

Aus dem Institut für Humangenetik, Campus Virchow-Klinikum  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einsatz von transienter und stabiler RNA-Interferenz zur Erhöhung  
der Proliferation von Dystrophin-positiven und -negativen Myoblasten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt an der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Kliche

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Karl Sperling

2. Prof. Dr. Astrid Speer

3. Prof. Dr. Hanns Lochmüller

Datum der Promotion: 10.11.06

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>DAS DYSTROPHIN-GEN</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>DAS DYSTROPHIN-PROTEIN</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>DIAGNOSE DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE</b>	<b>6</b>
<b>2.4</b>	<b>THERAPIE DER MUSKELDYSTROPHIE DUCHENNE</b>	<b>6</b>
2.4.1	DYSTROPHIN BASIERTE THERAPIESTRATEGIEN	7
2.4.2	DOWNSTREAM THERAPIE	12
<b>2.5</b>	<b>RNA-INTERFERENZ</b>	<b>15</b>
2.5.1	WIRKUNGSMECHANISMUS	15
2.5.2	RNA-INTERFERENZ IN EUKARYONTEN	17
2.5.3	TRANSIENTE EXPRESSION	18
2.5.4	STABILE EXPRESSION	19
2.5.5	ANWENDUNG VON siRNA IN DER GENTHERAPIE	20
<b>2.6</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>25</b>
3.2.1	KULTIVIERUNG	25
3.2.2	KRYOKONSERVIERUNG	25
3.2.3	TRANSFEKTION VON siRNA	26
3.2.4	ZELL-VITALITÄTS ASSAY	27
3.2.5	ZELL-PROLIFERATIONS ASSAY	27
3.2.6	HERSTELLUNG UND AUFKONZENTRIERUNG VON VIRUSPARTIKELN	27
3.2.7	BESTIMMUNG DES VIRUSTITERS	28
3.2.8	INFEKTION VON ZELLEN	29
3.2.9	ISOLIERUNG VON MURINEN ZELLKLONEN	29
3.2.10	ZELLYSE EUKARYONTISCHER ZELLEN	29
<b>3.3</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>30</b>

3.3.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	30
3.3.2	TRANSFORMATION VON DNA IN <i>E. COLI</i>	30
3.3.3	HERSTELLUNG VON GLYCEROLSTOCKS	30
<b>3.4</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>31</b>
3.4.1	NUKLEINSÄURE-ANALYTIK	31
3.4.2	PROTEIN-ANALYTIK	35
<b>3.5</b>	<b>PHYSIKALISCHE METHODEN</b>	<b>37</b>
3.5.1	FLUORESZENZ-MIKROSKOPIE	37
3.5.2	FLUORESZENZ-AKTIVIERTE ZELLSORTIERUNG (FACS)	37
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>VERSUCHE MIT siRNA</b>	<b>39</b>
4.1.1	AUSTESTUNG DER TRANSFEKTIONSBEDINGUNGEN VON siRNA AN PRIMÄREN HUMANEN MYOBLASTEN	39
4.1.2	TESTUNG DER p21 siRNA AN HUMANEN DYSTROPHIN-POSITIVEN MYOBLASTEN	42
4.1.3	TESTUNG DER p21 siRNAs AN HUMANEN DYSTROPHIN-NEGATIVEN MYOBLASTEN	45
4.1.4	TESTUNG MURINER p21 siRNA	50
<b>4.2</b>	<b>LENTIVIRALE VEKTOREN</b>	<b>53</b>
4.2.1	MURINER VEKTOR	53
4.2.2	HUMANER VEKTOR	57
<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>RNA-INTERFERENZ</b>	<b>66</b>
5.1.1	ETABLIERUNG DES TRANSFEKTIONSSYSTEMS FÜR siRNA IN PRIMÄREN HUMANEN MYOBLASTEN	66
5.1.2	IDENTIFIZIERUNG VON p21 siRNA UND EINSATZ IN EINEM LENTIVIRALEN VEKTORSYSTEM	66
5.1.3	VERGLEICH DER si/shRNA WIRKUNG AUF mRNA-, PROTEIN- UND FUNKTIONELLER EBENE	68
5.1.4	UNSPECIFISCHE EFFEKTE VON si/shRNA	69
<b>5.2</b>	<b>EINSATZ VON VIRALEN VEKTORSYSTEMEN IN DER GENTHERAPIE</b>	<b>73</b>
<b>5.3</b>	<b>FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN DER p21 REDUKTION</b>	<b>75</b>
5.3.1	MÖGLICHE NEBENWIRKUNGEN DER p21 REDUKTION	75
5.3.2	PROLIFERATIONSVERDOPPLUNG ALS THERAPIE DER DUCHENNE MUSKELDYSTROPHIE	76
<b>6</b>	<b><u>AUSBLICK</u></b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>80</b>

