

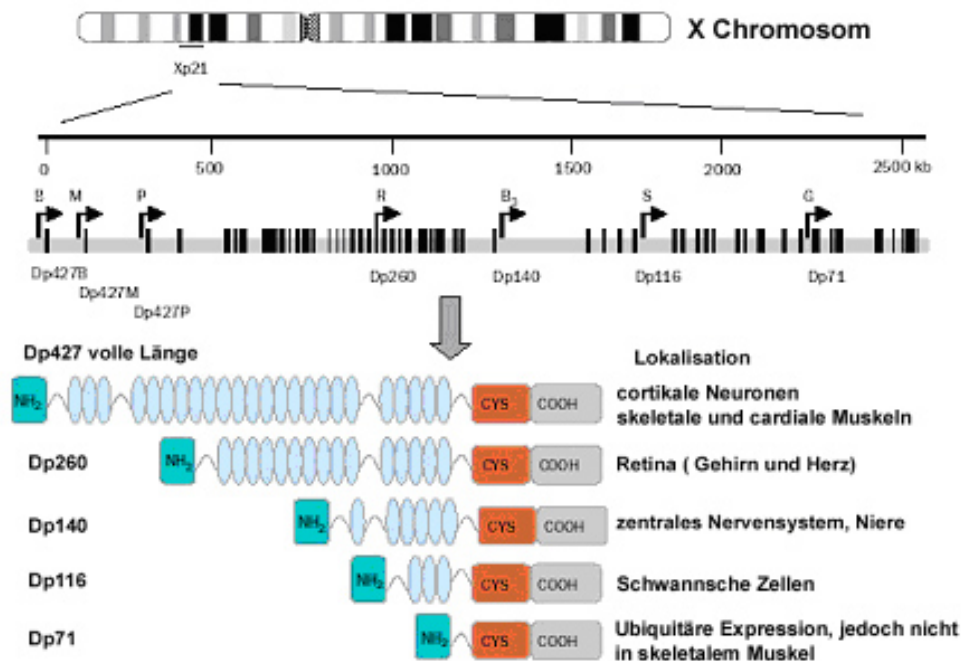
## 2 Einleitung

Muskeldystrophien sind Erkrankungen, die durch einen Schwund an Muskelgewebe charakterisiert sind, welchem unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Ein genetischer Defekt ist häufig die Ursache einer Muskeldystrophie. Die Einteilung in die verschiedenen Formen erfolgt nach klinischer Symptomatik sowie Art des genetischen Defekts. Der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD) und der milderen Form vom Typ Becker (BMD) liegt ein Defekt im Gen für das Dystrophin zugrunde. Während dieser Defekt bei DMD Patienten einen totalen Funktionsverlust des Dystrophins zur Folge hat, ist das Dystrophin bei BMD Patienten verkürzt und teilweise funktionsfähig. Das Dystrophin liegt auf dem X-Chromosom, weshalb sich die Krankheit nahezu ausschließlich bei Jungen manifestiert. Die DMD tritt mit einer Häufigkeit von 1:3500 unter männlichen Neugeborenen auf. Die BMD hat eine Inzidenz von 1:30.000-60.000. Frauen, die durch das zweite X-Chromosom ein funktionell intaktes Dystrophin-Gen besitzen, sind lediglich Träger des Defektes. Zunächst zeigt sich bei betroffenen Kindern eine verlangsamte motorische Entwicklung, später fallen Muskelschwächen im Bereich der Beckenmuskulatur auf. Betroffene Kinder lernen verspätet laufen. Aufstehen oder Hinlegen sind verschlechtert, und sie nutzen oft Gegenstände, um sich an ihnen hochzuziehen. Das Aufstützen der Hände auf den Knien beim Aufstehen wird als Gower-Manöver bezeichnet und ist die Folge der Muskelschwäche. Eine zusätzliche mentale Retardierung betrifft etwa ein Drittel der Patienten. Im Alter zwischen sieben und zwölf Jahren lässt die Muskulatur des Oberkörpers weiter nach; sie wird durch Fett- und Bindegewebe ersetzt. Im späteren Krankheitsstadium sind auch Herz- und Atemmuskulatur betroffen. Patienten mit DMD versterben im Alter von 20-25 Jahren an Atem- oder Herzinsuffizienz. Der Krankheitsverlauf bei DMD Patienten ist jedoch individuell unterschiedlich, so dass die zeitliche Abfolge der auftretenden Symptome variieren kann. Bei BMD Patienten treten die Symptome oft erst mit dem zweiten Lebensjahrzehnt auf. Die Schwäche zeigt sich dann im Bereich der Becken- und Schultermuskulatur. Im Gegensatz zur symmetrischen Muskelschwäche beim Typ Duchenne, kann es beim Typ Becker auch zu einer einseitigen Muskelschwäche kommen. Klinisch Betroffene erreichen oft ein höheres Alter und sind selten auf den Rollstuhl angewiesen. Die Schwäche des Herzmuskels bestimmt oft die Lebenserwartung eines Patienten vom Typ Becker.

### 2.1 Das Dystrophin-Gen

Eine Mutation auf dem kurzen Arm des X Chromosoms im Gen, welches für Dystrophin kodiert, wurde bereits vor fast 20 Jahren als Ursache der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne bzw. Becker identifiziert<sup>1</sup>. Das Dystrophin-Gen ist mit 2,4 Megabasen eines der größten Gene im menschlichen Genom<sup>2</sup>. Es besitzt 79 Exons. Durch sieben verschiedene gewebespezifische Promotoren sowie durch alternatives Spleißen der prä-mRNA kommt es zur Bildung von verschiedenen Isoformen des

Dystrophins. Diese werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Abbildung 1 zeigt Größe und Lokalisation der Dystrophin-Isoformen.



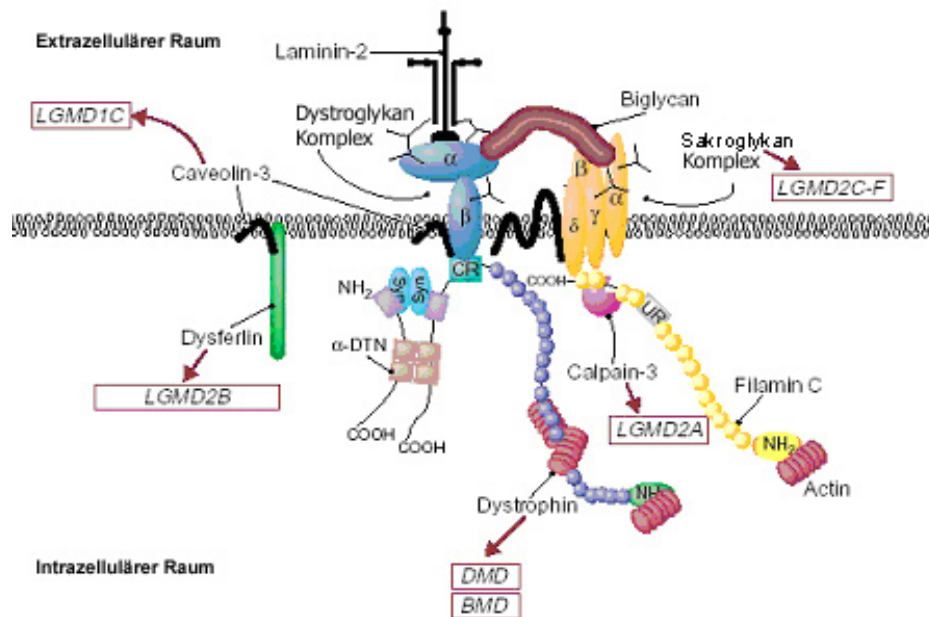
**Abbildung 1:** Darstellung des Dystrophinlocus mit den 7 Promotoren und den daraus entstehenden Isoformen sowie deren Lokalisation. Das Volllängenprodukt mit 427kD wird von drei Promotoren, die mit B, M und P gekennzeichnet sind, exprimiert. Die Dystrophingen-Produkte (DP) besitzen alle eine aminoternale- (NH<sub>2</sub>) und carboxyterminale (COOH)-Domäne sowie eine cysteinreiche Region (CYS) (geändert, nach Muntoni 2003<sup>3</sup>).

