

Im nächsten Versuch wurde das aufkonzentrierte Virus pLV-THM-p21-H3 verwendet und Dys- Zellen der Patienten 43/01 und 77/02 infiziert. Es kam wieder zum Verlust von ca. 50% der infizierten Zellen, weshalb diesmal neben der MOI von 40 auch eine niedrigere MOI von zehn verwendet wurde. Dies führte zu einem geringeren Verlust der Zellen. Die FACS-Analyse erfolgte fünf Wochen nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen 43/01 und 77/02 zu mehr als 87% GFP positiv. Dabei zeigten die Zellen mit einer MOI von zehn einen genauso hohen Anteil an GFP-positiven Zellen wie mit einer MOI 40. Eine Ursache hierfür ist vermutlich der selektive Vorteil durch eine erhöhte Proliferation der infizierten Zellen bei der Verwendung einer niedrigeren MOI, die nach einer Kultivierungsdauer von fünf Wochen zu einer Anreicherung der GFP positiven Zellen führte.

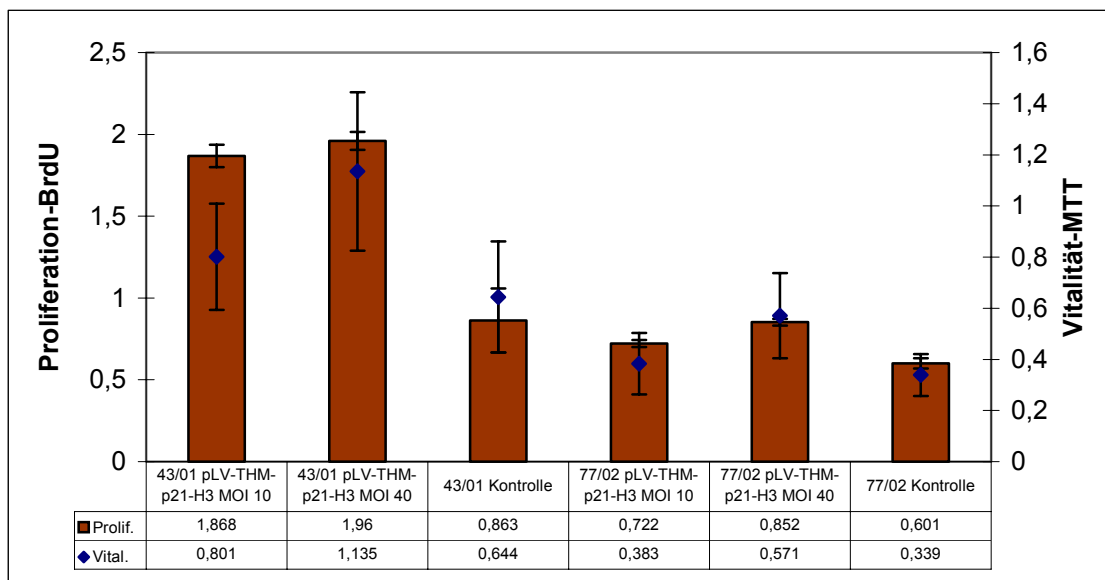


Abbildung 34: Proliferations- und Vitalitätsassay primärer Dys- SKMC 77/02 und 43/01. Die Zellen wurden mit einer MOI von zehn und MOI von 40 des Virus pLV-VTH-p21-H3 infiziert. Es sind die absoluten Absorptions-Werte bei der Wellenlänge 450nm dargestellt. In der Tabelle sind für jeden Wert die Mittelwerte aus acht durchgeführten Assays angegeben und die Standardabweichungen sind im Diagramm dargestellt.

Die mit einer MOI von 40 infizierten Zellen zeigten fünf Wochen nach der Infektion eine um 127% erhöhte Proliferation für die Zellen 43/01 und 42% für die Zellen 77/02. Bei einer MOI von zehn lag die Proliferationssteigerung für die Zellen 43/01 bei 116% bzw. 20% für die Zellen 77/02 (Abb.34).