**DANKSAGUNG** **89**

**PUBLIKATIONEN** **90**

**LEBENS LAUF** **91**

**ERKLÄRUNG** **92**

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AAV</b>	Adeno-assoziiertes Virus
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ASO</b>	Antisense Oligonukleotide
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AV</b>	Adeno Virus
<b>BCA</b>	<i>bicinchonic acid</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BMD</b>	Becker Muskeldystrophie
<b>BSA</b>	Rinder-Serumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celcius
<b>C</b>	Cytosin
<b>CdK</b>	Cyclin-abhängige Kinasen
<b>Cys</b>	Cystein
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DGC</b>	Dystrophin-Dystroglycan-Proteinkomplex
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMD</b>	Duchenne Muskeldystrophie
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotidphosphat
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>DP</b>	Dimerisierungspartner
<b>ds</b>	Doppelsträngig
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-tetraessigsäure
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>env</b>	<i>envelope</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FSC</b>	<i>forward scatter</i>
<b>g</b>	Erdbeschleunigungskonstante 9,8 m/s <sup>2</sup>
<b>G</b>	Guanin
<b>gag</b>	<i>groupspecific-antigen</i>
<b>GapDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
<b>GFP</b>	<i>Green-fluorescence protein</i>
<b>h</b>	Stunde
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienzvirus
<b>ITR</b>	<i>inverted terminal repeat</i>

<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>LB-Medium</b>	Luria-Bertani-Medium
<b>LTR</b>	<i>long terminal repeat</i>
<b>LV</b>	Lentivirus
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>Min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MLV</b>	Murines leukämie Virus
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity of infection</i>
<b>MOPS</b>	3-(n-Morpholin)-propansulfonsäure
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>miRNA</b>	<i>microRNA</i>
<b>NOS</b>	Stickstoffoxid-Synthetasen
<b>nt</b>	Nukleotid
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PBS</b>	<i>phosphat-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>pol</b>	Polymerase
<b>RB</b>	Retinoblastom
<b>RISC</b>	<i>RNA induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>RNAi</b>	<i>RNA interference</i>
<b>rpm</b>	Rotationen pro Minute
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>s</b>	Sekunde
<b>SCID</b>	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SIN</b>	<i>Self inactivating</i>
<b>siRNA</b>	<i>short interfering RNA</i>
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin RNA</i>
<b>SKMC</b>	<i>skeletal muscle cells</i>
<b>SSC</b>	<i>side scatter</i>
<b>T</b>	Thymin
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming growth factor β</i>
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	<i>units</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>

# 1 Zusammenfassung

Die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) gehört zu den häufigsten erblichen Muskeldystrophien im Kindesalter. Gegenwärtig werden die Substitution von Dystrophin oder ähnlichen Proteinen sowie die Korrektur der Mutation und damit die Wiederherstellung der Dystrophinexpression als gentherapeutische Strategien verfolgt. Jedoch führt sowohl die Herstellung der Dystrophinexpression als auch die Verwendung von viralen Transfersystemen im adulten Organismus zu Reaktionen des Immunsystems. Zudem wird eine autologe *ex vivo* Therapie durch eine limitierte Zahl an Myoblasten eingeschränkt.

Fetale und Dystrophin-*Downstream* Konzepte könnten Probleme der genannten Strategien umgehen bzw. sinnvoll unterstützen. Expressionsuntersuchungen in Dystrophin negativen (Dys-) Muskelzellen zeigten Veränderungen in Genen für Zellwachstum und Differenzierung. So wiesen Biopsien von DMD-Patienten ein erhöhtes Niveau an p21 mRNA auf, einem Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor, der hoch reguliert das Fortschreiten der Zellen von der G1 zur S1 Phase im Zellzyklus und somit die Zellteilung inhibiert. Ein erhöhtes Niveau von p21 schränkt somit die Zielzellen für eine autologe *ex vivo* oder *in vivo* Gen- und Zelltherapie ein.

Die Reduktion von p21 würde die Möglichkeit bieten das Reservoir an Myoblasten zu erhalten oder wiederherzustellen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Etablierung der p21 Inhibition *in vitro* durch RNA-Interferenz. Hierfür wurden optimale Transfektionsbedingungen und funktionelle siRNAs ermittelt. Die effektiven siRNAs wurden in einem lentiviralen Vektorsystem verwendet, um einen möglichst vollständigen und stabilen p21 *knockdown* zu erzielen. Dies geschah für primäre humane Myoblasten und für murine C2C12 Zellen, um den Effekt der p21 Inhibition auf die Proliferation zu untersuchen. Die Austestung an murinen Zellen erlaubt die Entwicklung eines Systems für einen *in vivo* Versuch am mdx-Mausmodell.

Zwei in humanen Myoblasten wirksame siRNAs gegen p21 kamen an Dys- Zellen zum Einsatz. Die siRNA induzierte p21 Proteinreduktion betrug 72 Stunden nach Transfektion 29% bis 78%. Die p21 Proteinreduktion resultierte in einer Proliferationssteigerung von 11% bis 47% gegenüber unbehandelten Kontrollen. Die Expression von siRNA im lentiviralen Vektor führte zu einer nachhaltigen p21 Proteinreduktion von 70% fünf Wochen nach Infektion in Zellen eines DMD Patienten. Die Proliferation der infizierten Zellen stieg um 127%. Wiederholte Infektionen von Zellen eines anderen Patienten zeigten einen Proliferationsanstieg von 35% bis 63%. Die Unterschiede in der p21-Reduktion und der



Proliferationssteigerung weisen auf eine hohe Varianz des siRNA Effektes hin. Hierbei können Unterschiede im Integrationsort des lentiviralen Vektors und individuelle Schwankungen in der p21 Basisexpression eine Rolle spielen. Die p21 Inhibition verhinderte eine vollständige Differenzierung.