## 2.2 Das Dystrophin-Protein

Die häufigste Form des Dystrophin-Proteins in skeletalem Muskel ist 427kD groß. Dieses *full-length* Dystrophin kann in vier strukturelle Domänen eingeteilt werden. Die Aktin-bindende Domäne befindet sich am N-terminalen Ende und besteht aus 220 Aminosäuren. Die folgende Stabregion macht ca. 70% des Proteins aus und besteht aus repetitiven Sequenzen von je 110 Aminosäuren. Am Ende der Stabregion schließt sich eine hoch konservierte cysteinreiche Region an<sup>3</sup>. Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass diese Region die Interaktion von Dystrophin mit dem intrazellulären Teil des  $\beta$ -Dystroglykans beeinflusst. Es wird vermutet, dass dies eine entscheidende Bindungsstelle des Dystrophins an die Zellmembran ist, so dass eine Mutation in diesem Bereich zu einem totalen Funktionsverlust führt<sup>4</sup>. Die carboxyterminale Region besitzt eine  $\alpha$ -helikale Struktur, mit der sie eine Interaktion zwischen Proteinen der Syntrophin-Familie eingeht<sup>5</sup>. Die carboxy-terminale Region scheint jedoch für eine normale Muskelfunktion nicht entscheidend zu sein<sup>6</sup>.

Dystrophin ist nicht nur an der Cytoplasmamembran von skeletalen und glatten Muskelzellen lokalisiert<sup>7</sup>, sondern findet sich auch in Neuronen des zentralen Nervensystems<sup>8</sup>. Verkürzte Formen des Dystrophins werden in verschiedenen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel Dp260 in Synapsen der

Retina<sup>9</sup>, oder Dp116 an der Zellmembran von Schwannschen Zellen im peripheren Nervensystem<sup>10</sup> (Abb.1).



**Abbildung 2: Dystrophin-Komplex mit den beteiligten Proteinen und die Bezeichnung der Dystrophieform bei funktionellem Ausfall des betreffenden Proteins<sup>11</sup>.** Abkürzungen: LGMD: Limbgürtel-Muskeldystrophie, CR: cysteinreiche Region, Syn: Syntrophin, DMD: Duchenne Muskeldystrophie, BMD: Becker Muskeldystrophie.

Dystrophin ist Teil eines Komplexes, der in der Membran von Muskelzellen lokalisiert ist (Abb. 2). Dieser Komplex beinhaltet sowohl integrale Proteine (Dystroglykan, Sarkoglykan) als auch periphere Membranproteine (Dystrophin, Syntrophin). Das C-terminale Ende des Dystrophins ist mit dem Dystroglykan-β verbunden, welches in der Membran an α-, β-, γ-, δ- und ε-Sarkoglykanen gebunden ist. Die Sarkoglykane bilden einen eigenen Komplex in der Membran mit noch ungeklärter Funktion<sup>11</sup>. Weiterhin besteht über α- und β- Dystroglykan die Verbindung zu Laminin-2 in der extrazellulären Matrix<sup>12</sup>. Fünf Syntrophine, welche untereinander einen Komplex bilden, sind am C-terminalen Ende des Dystrophin gebunden. Sie besitzen eine Reihe von Domänen mit denen sie Stickoxid-Synthetasen binden können und Einfluss auf Na<sup>+</sup> Kanäle haben<sup>13,14</sup>. Mit dem N-terminalen Ende ist Dystrophin mit Aktinfilamenten des Cytoskeletts verbunden. Dystrophin stellt das Grundgerüst dieses Komplexes dar, sein Fehlen führt zu einer veränderten Lokalisation des gesamten Dystrophin-Glykan-Komplexes<sup>15,16</sup>. Sind die Aktinfilamente des Cytoskeletts so nicht mehr mit der extrazellulären Matrix verbunden, führt dies zu einer Instabilität des Sarkolems. Bei wiederholter Kontraktion des Muskels kommt es zu einer Degradierung der Muskelfasern. Unterstützt wird dieses pathogenische Modell durch Beobachtungen am Mausmodell der DMD, den mdx-Mäusen, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber mechanischem Stress der Muskeln im Vergleich zu Kontrollen zeigten<sup>17,18</sup>. Dies demonstriert, dass Dystrophin mit den

assoziierten Proteinen eine wichtige Rolle für die Stabilität und Funktion der Muskelfasern spielt. Die Beobachtung, dass sowohl bei Patienten mit DMD als auch im Mausmodell der Gehalt an intrazellulärem Kalzium erhöht ist, lässt vermuten, dass Dystrophin auch einen Einfluss auf die Kalziumhomeostase hat<sup>19</sup>. Primäre Muskelzellen von DMD Patienten zeigten eine erhöhte *leak channel* Aktivität, welche die Kalziumpermeabilität des Sarkolems beeinflusst<sup>20</sup>. Es wurde gezeigt, dass durch die erhöhte Kalziumkonzentration Signalkaskaden ausgelöst werden, welche eine starke Entzündungsreaktion induzieren<sup>20</sup>. Dabei konnte eine erhöhte Expression der Entzündungsmediatoren bereits vor dem Auftreten der klassischen Symptome einer Dystrophie nachgewiesen werden<sup>21</sup>. Bei Oak et al. ist die Rekrutierung von Signalmolekülen durch die Bindung von Laminin an  $\alpha$ -Dystroglykan beschrieben, wodurch es zu einer Änderung der Struktur der Aktinfilamente kommt<sup>22</sup>.

### 2.3 Diagnose der Muskeldystrophie Duchenne

Die Diagnose wird meist erst beim Auftreten erster Symptome im Alter von 1-2 Jahren gestellt. Eine erhöhte Kreatinphosphokinase im Blut des Patienten weist auf eine myogene Erkrankung hin. Bei neurogenen Erkrankungen ist die Kreatinphosphokinase äußerst selten erhöht. Mittels PCR-Analytik von DNA aus weissen Blutzellen wird bei erhöhten Kreatinphosphokinase-Werten eine Untersuchung auf mögliche Mutationen im Dystrophingen durchgeführt. Bei positivem Befund kann auf eine Muskelbiopsie verzichtet werden.

An Gewebeschnitten aus einer Muskelbiopsie wird mit verschiedenen Antikörpern das Vorhandensein von Dystrophin sowie seiner verkürzten Formen und von Sakroglycanen überprüft. Die Ergebnisse der Immunhistologie sollten durch einen Immunblot verifiziert werden, da dieser auch eine Auskunft über die Größe des exprimierten Proteins gibt. Dies erlaubt in der Regel eine genaue Bestimmung der Art der Myopathie. Molekularbiologische Untersuchungen können im Anschluss genauere Auskunft über die Art der Mutation geben<sup>23</sup>.

### 2.4 Therapie der Muskeldystrophie Duchenne

Eine kausale und effiziente Therapie für DMD ist nicht verfügbar. Es gibt jedoch zahlreiche Ansätze, um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen und die Krankheit zu behandeln. Für experimentelle Arbeiten wurden transgene Tiere als Modellorganismus für die Muskeldystrophie entwickelt. Am häufigsten kommt die mdx-Maus zum Einsatz, bei der durch eine Punktmutation die Expression des Dystrophin ausgeschaltet ist. Im Gegensatz zum Menschen zeigt die Maus nur in den ersten Wochen das typische Krankheitsbild der Muskeldystrophie. Sie kann später den Defekt besser als der Mensch kompensieren. Sie bleibt gefähig und hat nur eine gering verkürzte Lebenserwartung. Um einen dem Menschen ähnlicheren Krankheitsverlauf zu erreichen, wurden Doppelmutanten hergestellt, denen neben

Dystrophin ein weiteres Gen, z.B. Utrophin oder ein anderes Protein im Dystrophin-Dystroglykokan-Komplex (DGC), fehlt. Diese Mäuse zeigten einen progressiveren Krankheitsverlauf. Als weiteres transgenes Tiermodell steht ein Dys- Hund (Golden Retriever) zur Verfügung, dessen Krankheitsverlauf dem des Menschen recht ähnlich ist. Dieser zeigt einen fortschreitenden Untergang an Muskelgewebe und hat eine deutlich reduzierte Lebenserwartung<sup>24</sup>. Auf die molekulargenetischen, pharmakologischen und zellbasierenden Therapiestrategien wird im folgenden näher eingegangen. Die physiotherapeutischen und chirurgischen Maßnahmen, die ebenfalls zu einer verbesserten Lebensqualität beitragen, werden in dieser Arbeit nicht beschrieben.

## **2.4.1 Dystrophin basierte Therapiestrategien**

### **2.4.1.1 Dystrophin Substitution**

Wie bei allen monogenen Erkrankungen verspricht die Gentherapie mit dem Einbringen einer korrekten Kopie des Gens die Wiederherstellung der Funktion und eine vollständige Heilung. Schon früh konnte am Tiermodell der mdx-Maus gezeigt werden, dass der Gentransfer von Dystrophin die Symptome der Krankheit umkehren bzw. vollständig unterdrücken kann<sup>25,26</sup>. Eine geringe Dystrophin-Expression kann bereits zu einer signifikanten Verbesserung des Krankheitsverlaufes führen<sup>27,28</sup>. Dystrophin kann durch die Klonierung des Dystrophingens in einen Plasmidvektor und dessen Injektion in den Muskel eingebracht werden. Die intramuskuläre oder intravenöse Injektion des Vektors führte im mdx-Mausmodell zu einer Expression von Dystrophin in 10% der Muskelfasern<sup>29-31</sup>. Jedoch löste die Expression des Dystrophins eine Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen das neu gebildete Protein aus, da dies für den Körper ein Neoantigen darstellt<sup>31</sup>. In Frankreich wurde diese Methode in einer ersten klinischen Studie eingesetzt, in der neun Patienten mit DMD und BMD intramuskulär Dystrophin cDNA erhielten. Nach drei Wochen wurde die Qualität und die Toleranz des Gentransfers untersucht. Während der Vektor bei allen Patienten nachgewiesen werden konnte, wurde Dystrophin lediglich bei sechs der neun Patienten direkt an der Injektionsstelle schwach exprimiert. Die Ergebnisse dieser Behandlung war durch die schlechte Verteilung des Vektors im Muskel mit einem Abstand von nur wenigen Zentimetern von der Injektionsstelle limitiert<sup>32</sup>. Um die Atem- oder Herzmuskulatur zu behandeln, wären mehrfache, zielnahe Injektionen notwendig. Da Plasmid-DNA nicht dauerhaft in den Zellen verbleibt, wäre zudem eine Wiederholte Behandlung nötig<sup>33</sup>.

Um die Probleme einer Therapie mit Plasmid DNA zu überwinden, wurden zahlreiche Studien unter Verwendung von viralen Vektorsystemen an Tiermodellen durchgeführt<sup>34-36</sup>. Der Vorteil eines Virus-vermittelten Gentransfers ist die effektive Transfektion der Zellen. Bei einer Integration des Vektors in die chromosomale DNA, kann mit einer einzelnen Behandlung eine dauerhafte Korrektur des Defektes erreicht werden. Der Virus-vermittelte Gentransfer birgt jedoch auch Nachteile, wie zum Beispiel eine

Immunantwort auf virale Proteine und eine mögliche integrationsbedingte Onkogenese beim Einsatz von Retroviren, welche in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

#### **2.4.1.1.1 Adenovirale Vektoren**

In der Therapie für DMD werden Adenoviren (AV) vor allem wegen ihrer großen Kapazität häufig eingesetzt. Die erste Generation von Vektoren verfügte nur über eine Kapazität von 8kb und erlaubt nur eine gekürzte DNA des Dystrophin zu vermitteln. Diese oft auch als Mini- oder Mikro-Dystrophin bezeichneten Gene besitzen Deletionen in der mittleren Stabregion des Dystrophins und sind von *in frame* Deletionen bei Patienten mit Muskeldystrophie vom Typ Becker abgeleitet. In immunkompetenten Mäusen führte die Expression dieses Dystrophins zu einem verbesserten Schutz gegenüber mechanischem Stress. Es zeigte sich jedoch eine Immunantwort gegen virale Proteine, die dazu führte, dass Dys+ Muskelfasern 60 Tage nach Infektion deutlich reduziert waren<sup>34</sup>.

Die Weiterentwicklung adenoviraler Vektorsysteme führte zu Vektoren, denen die Gene aller viralen Proteine entfernt wurden. Bei diesen *fully truncated* Viren sind lediglich die beiden ITR-Regionen und das Verpackungssignal enthalten. Dafür müssen alle anderen Proteine von Helferplasmiden in einer Produktionszelllinie zur Verfügung gestellt werden. Die Kapazität für das zu exprimierende Transgen wurde so auf bis zu 36kb erhöht und die Immunantwort aufgrund des Fehlens dieser Proteine reduziert. Diese Vektoren sind in der Lage, die Sequenz für die bereits gespleißte Dystrophin mRNA in voller Länge zu tragen, was zu einem vollständigen Dystrophin ohne verkürzte Stabregion führt. Im Mausmodell konnte nach Infektion mit *fully truncated* Adenoviren, welche ein Mini-Dystrophingen trugen, Dystrophin in 30% der Muskelfasern nachgewiesen werden. Sowohl in jungen als auch in adulten Mäusen konnte so eine Verbesserung der Muskelfunktion erreicht werden<sup>28</sup>. Die Gruppe um Dudley zeigte, dass ein Jahr nach der Infektion mit einem *fully truncated* Adenovirus, welcher zwei Kopien des murinen Vollängen-Dystrophin exprimierte, Dystrophin in 52% der Fasern des behandelten Muskels nachweisbar war. Damit war eine signifikant größere Muskelkraft und eine erhöhte Resistenz gegen mechanischen Stress assoziiert<sup>36</sup>.

#### **2.4.1.1.2 Adeno-assoziierte Vektoren**

Der Vorteil Adeno-assoziiierter Viren (AAV) ist, dass die Wahrscheinlichkeit einer integrationsbedingten Onkogenese geringer ist, da die Integration nicht randomisiert erfolgt sondern gerichtet im Locus 19q13. Zudem sind AAV nicht von sich aus replikationsfähig. Der Serumtyp 2 zeigt einen natürlichen Tropismus für den Heparansulfat-Proteoglykanrezeptor, welcher von regenerierenden Muskelzellen exprimiert wird<sup>37</sup>. In einer klinischen Studie, in der AAV zur Therapie gegen Hämophilie B verwendet wurden, konnte keine Immunreaktion gegen das Virus nachgewiesen werden<sup>38</sup>. Nachteilig ist neben der aufwendigen Herstellung die geringe Kapazität des Vektors. Selbst bei einem vollständigen Entfernen

der viralen Gene darf das therapeutische Gen mit Promotor nicht grösser als 5kb sein. Die Gruppe um Liu zeigte, dass drei Monate nach dem Transfer von Mikrodystrophin mit Adeno-assoziierten Viren des Serumtyps 2 50% - 60% der Muskelzellen von jungen Mäusen und 30% bei adulten Mäusen Dystrophin positiv waren. Zudem waren behandelte junge Mäuse widerstandsfähiger gegen muskuläre Verletzungen nach physischer Belastung<sup>39</sup>. Eine systemische Injektion eines AAV des Serotyps 6 in die Schwanzvene der mdx-Maus führte zu einer Dystrophinexpression in weiten Teilen der quergestreiften Muskulatur und zu einem effektiveren Gentransfer in Vergleich zu den AAV des Serumtyps 2. Dabei half die Verwendung von endothelialen Wachstums- und Permeabilitätsfaktoren die Verteilung des Vektors in den Muskeln zu verbessern<sup>40</sup>.

#### **2.4.1.1.3 Lentivirale Vektoren**

Lentiviren gehören zur Klasse der Retroviren und bieten im Gegensatz zu AV und AAV den Vorteil durch spezielle Proteine in ihrer Matrix auch ruhende Zellen zu infizieren<sup>41</sup>. Verschiedene Rezeptoren in der Virushülle entscheiden darüber, welche Zellen infiziert werden. So besitzt das bekannteste Lentivirus, das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), einen Liganden für den CD4 Rezeptor, mit dem es humane T-Zellen effektiv infizieren kann. Verschiedene Lentiviren besitzen spezielle Bindungsproteine, die Potential für eine gentherapeutische Anwendung besitzen<sup>42</sup>. Alle Retroviren besitzen die drei Gene *gag* (*group-specific-antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*), welche für die Virusproduktion essentiell sind. Das *gag*-Gen enthält die Information für die viralen Kernproteine, *pol* kodiert für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase, und *env* kodiert die Rezeptorbindungsproteine. *Env* ist somit für den Kontakt und die Fusion mit der Zelloberfläche der Wirtszelle nötig. Für den Einsatz als viraler Vektor können diese Gene ähnlich wie bei AV und AAV von Helferplasmiden in einer Produktionszelllinie zur Verfügung gestellt werden. Dies vergrößert die Kapazität des Vektors für das Transgen und verhindert die Replikation des Virus in den Zielzellen. Lediglich die Integrationssequenzen und das Packsignal müssen auf dem viralen Vektor vorhanden sein. Trotz des so erreichten Maßes an biologischer Sicherheit sind noch nicht alle Risiken, wie zum Beispiel eine Rekombination mit einem Wildtyp-HIV oder Mutationen durch die Integration der Virus-DNA, für den Einsatz von HIV-basierten Vektoren in klinischen Studien ausgeräumt<sup>43</sup>. Es wurden auch nicht-humane lentivirale Vektoren, wie das *equine infectious anemia virus*, für eine gentherapeutische Anwendung weiterentwickelt. Diese zeigen eine ähnlich hohe Transduktionsrate wie HIV, die Dauer der Transgenexpression scheint jedoch kürzer zu sein<sup>44</sup>. Versuche im Mausmodell zeigten, dass lentivirale Vektoren vom Typ HIV-1 nach intramuskulärer Injektion die Expression eines Minidystrophins von 6,8kb Länge vermitteln und diese auch nach sechs Monaten im Bereich der Injektionsstelle nachweisbar ist. In der Zellkultur konnten sowohl ausdifferenzierte murine Dys- Muskelzellen als auch murine Dys-Muskelvorläuferzellen infiziert werden. Die Expression von Dystrophin blieb dort ebenfalls 6 Monate

erhalten<sup>45</sup>. Die Arbeitsgruppe um Coutelle konnte zeigen, dass der Einsatz von viralen Vektoren mit einem  $\beta$ -Galaktosidase Gen nach Injektion in Föten zur Expression des Transgens in immun-kompetenten Mäusen führte. Die Expression konnte auch noch 15 Monate nach Geburt des Tieres ohne nennenswerte immunologische Reaktionen nachgewiesen werden<sup>46</sup>.

### 2.4.1.2 Korrektur des Dystrophingens

Eine andere Strategie ist es, die Expression des Dystrophingens wieder herzustellen. Dies bietet im Vergleich zum Gentransfer mehrere Vorteile. Zum einen sind die immunologischen Risiken durch das Transfersystem weitaus geringer, zum anderen bleibt die gewebespezifische Regulation des Genes intakt. Handelt es sich um eine Punktmutation, was bei ca. 30% der DMD zutrifft<sup>47</sup>, so kann es durch die Injektion von chimären (RNA-DNA) Oligonukleotiden, die zum Bereich der Punktmutation homolog sind, zur Ausbildung einer Quadruplexstruktur kommen. Die zelleigenen Reparaturmechanismen können so das mutierte Basenpaar korrigieren. Die Injektion solcher Oligonukleotide in Muskelgewebe der mdx-Maus führte zu einer Expression von Dystrophin nahe der Injektionsstelle. Die Expression blieb über zehn Wochen stabil und weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um das Volllängen-Dystrophin handelte<sup>48</sup>. Diese Therapiestrategie setzt eine intensive molekulare Diagnostik voraus, um die individuelle Mutation zu identifizieren und ein spezifisches chimäres Oligonukleotid herzustellen.

Ein weiterer Ansatz ist das sogenannte Exonskipping. Hierbei verursachen Antisense-Oligonukleotide (ASO) durch die Bindung an Spleißregulatorsequenzen beim Spleißen der prä-mRNA den Verlust des mutierten Exons, was zur Translation eines verkürzten Dystrophins führt. Voraussetzung ist die Einhaltung des Leserasters. Die Folge ist der Übergang einer Dystrophie des Typs Duchenne in eine Muskeldystrophie des Typ Becker, bei dem eine *in frame* Mutation vorliegt. Die Anwendung dieser Strategie ist jedoch nur bei Exons möglich, die für die mittlere Stabregion des Dystrophins codieren<sup>49</sup>. Die intramuskuläre Injektion von Oligonukleotiden, die zum *skipping* des Exons 23 in der mdx-Maus führten, stellte nach zwei bis vier Wochen in bis zu 20% der Muskelfasern den Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex mit einem verkürzten Dystrophin wieder her<sup>50</sup>. *In vitro* konnte an humanen Muskelzellen zweier DMD Patienten mit einer Mutation im Exon 45 gezeigt werden, dass es durch die Gabe von entsprechenden Antisense-Oligonukleotiden zu einer verkürzten mRNA kommt, bei der Exon 45 und 46 fehlen. Es konnte bereits 16 Stunden nach der Transfektion Dystrophin nachgewiesen werden, welches auch nach einer Woche in bis zu 75% der Muskelzellen vorlag. In weiteren Versuchen konnten auch andere Exons ohne Funktionsverlust aus der mRNA deletiert werden<sup>51</sup>. Eine Langzeitkorrektur der Dystrophinexpression mit Oligonukleotiden wurde nach intra venöser Injektion von viralen Vektoren in die mdx-Maus erreicht. Die Expression der Nukleotide führte zu einer Dystrophinexpression über mehr als drei Monate in 50%-80% der Muskelfasern. Dies führte zu einer korrekten Lokalisierung des DGC und zu einer erhöhten Widerstandskraft der Muskeln gegenüber mechanischer Belastung<sup>52</sup>. Obwohl die



Ergebnisse vielversprechend sind, wird diese Therapie nur auf einen Teil der DMD Fälle anwendbar sein, da nicht alle Exons ohne Funktionsverlust deletierbar sind und auch dann nur eine Verlaufsform vom Typ Becker zu erwarten ist.

### 2.4.1.3 Zell-basierte Therapie

Unter Zell-basierten Therapien versteht man den Transfer von Myoblasten oder Muskelvorläuferzellen durch Injektion in den dystrophen Muskel. Im Krankheitsverlauf verlieren die Muskeln zunehmend die Fähigkeit, sich nach Schädigung zu regenerieren. Die Regeneration geht von Satellitenzellen aus, die zunächst proliferieren und im Anschluss zu Myoblasten differenzieren. Mit zunehmenden Alter ist bei DMD-Patienten die Zahl an Satellitenzellen reduziert<sup>53</sup>. Das Ziel eines Myoblastentransfer ist zum einen die Verbesserung der regenerativen Kapazität und zum anderen das Einbringen von Dystrophin durch Dys+ Zellen, die mit den Dys- Zellen des Akzeptors fusionieren. Im Mausmodell führte die Fusion von Dys+ Donorzellen mit Muskelzellen der mdx-Maus zu Dystrophin haltigen Muskelfasern<sup>54</sup>.

In den durchgeführten klinischen Studien an DMD-Patienten konnten jedoch die Ergebnisse der Tiermodelle nicht erreicht werden. Nach mehreren Injektionen allogener Dys+ Myoblasten eines *major histocompatibility complex* (MHC) identischen Spenders in den Muskel des Patienten, kam es aufgrund einer Immunreaktion gegen Zellen und Dystrophin nach kurzer Zeit zum Verlust der Spenderzellen. Die Verteilung der injizierten Myoblasten im Muskel stellte sich problematisch dar, und Dys+ Zellen konnten lediglich direkt am Injektionsort nachgewiesen werden<sup>55,56</sup>. Law et al. konnten jedoch nach Transplantation allogener Dys+ Zellen Dystrophin in 5% - 10% der Muskelfasern nachweisen<sup>57,58</sup>. Die Arbeit ist jedoch kritisch zu bewerten, da der Nachweis lediglich auf Immunfärbung von Schnitten beruht und hier nicht zwischen dem Vollängen-Dystrophin und den verkürzten Formen, wie sie auch in dystrophen Muskeln produziert werden, unterschieden wurde.

Eine neuere Strategie, Immunreaktionen zu reduzieren bietet die Verwendung autologer Zellen. Um autologie Myoblasten für eine zellbasierte Therapie zu erhalten, müsste den Patienten zu einem Zeitpunkt Muskelgewebe entnommen werden in der der Anteil an Muskelvorläuferzellen noch nicht erschöpft ist. Eine andere Quelle stellen Stammzellen dar. Ihre Eigenschaft, in verschiedene Zellarten zu differenzieren, prädisponiert sie für den Einsatz in der Myoblasten Transfer Therapie. Versuche mit Muskelvorläuferzellen von Mäusen haben gezeigt, dass nach Injektion von Zellen über die Schwanzvene, die einen Mikrodystrophin exprimierenden Vektor trugen, die Zellen in der Lage sind Muskelgewebe zu erreichen und zu Myoblasten zu differenzieren. Die Expression des Dystrophin betrug jedoch nur 0,1% der Muskelfasern<sup>59</sup>. Sampaolesi et al. zeigten, dass sie sogenannten Mesoangioblasten aus Blut fötaler Dys+ Mäuse isolieren können, die pluripotente Eigenschaften besitzen. Versuche im Mausmodell für eine Sarkoglycanopathie zeigten, dass die Injektion von

Mesoangioblasten in die Arterie des Hinterbeins zur Ausbildung des Sarkoglycankomplexes in allen Muskeln des Beines führt. Die Muskelkraft normalisierte sich über einen Zeitraum von drei Monaten. Es wurde bei dieser Therapie keine Immunreaktion festgestellt.<sup>60</sup> Versuche mit der mdx-Maus konnten eine unterstützende Muskelregeneration durch das Gefäßsystem nicht bestätigen<sup>53</sup>.

Sowohl die Gewinnung autologer Zellen in ausreichender Zahl als auch die Verteilung dieser in verschiedene Muskelgruppen des Körpers durch den Transfer von Muskelvorläuferzellen konnte bislang nicht erreicht werden.

#### 2.4.1.4 Pharmakologische Therapieansätze

Satelitenzellen im Dys- Muskel zeigen eine verminderte Proliferationskapazität, die mit dem Alter weiter abnimmt.<sup>53,61</sup> Ein therapeutischer Ansatz diesen Prozess zu stoppen wäre die Blockade von Myostatin. Myostatin ist ein Signalprotein, welches zur *transforming growth factor-β* (TGF-β) Familie gehört, und fungiert als Suppressor des Muskelwachstums. Tiere mit einer Myostatin-Genmutation haben eine signifikant größere Muskelmasse als gesunde Tiere<sup>62,63</sup>. Die Blockade von Myostatin in mdx-Mäusen führte nach drei Monaten zu einer Zunahme der Muskelmasse, einer Verbesserung der Funktion sowie einer signifikanten Reduktion der Keratinkinase-Werte im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, es kommt aber durch die Blockade zu einem erhöhten Utrophingehalt in den Muskelzellen<sup>64</sup>. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die Myostatin-Blockade eine Möglichkeit bietet, die Pathologie der DMD zu verlangsamen.

Der Krankheitsverlauf kann durch die Gabe von entzündungshemmenden Glykocortikoiden verlangsamt werden. Während Prednisolon starke Nebenwirkungen verursacht, ist das Derivat Deflazacort eine Alternative mit geringeren Nebenwirkungen. Im mdx-Mausmodell zeigte sich zudem eine gesteigerte Laminin-Genexpression sowie eine verbesserte Myoblastenfusion und Differenzierung durch Glykocortikoide<sup>65,66</sup>. Die Gabe von Deflazacort führt zu einer erhöhten Expression von Stickstoffoxid-Synthetasen (NOS) und somit zu einer erhöhten Regeneration in Muskelfasern von mdx-Mäusen<sup>67</sup>.

### 2.4.2 Downstream Therapie

#### 2.4.2.1 Kompensation durch Dystrophin Analogon

Da das Einbringen von Dystrophin immunologische Reaktionen auslöst und die bisherigen pharmakologischen Ansätze mit Nebenwirkungen assoziiert sind, wurde nach endogenen Proteinen gesucht, deren Überexpression einen therapeutischen Nutzen haben könnte. Im besten Fall kann so der Mangel an Dystrophin kompensiert werden. Die Überexpression von DP71 im Muskel von mdx-Mäusen, einer Dystrophin Isoform, konnte jedoch das Vollängen-Dystrophin nicht ersetzen<sup>68</sup>. Da diese

Isoform lediglich die C-terminale Domäne des Dystrophin besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass ein therapeutisch wirksames Protein größere Homologien besitzen muss. Ein Protein, welches Homologien zu beiden funktionellen Enden des Dystrophins aufweist und die vier Domänen des Dystrophins besitzt, ist Utrophin. Das Utrophin ist auf Chromosom 6 lokalisiert und ca. 900kb groß. Mit 395kD ist das Genprodukt nur geringfügig kleiner als Dystrophin<sup>3</sup>. Utrophin kann ebenfalls mit dem Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex interagieren und eine Verbindung der Aktinfilamente mit der extrazellulären Matrix herstellen<sup>69</sup>. Studien haben gezeigt, dass es bei Überexpression von Utrophin in mdx-Mäusen bzw. der Utrophinexpression in Utrophin<sup>-/-</sup> mdx-Mäusen zu einer signifikant verbesserten Muskelfunktion kommt<sup>70-72</sup>. Der Regulationsmechanismus von Utrophin ist nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden aber Substanzen identifiziert, die die Expression von Utrophin steigern, zum Beispiel die Aminosäure L-Arginin oder Heregulin, die über den ras-Map-Kinase Weg Transkriptionsfaktoren beeinflussen und im Modell der mdx-Maus zu einer Verbesserung des Phänotyps durch einen erhöhten Utrophingehalt führten<sup>73</sup>.

#### **2.4.2.2 Identifizierung neuer Kandidatengene für eine Downstream Therapie**

Um mehr über die molekularbiologischen Folgen des Dystrophinmangels in Muskelzellen zu erfahren und Ansatzpunkte für eine Therapie zu finden wird nach Genen gesucht, die in dystrophen Muskeln verändert exprimiert werden<sup>74</sup>. Mit Subtraktionsbanken oder DNA-Chips können die Expressionsmuster von gesunden Patienten mit denen von DMD Patienten verglichen werden. Da der Phänotyp der DMD variiert, wurden entweder Zellpools verschiedener Patienten<sup>75</sup> oder mehrere Biopsien einzelner Patienten untersucht<sup>74</sup>. Der Vergleich von Expressionsdaten zwischen DMD Patienten mit verschiedenen Phänotypen kann ebenfalls zur Identifizierung potentieller Kandidatengene für eine Therapie führen<sup>76</sup>. Noguchi et al. verglichen mittels cDNA Microarrays das Expressionsprofil in Biopsien von sechs DMD-Patienten mit dem aus gesundem Muskel. Dabei zeigte sich eine veränderte Expression von Genen für die Immunantwort, für Gene die mit der extrazellulären Matrix in Verbindung stehen und für Gene des Zellwachstums<sup>75</sup>. Erhöht exprimierte Faktoren der Immunantwort, z.B. der Gene der Human Leukocyte Antigen Klassen I und III des MHC-Komplexes, sind an Entzündungsreaktionen beteiligt, die bei DMD im Muskel nach verstärkter Kontraktion ablaufen. Eine erhöhte Expression der Proteine des Sarkomers und der extrazellulären Matrix wie z.B. *myosin light chain 4* und *Collagen Typ IIIa1* weist auf die Kompensation des fehlenden Dystrophin-Protein-Komplex hin. Gene für die Transkription und Proteinsynthese waren hingegen herunter reguliert<sup>77</sup>. Speer et al. untersuchten Expressionsmuster von Genen, welche in Dystrophin-defizienten Muskeln, das Zellwachstum und die Proliferation beeinflussen, und fand bei fünf DMD-Patienten ein erhöhtes Niveau der p21 Expression im Vergleich zu Kontrollgewebe.

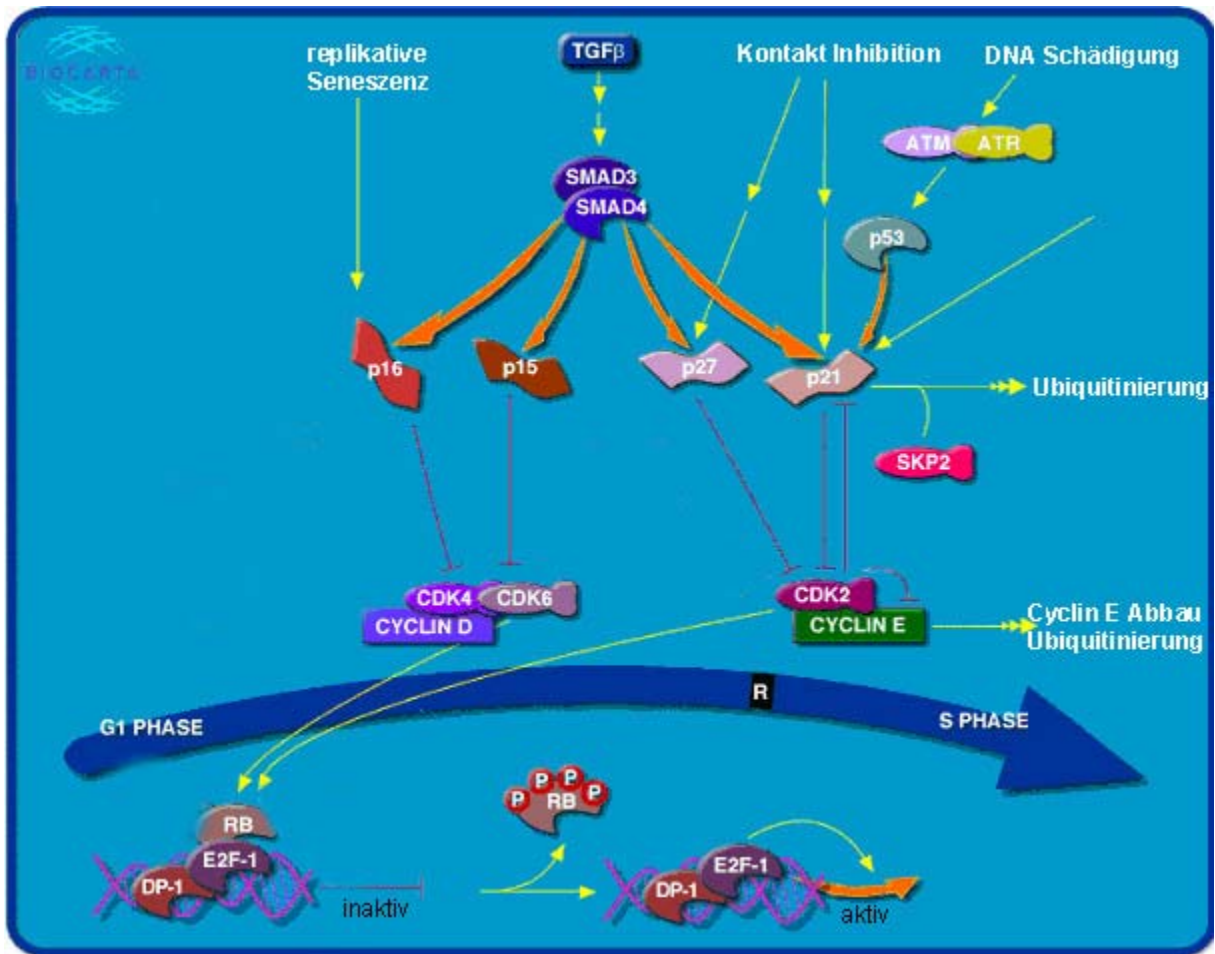
P21 ist ein Kinase-Inhibitor mit entscheidender Funktion in der Kontrolle des Zellzyklus. Ein hohes p21 Niveau hindert die Zelle am Übergang von der G1 zur S-Phase und damit an der Zellteilung<sup>78</sup>. Dies ist

bei differenzierten Myoblasten der Fall. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Untersuchungen an murinen Dys- Myoblasten, deren p21 Expression vierfach höher als in Dys+ Kontrollzellen war. Die Ursache könnte zum einen ein reduzierter Anteil proliferierender Zellen oder eine generell erhöhte Expression von p21 im Muskelgewebe sein<sup>79</sup>. Um den Einfluss von p21 und einem weiteren cyclin-abhängigem Kinase-Inhibitor (p57) genauer zu charakterisieren, wurde mittels Antisense-Oligonukleotiden (ASO) *in vitro* die Wirkung einer p21/p57 Inhibierung auf Myoblasten überprüft. Nach transienter Transfektion von ASO gegen p21 oder p57 wurde die Proliferation um bis zu 35% gegenüber einer Transfektion mit *scrambled* ASO sowohl für die Inhibierung von p21 als auch von p57 in Dys+ Myoblasten gesteigert<sup>80</sup>. Die Inhibition von p21 zeigte dabei einen grösseren Effekt als die Inhibition von p57. Die Zellproliferation der behandelten Zellen war jedoch geringer als die der unbehandelten Kontrollen. In weiteren Experimenten wurden Dys- Zellen mit p21 ASO transfiziert. Es konnte eine Proliferationsteigerung in vier von fünf Spendermyoblasten um 8%-36% gegenüber *scrambled* ASO und 7%-18% gegenüber unbehandelten Kontrollen erreicht werden. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Inhibition von p21 die Zellproliferation steigert.

#### 2.4.2.2.1 Funktion von p21

P21 ist ein Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor. Die Cyclin-abhängigen Kinasen steuern über die Phosphorylierung verschiedener Proteinen den Zellzyklus und werden von den Cyclinen reguliert.

Während der G1-Phase aktivieren wachstumsfördernde Substanzen eine erhöhte Transkription von Cyclinen des Typs D und E<sup>81</sup>. Diese aktivieren Cyclin-abhängige Kinasen (CdK) des Typs 2, 4 und 6, deren Gehalt über den Phosphorylierungszustand der Retinoblastom-Proteine (RB-Proteine) entscheidet<sup>82</sup>. Unphosphoryliert binden RB-Proteine reversibel den Transkriptionsfaktor E2F. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die Progression in die S-Phase entscheidend. Kommt es nun zu einem Anstieg der CdK's, werden die RB-Proteine phosphoryliert, der Transkriptionsfaktor E2F wird freigesetzt und kann mit dem Dimerisierungspartner 1 (DP1) assoziieren. Der so entstandene Komplex aktiviert Promotoren, deren Gene die Progression in die S-Phase auslösen<sup>83</sup> (Abb. 3).



**Abbildung 3: Regulation des Kontrollpunktes von der G1-Phase zur S-Phase in humanen Zellen.** Inhibitionen wie zum Beispiel von CDK2 durch p21 sind durch rote Verbindungslinien dargestellt. Gelbe Pfeile stellen eine Aktivierung dar, orange Pfeile markieren eine Steigerung der Expression. Kontaktinhibition als auch *Transforming Growth Factor-β* - (TGF-β) über SMAD3 können die Expression von p21 erhöhen<sup>84</sup>. Kommt es zu Schäden an der DNA, werden die DNA-Phosphokinase ATM *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *ATM and RAD3 related* (ATR) aktiv, die p53 phosphorylieren, welches die Expression von p21 hochreguliert. Weiterhin wird p21 durch einen „Skp1, Cullin, F-box-Protein (SCF) Komplex“ reguliert, indem das S-Phase Kinase assoziierte Protein 2 (SKP-2) das p21 Protein in der S-Phase degradiert. P21 besitzt in murinem embryonalen Fibroblasten eine Halbwertszeit von ca. 60 Minuten<sup>85</sup> (geändert nach [www.biocarta.com](http://www.biocarta.com)).

Aufgrund seiner Funktion und der Befunde bei Dys- Patienten sowie den bereits erzielten Ergebnissen der Arbeitsgruppe Speer kann eine dauerhafte und regulierbare Inhibition von p21 zur Steigerung der reduzierten Proliferation von Dys- Myoblasten einen therapeutischen Ansatz ergeben.

## 2.5 RNA-Interferenz

### 2.5.1 Wirkungsmechanismus

Die RNA Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus, der zur posttranskriptionalen Inhibition der Genexpression durch doppelsträngige (ds) RNA führt. Er ist hoch konserviert und lässt sich bei einem

breiten Spektrum an Organismen finden. Der Mechanismus wurde zunächst in Pflanzen und Pilzen beobachtet, bei denen das Einbringen einer zusätzlichen Kopie eines Genes entgegen der Erwartung sowohl zur Unterdrückung der Transgen- als auch der endogenen Expression führte. Dieses Phänomen wurde Co-Suppression bei Pflanzen bzw. *quelling* bei Pilzen genannt<sup>86,87</sup>.

1998 wiesen Untersuchungen am Fadenwurm doppelsträngige RNA als Ursache der unterdrückten Genexpression nach. Diese war weitaus effektiver als die Verwendung einer der Stränge der RNA alleine und konnte bei *C. elegans* noch in der Folgegeneration beobachtet werden<sup>88</sup>. Untersuchungen an RNAi unfähigen Mutanten und Zelllysaten halfen bei der Aufklärung des genauen Mechanismus der RNA Interferenz<sup>89</sup>. Der Effektor ist hierbei eine 21bp bis 23bp lange dsRNA mit einem 2bp Überhang am 3'Ende, die als *short interfering RNA* (siRNA) bezeichnet wird. Diese entsteht bei der Prozessierung langer dsRNA durch eine ATP-abhängige Ribonuklease namens Dicer<sup>90</sup>. Der Antisense-Strang wird von einem Proteinkomplex gebunden, welcher als *RNA induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Der Proteinkomplex bindet seinerseits an die mRNA, die komplementär zum Antisense-Strang im RISC ist. Die zum Komplex gehörende Nuklease schneidet die gebundene mRNA zehn Nukleotide vom 5'Ende<sup>91</sup>. Die Translation des betreffenden Proteins ist somit unterbunden (Abb. 4). Bei Pflanzen wurde zudem ein Amplifikationsmechanismus gefunden, bei dem der Antisense-Strang als Vorlage für neue dsRNA dient, welche dann zu siRNA's prozessiert wird. Dazu ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase nötig, die in Wirbeltieren jedoch noch nicht gefunden wurde<sup>87</sup>.

Die biologische Funktion der RNAi ist noch nicht vollständig geklärt. Es zeigte sich, dass RNAi bei Pflanzen eine Rolle bei der Resistenz gegen virale Infektionen spielt<sup>92</sup>. Auch die Genexpression scheint durch die RNAi kontrolliert zu werden. In Pflanzen und Hefen konnte gezeigt werden, dass dies über die Veränderung von Chromatin erfolgt<sup>93</sup>. Dabei dient die siRNA als Zielerkennung für die Bindung eines Komplexes an einen bestimmten DNA-Abschnitt und verhindert die Aufwindung der DNA<sup>94</sup>. In Versuchen mit *C.elegans* zeigten Würmer mit einem defekten RNAi-Mechanismus eine erhöhte Transposon-Aktivität. Somit trägt die RNAi zur genomischen Stabilität bei<sup>95</sup>.

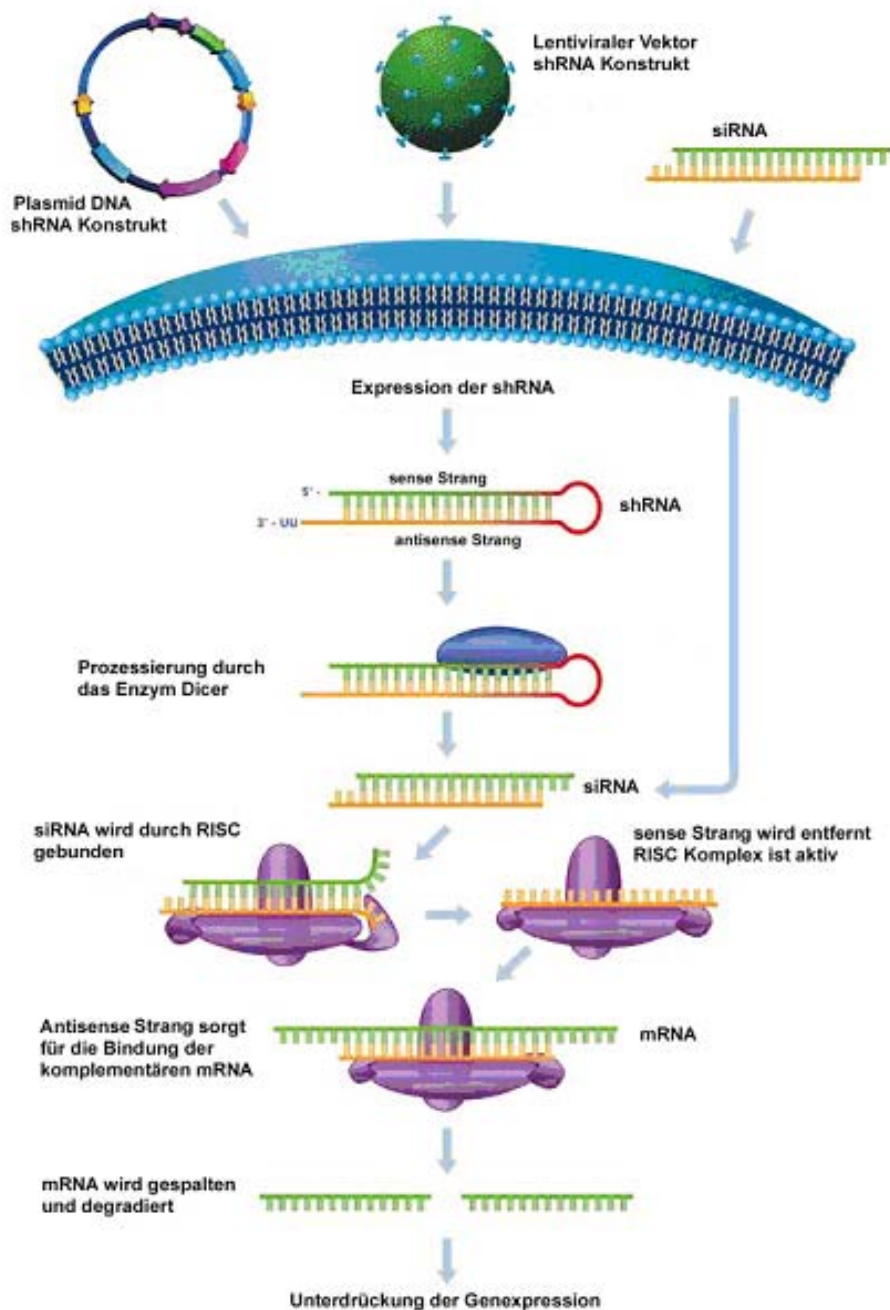


Abbildung 4: Mechanismus der RNA-Interferenz (geändert nach [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com))

## 2.5.2 RNA-Interferenz in Eukaryonten

### 2.5.2.1 Voraussetzungen

In Säugetierzellen war der Einsatz von RNAi zunächst nicht erfolgreich, da es nach Gabe von dsRNA zu einer Interferonantwort kam, die zu einer generellen Unterdrückung der Proteinexpression und zum

Zelltod führte<sup>96</sup>. Versuche von Elbashir et al. zeigten jedoch, dass diese Immunreaktion umgangen werden kann, wenn dsRNA verwendet wird, die kleiner als 30bp ist<sup>97</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten, dass nicht jede siRNA, die vollständig komplementär zum Zielgen ist, die Expression gleichermaßen inhibiert. Es wurden Kriterien für die Wahl effektiver siRNA Sequenzen aufgestellt. Danach sollte der G/C Anteil zwischen 45%-55% liegen, die Sequenz mit zwei Adenosinen beginnen und 19bp lang sein. Sie sollte zwischen 50bp *downstream* vom Start-Codon und 50-100bp *upstream* des Termination-Codons liegen. Mehr als drei Guanin oder Cytosin in Folge sollten vermieden werden, da dies zu Agglomeratbildung führen kann. Ein Vergleich mit den Gensequenzen des Zielorganismus stellt sicher, dass die siRNA keine anderen Gene beeinflusst. Dabei sollten Homologien von mehr als 17bp vermieden werden<sup>91</sup>.

Die Möglichkeit, effektive siRNA *in vitro* zu transkribieren und chemisch zu synthetisieren, führte schnell zu einer weiten Verbreitung dieser Technik und zu einer Vielzahl von Studien zur funktionellen Genomanalyse<sup>98,99</sup>. Des Weiteren gibt es RNAi-basierte Ansätze bei Therapiestrategien gegen virale Infektionen und Tumorerkrankungen<sup>100,101</sup>.

### 2.5.3 Transiente Expression

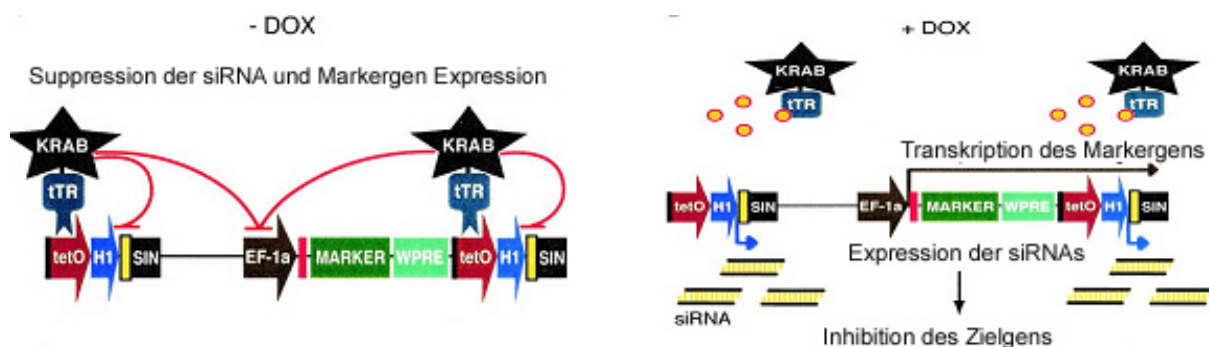
Die RNAi zeichnet sich gegenüber der Verwendung von ASO und Ribosomen durch eine höhere intrazelluläre Stabilität aus<sup>102</sup>. Bei einer transienten Transfektion von siRNA ist diese je nach Zellteilungsrate für drei bis sieben Tage aktiv<sup>103</sup>. Es wurden Methoden entwickelt, die Aktivität von siRNA durch chemische Modifikationen zu verlängern, ohne Spezifität und Wirkung einzuschränken. Hierbei wurden die 2'Positionen des Zuckers in der siRNA verändert<sup>104</sup>. Die Modifikation mit 2'-fluoro (2'-F) Pyrimidinen schützte dabei vor Abbau durch Nukleasen<sup>105</sup>. Zur Transfektion von siRNA werden häufig, kationische Lipide eingesetzt, die von vielen Firmen als optimierte Präparate für siRNA angeboten werden und in Zelllinien gute Transferraten erreichen<sup>106</sup>. Für primäre und nicht-proliferierende Zellen zeigte sich, dass siRNA durch Elektroporation effizient in die Zellen transportiert wird<sup>107</sup>. Für bestimmte therapeutische Strategien ist die Wirkungsdauer der siRNA jedoch zu kurz. Es müssten regelmäßige Transfektionen der siRNA erfolgen, um die Expression des gewünschten Proteins auf Dauer zu inhibieren. Die Entwicklung von Expressionskonstrukten für siRNA in Zellen löst dieses Problem und ist eine Alternative gegenüber dem *knockout* mittels homologer Rekombination<sup>108,109</sup>. Die Expression wird hierbei von einem Polymerase III Promotor gesteuert. Für die Anwendung in humanen Zellen wird ein H1 Promotor verwendet, der auch in murinen Zellen funktionell aktiv ist. In der Regel wird in Mauszellen ein U6 Promotor verwendet. Entweder werden Sense- und Antisense-Strang von je einem Promotor exprimiert, wobei sich die beiden Stränge im Anschluss zur siRNA zusammenlagern, oder Sense- und Antisense-Strang werden durch einen Loop miteinander verbunden. Die Länge der Loopsequenz liegt in der Regel zwischen 3 und 9 Basen<sup>110,111</sup>. Nach der Expression lagern sich die



komplementären Stränge zusammen und das Enzym Dicer spaltet die Loopsequenz ab, was zur siRNA führt. Die Sequenz aus Sense siRNA, Antisense siRNA und Loop wird auch als *short hairpin RNA* (shRNA) bezeichnet. Eine Terminationssequenz von fünf Thymidinen stoppt die Expression direkt hinter der shRNA Sequenz<sup>110</sup>. Mittels PCR hergestellte Expressionskassetten aus Promotor und shRNA-Sequenz lösen eine siRNA induzierte Inhibition der Genexpression *in vitro* und *in vivo* aus<sup>112</sup>. Diese eignen sich besonders für die Testung wirksamer siRNAs für das Zielgen und können nach der Identifikation in Vektoren kloniert werden, da sie schneller durch die Zelle abgebaut werden und im Gegensatz zu Vektoren keine Markergene besitzen.

## 2.5.4 Stabile Expression

Die Verwendung von Expressionskassetten bestehend aus shRNA und Polymerase III Promotor in viralen Vektoren eröffnete die Möglichkeit, auch ruhende Zellen effizient zu transfizieren. Lentiviren können die Expressionskassetten stabil in das Genom der Zielzelle integrieren<sup>113</sup>. Um die Funktion von Proteinen zu studieren, deren *knockout* während der embryonalen Entwicklung letal ist, oder deren permanente Inhibition ungewollte Konsequenzen hätte, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Trono ein induzierbares lentivirales System zur siRNA Expression entwickelt. Dabei wurde die Tetrazyklin-Operatorsequenz vor den Polymerase III Promotor eingefügt, wodurch die Expression durch die Gabe von Tetrazyklin oder Doxyzyklin unter Anwesenheit des Repressors regulierbar ist<sup>113</sup> (Abb.5). Das ursprüngliche Repressorprotein aus *E.coli* Tn10 wurde zudem mit der KRAB Domäne des humanen Kox1 fusioniert. Somit wird die Transkription von Polymerase II und III Promotoren effektiv bis zu 3kb *upstream* und *downstream* von der Operatorsequenz unabhängig von der Orientierung des Promotors inhibiert.



**Abbildung 5 : Mechanismus der Tetrazyklin Regulation der RNA-Interferenz.** Ist der Repressor (tTR) am Tet-Operator (tetO) gebunden, wird die Expression unterdrückt. Durch die Gabe von Doxyzyklin (DOX) ist der Repressor nicht mehr am Operator gebunden und sowohl die Expression der siRNA durch den H1-Promotor (H1) als auch die Expression des Markergens durch den EF-1a Promotor wird nicht mehr inhibiert. SIN : *Self inactivated LTR*, WPRE : *Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element*. (geändert nach [www.tronolab.com](http://www.tronolab.com))

### 2.5.5 Anwendung von siRNA in der Gentherapie

Die ersten Versuche mit siRNA *in vivo* erfolgten durch die hydrodynamische Injektion von nackter siRNA oder shRNA codierender cDNA in die Schwanzvene von transgenen Mäusen und führten zu einer Reduktion des Transgens Luciferase in der Leber<sup>114</sup>. Nachfolgende Studien zeigten, dass auch Niere, Lunge oder Milz adulter oder neugeborener Mäuse mit siRNA oder shRNA codierender cDNA transfiziert werden können<sup>114-116</sup>. Die Dauer der durch siRNA induzierten Proteinreduktion konnte mit chemisch modifizierter cDNA noch nach 20 Wochen *in vivo* detektiert werden<sup>117</sup>. Die hydrodynamische Injektion ist jedoch für den Menschen keine Option. Deshalb wurden lenti- und adenovirale Vektorsysteme für die RNAi *in vitro* und in Mäusen getestet. Diese können Zellen effektiv infizieren, bringen jedoch Risiken für eine Immunantwort oder Integrationsmutagenese mit sich<sup>118,119</sup>.

Die ersten auf siRNA basierenden klinischen Studien werden von den Firmen *Sirna* und *Acuity* in den USA vorbereitet. Beide Firmen entwickeln eine Therapie für „feuchte altersabhängige Makuladegeneration“. Dies ist eine Augenkrankheit, bei der die Reduktion von überschüssigem Gefäßwachstum durch Inhibierung des Gefäßwachstumsfaktors VEGF einen Heilerfolg bringen könnte. Dies wurde schon durch den Einsatz von Antisense Molekülen erzielt<sup>120</sup>. Da die Applikation der siRNA bei dieser Krankheit lokal durch die Injektion in den Glaskörper des Auges vorgenommen kann, umgeht sie die Probleme des „*Targeting*“. Es konnten bislang keine Nebenwirkungen gegen verschiedene Mengen an siRNA beobachtet werden<sup>121</sup>. Der von Cejka et al. verfasste Artikel gibt eine Übersicht über die laufenden und geplanten klinischen Studien mit siRNA<sup>121</sup>.

Erste Versuche eines zellspezifischen Einsatz von siRNA *in vivo* konnte durch die Verwendung von Liposomen und spezifischen Antikörpern erreicht werden. Ein Vektor für die siRNA Expression wurde hierbei mit Liposomen verkapselt, welcher Antikörper gegen spezifische Rezeptoren von Hirntumoren trugen. Wöchentliche intravenöse Injektionen in Mäuse mit intracranialen humanen Hirntumoren zeigten eine Reduktion der Zielgenexpression und eine verlängerte Lebensdauer<sup>122</sup>. Es ist auch möglich, siRNA direkt an Antikörper zu koppeln und somit siRNA Rezeptor-vermittelt zu transfizieren. Hierbei wurde siRNA gegen virale HIV Proteine oder *myc-c* an den C-Terminus der schweren Kette eines Antikörpers spezifisch für das HIV *envelope* Protein gebunden. Die intravenöse Injektion führte zur reduzierten Expression der viralen Proteine bzw. *myc-c* in *envelope* tragenden b16 Melanoma Zellen, während es in Zellen ohne Rezeptor nicht zu einer siRNA induzierten Inhibition der Genexpression in Melanoma- oder anderen Körperzellen kam<sup>123</sup>. Dies stellt eine effektive Strategie dar, systemisch und zellspezifisch siRNA in Zellen zu transportieren, setzt jedoch voraus, dass die Zellen einen spezifischen Rezeptor, wie in diesem Fall das *envelope* Protein, tragen.

## 2.6 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel die Inhibition von p21 mittels ASO durch RNA Interferenz zu ersetzen, da erwartet wird, dass die siRNA einen stärkeren und nachhaltigeren Effekt erzielt. In Vorbereitung auf *in vivo* Studien am mdx-Mausmodell wurden die Versuche sowohl an humanen als auch an murinen Myoblasten durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde wie folgt vorgegangen:

- Austestung verschiedener Transfektionsreagenzien für einen Transfer von siRNA in primäre Dys+ Myoblasten und murine C2C12 Zellen unter Verwendung von GapDH siRNA.
- Design verschiedener siRNAs gegen murines und humanes p21
- Vergleich der siRNAs hinsichtlich p21 Reduktion auf mRNA- und Protein-Ebene in Dys+ humanen Myoblasten und C2C12 Zellen
- Transfektion der effektivsten humanen siRNA in Dys- Myoblasten und Überprüfung der Wirkung auf die p21 Expression und auf die Zellproliferation.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die identifizierten siRNAs in einem lentiviralen Vektorsystem für einen stabilen *knockdown* verwendet.

- Konstruktion von lentiviralen Vektoren für die Expression humaner und muriner siRNA
- Untersuchung der p21 Expression nach Infektion humaner Dys+ und Dys- Myoblasten sowie muriner C2C12 Zellen.