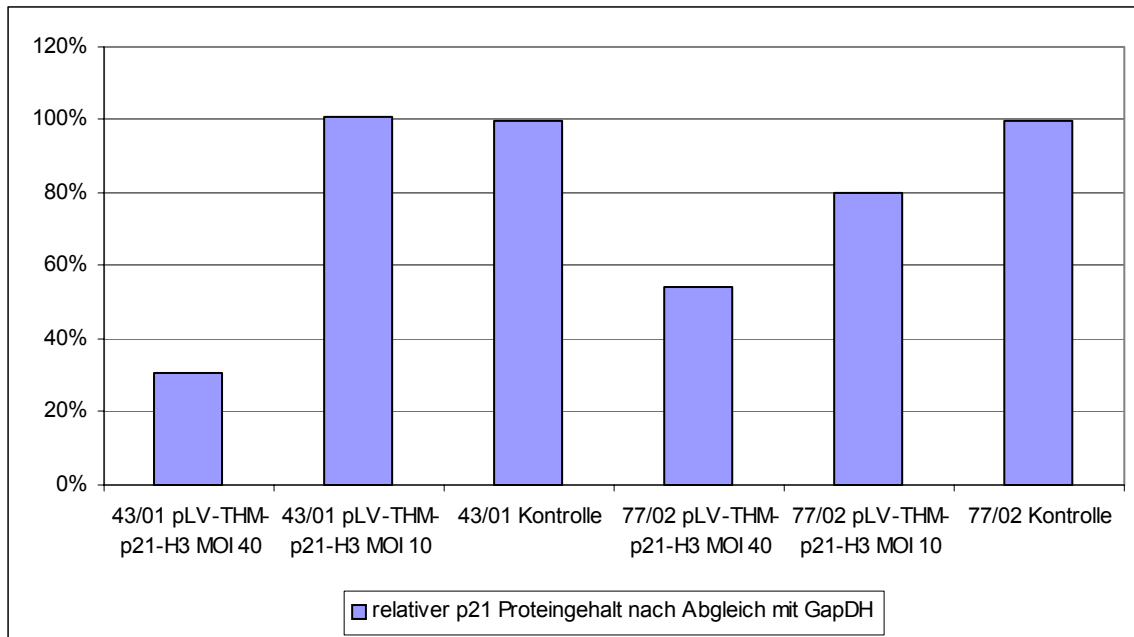


Abbildung 35 : Infizierte primäre SKMC 43/01 und 77/02 mit pLV-THM-p21-H3. Der p21 Proteingehalt wurde durch einen Westernblot densitometrisch ermittelt und die p21 Werte wurden mit den Werten für GapDH abgeglichen. Alle Werte sind in % auf die uninfectierte Kontrolle bezogen.

Der Westernblot zeigte zudem eine Reduktion im p21 Proteingehalt sowohl für die 43/01 als auch für die 77/02 bei einer MOI von 40 um 70% bzw. 46% (Abb. 35). Eine Reduktion im Protein für die Zellen, die mit einer MOI von zehn infiziert wurden, konnte jedoch nicht detektiert werden. Die Analyse des p21 mRNA Niveaus zeigte eine Reduktion um 89% für die Zellen 43/01 infiziert mit einer MOI von 40 und eine Reduktion um 59% bei einer MOI von zehn. Für die Zellen 77/02 zeigte sich bei einer MOI von 40 keine deutliche Reduktion, während es bei den mit einer MOI von zehn infizierten Zellen zu einer Reduktion von 48% kam (Abb. 36).

Obwohl die Zellen der Patienten 43/01 und 77/02 infiziert mit einer MOI von zehn im FACS dieselbe Infektionsrate zeigten, als mit einer MOI von 40, ist die Reduktion des p21 Proteingehaltes bei einer MOI von 40 größer. Dies resultiert in einer erhöhten Proliferationssteigerung und konnte auch auf mRNA Ebene für die Zellen 43/01 bestätigt werden. Eine Erklärung wäre, dass es bei einer höheren Anzahl von infektiösen Partikeln pro Zelle zu mehr integrierten Viruskopien kommt. Dies erlaubt die Hypothese, dass die Wirkung der siRNA von der Anzahl der integrierten Konstrukte abhängt und dass die siRNA Expression einer einzelnen Kopie den biologischen Mechanismus der RNA Interferenz noch nicht auslastet bzw. der siRNA Effekt durch eine höhere Expression gesteigert werden kann.

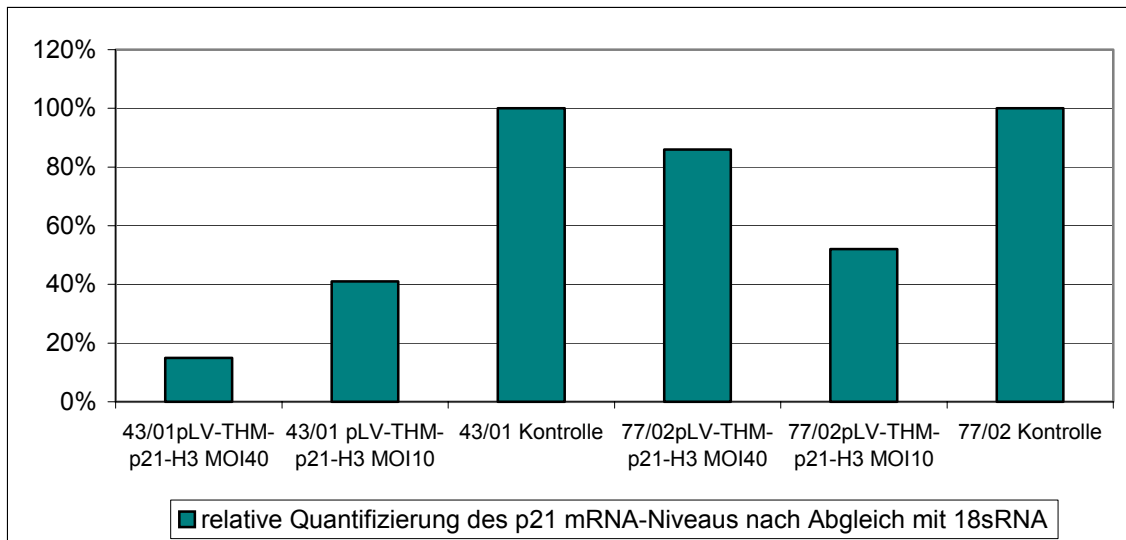


Abbildung 36: Infizierte primäre SKMC 43/01 und 77/02 mit pLV-THM-p21-H3. Die relative Quantifizierung des p21 mRNA-Niveaus wurde mittels realtime PCR durchgeführt. Der Abgleich erfolgte über die 18sRNA Expression und wurde mittels ddCT Methode ausgewertet. Alle Werte sind in % auf die uninifizierte Kontrolle bezogen.

Es kann festgehalten werden, dass die siRNA III einen Effekt sowohl auf die Zellproliferation als auch auf die p21 mRNA bzw. Proteinexpression in Dys- Zellen 43/01 und 77/02 bei einer MOI von 40 zeigte, während die siRNA I nur beim Versuch mit Dys- Zellen des Patienten 77/02 einen Effekt zeigte. Die Tabelle 12 faßt die Ergebnisse mit viral vermittelter siRNA zusammen.

Tabelle 12: Ergebnisse der viral vermittelten p21 siRNA Expression auf die Proliferation, p21-Protein und p21 mRNA-Expression in primären Dys+ und Dys- Myoblasten.

	Eingesetzte	Virus-	Zeit bis zur	Proliferations-	mRNA-	Protein-
viral	siRNA	Konz.	Analyse	steigerung	Reduktion	Reduktion
77/02 Dys-	shRNA 1	Überstand	18 Tage	7%	43%	8%
77/02 Dys-	shRNA 3	Überstand	18 Tage	67%	89%	19%
43/01 Dys-	shRNA 1	MOI 40	21 Tage	-40%		
77/02 Dys-	shRNA 1	MOI 40	21 Tage	35%		3%
77/02 Dys-	shRNA 1	MOI 40	21 Tage	63%		100%
43/01 Dys-	shRNA 3	MOI 40	35 Tage	127%	85%	70%
77/02 Dys-	shRNA 3	MOI 40	35 Tage	40%	14%	46%
43/01 Dys-	shRNA 3	MOI 10	35 Tage	116%	59%	-1%
77/02 Dys-	shRNA 3	MOI 10	35 Tage	20%	48%	20%