Für murine Zellen wurde ebenfalls eine siRNA identifiziert, die nach transienter Transfektion zu einer p21 Inhibition von 61% nach 48 Stunden führte.

Die abgeleitete, viral exprimierte shRNA erzielte jedoch nur eine Reduktion von 30% gegenüber Kontrollen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine stabile p21 Reduktion mittels viral vermittelter RNA-Interferenz in der Lage ist die Proliferation von Dys- Zellen zu steigern. Damit könnte der stetige Verlust von Myoblasten bei DMD Patienten eingeschränkt werden, was zum Erhalt der Zielzellen für eine Gen- und Zelltherapie führt. Weiterführende Arbeiten zur Regulation der p21 siRNA Expression müssen jedoch eine Redifferenzierung der Myoblasten sicherstellen und sich dem Infektionsbedingten Zellverlust stellen. Während eine p21 Reduktion alleine keine Ursache für eine Onkogenese zu sein scheint, müssen verbesserte retrovirale Systeme Integration-bedingte Risiken minimieren.

## Danksagung

*Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.*

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), amerik. Soziologe u. Ökonom

Für die sehr gute und engagierte wissenschaftliche Betreuung danke ich Frau Prof. Dr. Astrid Speer.

Für die Betreuung seitens der Humboldt Universität danke ich Herrn Prof. Dr. Karl Sperling

Meinen Dank möchte ich zudem allen Mitarbeitern des Fachbereiches Biotechnologie and der Technischen Fachhochschule, im Besonderen Stefanie Endesfelder für die Einarbeitung in die Thematik aussprechen, die mir stets mit Tipps und Materialien zu Seite standen.

Ich bedanke mich bei Marko Sifringer, Dr. Stephan Lobitz, Boris Thurisch, Dr. Christiane Bommer sowie der Arbeitsgruppe von Dr. Denner am Robert-Koch-Institut für die Nutzung diverser Geräte und dem Austausch von Erfahrungen.

Dr. Michael Themis und Prof. Charles Coutelle danke ich für den Aufenthalt am Imperial College in London sowie für die Einarbeitung im Umgang mit viralen Vektorsystemen. Ich danke Herrn Prof. Dr. Christof Dame für die zur Verfügung gestellten Laboreinrichtungen

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildungszeit unterstützt und an mich geglaubt hat. Speziell danke ich Kristina, die mir nicht nur wissenschaftlich zur Seite stand, sondern alle anderen Teile meines Lebens in den letzten Jahren bereicherte.

# Lebenslauf

**Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.**

## Publikationen

- VERÖFFENTLICHUNG Endesfelder S\*, **Kliche A\***, Lochmuller H, von Moers A, Speer A. Antisense oligonucleotides and short interfering RNAs silencing the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 improve proliferation of Duchenne muscular dystrophy patients' primary skeletal myoblasts J Mol Med. 2005 Jan;83(1):64-71. Epub 2004 Nov 05.  
\*Gleichwertige Autoren
- VERÖFFENTLICHUNG Georg N. Duda, **Alexander Kliche**, Ralf Kleemann, Jan E. Hoffmann, Michael Sittinger, Andreas Haisch. Does Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulate Maturation of Tissue Engineered Cartilage. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004 Jan 15;68(1):21-8
- VERÖFFENTLICHUNG Endesfelder S, Bucher S, **Kliche A**, Reszka R, Speer A. Transfection of normal primary human skeletal myoblasts with p21 and p57 antisense oligonucleotides to improve their proliferation: a first step towards an alternative molecular therapy approach of Duchenne muscular dystrophy. J Mol Med. 2003 Jun;81(6):355-62. Epub 2003 May 06.
- POSTERPRÄSENTATION **Kliche A.**, Themis M., Dame C., Moers A., Lochmüller H., Lobitz S., Coutelle C. and Speer A. Increased proliferation of primary human Dystrophin-negative (Dys- ) myoblasts by stabile transfection with a p21-shRNA Lentivirus-construct. 13. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Gentherapie in Prag vom 29.10.-1.11.2005
- MITARBEIT AN POSTERPRÄSENTATION Endesfelder S, **Kliche A**, Bucher S, Lochmüller H, von Moers A, Speer A. Downregulation of p21 by use of ASO or RNAi improves proliferation of dystrophin negative myoblasts in cell culture auf der 11. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Gentherapie in Edinburgh vom 14.-17.11.2003.

## Erklärung

Ich, Alexander Kliche, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einsatz von transienter und stabiler RNA Interferenz zur Erhöhung der Proliferation von Dystrophin- positiven und - negativen Myoblasten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift