

5 Diskussion

5.1 RNA-Interferenz

5.1.1 Etablierung des Transfektionssystems für siRNA in primären humanen Myoblasten

Voraussetzung für die Wirksamkeit einer siRNA ist das effiziente Einbringen in die Zelle. Dies sollte möglichst ohne einen Vitalitätsverlust erreicht werden.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit konnte ein System zur transienten Transfektion von siRNA in primäre Myoblasten erfolgreich etabliert werden, das eine schnelle Austestung der Wirkungseffizienz verschiedener siRNAs ermöglicht. Die Transfektionseffektivität wurde durch indirekte Messung der Wirksamkeit auf Protein- und mRNA-Ebene bestimmt. Eine andere Möglichkeit die effiziente Transfektion zu überprüfen, ist die Markierung der siRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen. Es ist jedoch bei der Messung von Fluoreszenz-gekoppelten Nukleotiden mittels FACS nicht zu unterscheiden, ob die Nukleotide an der Zelloberfläche adsorbieren oder ob sie in die Zelle bzw. in den Zellkern vorgedrungen und damit biologisch aktiv sind. Weiterhin sind markierte Nukleotide größer als unmarkierte und können sich so im Transfektionsverhalten unterscheiden. Es ist beobachtet worden, dass das Fluoreszenzsignal nicht immer mit dem tatsächlichen *Silencing*-Effekt korreliert¹²⁷. Aufgrund dieser Tatsache wurde auf eine direkte Messung der Effektivität verzichtet.

Unter Verwendung identischer Transfektionsbedingungen kam es zwischen Zellen verschiedener Patienten zu einer Varianz in dem Effekt der p21 siRNA. Dies lässt sich auf eine unterschiedliche Transfektionseffektivität zurückführen, da die verwendeten primären humanen Myoblasten eine unterschiedliche Basisproliferation aufwiesen und die Effektivität der Transfektion stark von der Proliferation der Zellen abhängt. Aufgrund der geringen Menge an Patientenzellen wurde die Transfektion von siRNA I lediglich an den Patientenzellen 15/01 wiederholt. Dort lag die Proteinreduktion 13% über der Proteinreduktion des ersten Versuches von 66%. Die Reduktion des p21 Proteingehaltes durch die Luciferase siRNA war mit 50% und 47% nahezu gleich.

5.1.2 Identifizierung von p21 siRNA und Einsatz in einem lentiviralen Vektorsystem

5.1.2.1 Transiente Transfektion

Die ausgewählten siRNAs sowohl gegen humanes als auch murines p21 waren in der Lage in den transienten Versuchen den p21 Proteingehalt zu reduzieren. In Dys- Myoblasten der drei Patienten (15/01, 25/01, 77/02) kam es zudem zu einer Steigerung der Zellproliferation durch Transfektion von

siRNA I um 20%-47%. Es zeigte sich somit, dass die p21 Inhibierung mittels RNAi der Inhibition durch ASO, welche in vorangegangenen Versuchen der Arbeitsgruppe getestet wurde, überlegen ist. Die Proliferationssteigerung lag dort zwischen 8%-18% und konnte somit verdoppelt werden¹²⁸. Die Wirksamkeit der humanen siRNA III konnte durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden. Dort kam es in hämatopoetischen Stammzellen nach Transfektion der siRNA III zu einer p21 Reduktion um 90% gegenüber unbehandelten Kontrollen¹²⁹. In murinen C2C12 Zellen konnte der Gehalt an p21 wiederholt durch siRNA A um 40-60% reduziert werden.

5.1.2.2 Stabile Expression

Die Infektion von Dys- Myoblasten 77/02 mit virushaltigem Überstand der Vektoren mit p21 shRNA1 führte zu keiner Proliferationssteigerung und Proteinreduktion. In den mit dem Vektor pLV-THM-p21-H3 infizierten Zellen konnte eine Proliferationssteigerung detektiert werden. Die Infektion mit Virus ohne shRNA führte weder zu einer Proteinreduktion noch zu einer Änderung in der Proliferation der Myoblasten in Vergleich zu uninfizierten Kontrollen. Es wurde angenommen, dass die Anzahl der integrierten Kopien für eine deutliche Reduktion im p21 Proteingehalt nicht ausreichend war. Obwohl die FACS Messung zeigte, dass nahezu alle Zellen das viruscodierende GFP exprimierten, muss davon ausgegangen werden, dass die Kopienanzahl pro Genom bei der Verwendung von virushaltigem Überstand niedrig ist. Die Berechnung der ursprünglichen Viruskonzentration ausgehend von der Titerbestimmung von aufkonzentriertem Virus ergab eine MOI von 2-4 bei Verwendung von virushaltigem Überstand. Das Vorhandensein einer einzelnen shRNA Expressionskassette im Genom kann zwar schon ausreichend sein, um die Expression des Zielgens zu inhibieren, jedoch ist dies von dem Expressionsniveau des Zielgens und *in vivo* auch vom jeweiligen Gewebe abhängig¹³⁰. Eine Steigerung der Viruskonzentration kann in Zellkultur zu einem verstärkten Effekt der siRNA auf mRNA Ebene führen¹³¹. Dies konnte durch die Versuche mit aufkonzentriertem Virus bestätigt werden.

Die Infektion von Dys- Zellen 77/02 mit Viruskonzentrat (MOI 40) des Vektors pLV-THM-p21-H1 führte im ersten Experiment zu einer Reduktion im p21 Protein unter die Nachweisgrenze und zu einem funktionalen Effekt, der sowohl unter Differenzierungs- als auch unter Wachstumsbedingungen detektierbar war. Bei der Infektion von Zellen 43/01 mit pLV-THM-p21-H1 unter identischen Bedingungen konnte kein Effekt auf p21detektiert werden. Unter Verwendung des siRNAIII exprimierenden Vektors konnte sowohl in den Zellen 43/01 als auch 77/02 eine Proteinreduktion und eine Proliferationssteigerung um bis zu 127% nachgewiesen werden. Eine Wiederholung mit einer niedrigeren MOI führte zu einer geringeren Proliferationssteigerung unter viral vermittelter Expression von siRNA III und zu einer verminderten Proteinreduktion.

Bei den Versuchen mit murinen C2C12 Zellen konnte zunächst keine Veränderung im Proteingehalt oder in der Proliferation nach Infektion mit dem siRNA A exprimierenden Vektor detektiert werden. Nach

Überprüfung der Vektorsequenz könnte die letzte Base des Antisense-Stranges von der Polymerase bereits als Terminationssequenz erkannt werden. Der Antisense-Strang wäre um eine Base verkürzt und die Effektivität reduziert⁹¹. Um dies zu kontrollieren wurde die shRNA Sequenz in anderer Orientierung einkloniert, was zu einer Proteinreduzierung von 30% führte und damit unter den Ergebnissen der transienten Transfektion lag. Eine Erklärung für die geringe Proteinreduktion ist die Beobachtung, dass 19bp lange shRNA Konstrukte in der Antisense-Sense Orientierung weniger effektiv in einem Vektor sind als mit der von Trono empfohlenen Orientierung Sense-Antisense¹²⁷. Somit konnte die siRNA A in transienten Versuchen den p21 Proteingehalt reduzieren; sie ist aufgrund der Sequenz jedoch ungeeignet, um mit dem verwendeten Vektorsystem exprimiert zu werden.

Die Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- Prinzipiell ermöglicht die virale Infektion mit p21 siRNA maximal eine Verdopplung der Proliferation von humanen Myoblasten. Jedoch muss festgestellt werden:
- Die Ergebnisse waren von Patient zu Patient unterschiedlich. (Beispiel: stabile Expression von siRNA III führte zu einem Proliferationsanstieg von 127% bei 43/01 und 40% bei 77/02)
- Die Infektion mit pLV-THM-p21-H1 in Myoblasten desselben Patienten führte zu unterschiedlichen Ergebnissen und konnte nur teilweise reproduziert werden. (Beispiel: 77/02 MOI 40 mit Proliferationsanstieg von 63% bzw. 35% und Proteinreduktion von 100% bzw. 3%)
- Die in transienten Versuchen als wirksam identifizierte murine p21 siRNA ist aufgrund ihrer Sequenz für die Expression in dem pLV-THM Vektorsystem ungeeignet.

5.1.3 Vergleich der si/shRNA Wirkung auf mRNA-, Protein- und funktioneller Ebene

Die Beobachtung, dass ein siRNA Effekt nicht stets auf allen untersuchten Ebenen nachzuweisen war, kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen liegt bei der Expression von mRNA und Protein eine unterschiedliche Kinetik vor. Das heißt, dass es erst zu einer Reduktion im Proteingehalt kommt, wenn die mRNA solange inhibiert wird bis vorhandenes Protein in den Zellen abgebaut wird. Ist die Reduktion der mRNA zu kurz bzw. die Halbwertszeit des Proteins zu lang, kann der Effekt lediglich auf mRNA Ebene detektiert werden. Dies sollte jedoch bei der Inhibition von p21 nicht der Fall sein, da die Halbwertszeit dieses Proteins nur wenige Stunden beträgt⁸⁵. Zum anderen wird die zunächst einfache kausale Kette einer mRNA Reduktion gefolgt von einer Proteinreduktion, resultierend in einer Änderung auf funktionaler Ebene, durch verschiedene Faktoren beeinflusst, so daß der Effekt nicht linear ist. Die Menge translaterter Proteine hängt neben der Menge von mRNA auch von deren Stabilität und der Regulation der Translation ab¹³². Es ist möglich, dass bei einer limitierenden Menge an siRNA nicht alle Transkripte abgebaut werden. Die Zelle versucht die fehlenden Transkripte durch eine effizientere

Translation zu kompensieren, was zu einem geringen Einfluss auf Proteinebene führen würde. Gleichzeitig könnte das Fehlen von p21 durch eine erhöhte Produktion anderer Proteine kompensiert werden, was zu einem verminderten funktionalen Effekt führte¹³³.

Die Tatsache, dass die Ergebnisse mit Zellen desselben Patienten und identischen Viruskonzentrationen unterschiedlich ausfallen, könnte am Integrationsort der viralen Konstrukte im Genom liegen. Es ist beschrieben, dass die Expression von integrierten viralen Konstrukten stark von der Chromatin-Struktur der DNA abhängt. Ist das Chromatin des DNA-Abschnitts stark gepackt, kann es bereits kurz nach der Integration zur Blockierung der Transkription kommen. Man spricht dabei von Positions-Variabilität¹³⁸. Gleichzeitig ist nicht auszuschließen, dass die Integration im ersten Versuch einen Einfluss auf die p21 Expression in einigen Zellen hatte und diese sich durch verstärkte Proliferation anreicherten. Genauere Untersuchungen des Integrationsortes sind in weiteren Versuchen geplant. Hierbei wird mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung die Kopienanzahl und der ungefähre Integrationsort bestimmt werden.

Die Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerung zu:

- Ein siRNA Effekt konnte nicht immer auf allen untersuchten Ebenen detektiert werden. (Beispiel: 43/01MOI 10 Proliferationsanstieg von 116%, mRNA Reduktion 59%, Proteinreduktion -1%)

5.1.4 Unspezifische Effekte von si/shRNA

Um einen Sequenz-spezifischen Effekt der siRNA auf die mRNA des Zielgens zu detektieren, empfiehlt es sich Kontrollen mitzuführen. Diese können aus siRNAs bestehen, die sich nur in wenigen Basen von der effektiven siRNA unterscheiden. Dies gibt eine hohe Sicherheit, dass der Effekt der vollständig komplementären siRNA Sequenz-spezifisch ist⁹¹. Jedoch haben Untersuchungen gezeigt, dass ein sogenannter *Missmatch* von nur wenigen Basen dennoch zu einem Effekt auf die mRNA Expression führen kann¹³⁴. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von *scrambled* siRNA bzw. siRNA, die keine Homologie im menschlichen Genom besitzt⁹⁷. Dies ermöglicht die Detektion von Sequenz-unspezifischen Effekten der siRNA. Gleichzeitig sollten mehrere siRNAs gegen dieselbe mRNA ausgetestet werden, um den Sequenz-spezifischen Effekt sicherzustellen. Der unspezifische Effekt der Interferonantwort durch doppelsträngige RNA kann ebenfalls durch siRNA ausgelöst werden¹⁰².

5.1.4.1 *Off-target* Effekte

Als Kontrolle des Sequenz-spezifischen Effektes der siRNAs wurde bei den Versuchen, wenn genügend Zellen verfügbar waren, eine Luciferase siRNA mitgeführt. Diese siRNA besitzt keine Homologien mit mehr als 14 bp zu bekannten humanen Sequenzen und war bereits veröffentlicht⁹¹. Bei der Austestung der Transfektionsbedingungen zeigte die Luciferase siRNA keinen Einfluss auf den GapDH Proteingehalt, es zeigte sich jedoch eine Steigerung der GapDH mRNA Expression. Es war zudem in weiteren Versuchen auch ein Effekt auf das p21 Protein und mRNA Niveau zu beobachten. Die Luciferase siRNA bewirkte eine Reduktion im p21 Proteingehalt, was ebenfalls zu einer Zunahme der Proliferation von Dys- Myoblasten führte. Eine zusätzlich mitgeführte *scrambled* siRNA zeigte einen geringen Einfluss auf den p21 Proteingehalt. Die Tatsache, dass es durch siRNA ohne Homologien im menschlichen Genom zu *off-target* Effekten kommen kann, wurde zunehmend in siRNA Studien beobachtet¹³⁵. Persengiev et al. untersuchten unspezifische Effekte von siRNA an einer humanen Krebszelllinie. Dabei verwendeten sie die gleiche Luciferase siRNA und es zeigte sich in Genexpressions-Arrays, dass die Expression von mehr als 1000 Genen durch die Transfektion von Luciferase siRNA verändert wird. Es wurde beobachtet, dass diese Effekte bereits ab einer Konzentration von 25nM auftraten und Sequenz-unspezifisch sind. Die Daten der Chip-Arrays zeigten keine Reduktion im p21 Niveau in humanen Krebszellen, jedoch konnte im vorliegenden Versuch mit dieser Luciferase siRNA auch keine p21 Reduktion in C2C12 Zellen detektiert werden¹³⁶. Demnach ist es möglich, dass die unspezifischen Effekte je nach Zelltyp und Organismus unterschiedlich ausfallen. Eine andere Studie zeigte, dass es durch die Transfektion von verschiedenen siRNAs gegen das Gen *MEN1* zu einer Änderung in der Expression und dem Proteingehalt von p21 und p53 kommt. Die gewählten siRNAs zeigten keine Homologien zu p21 bzw. p53, dennoch konnten erniedrigte wie auch erhöhte Expressionen durch realtime PCR detektiert werden. Die Autoren konnten keine Erhöhung in Genen, die an der Interferonantwort beteiligt sind, detektieren. Da der Effekt von *MEN1* siRNA auf die Expression von p53/p21 Sequenz spezifisch war, vermuten die Autoren einen Effekt auf Gene, die an Stoffwechselwegen von p21/p53 beteiligt sind¹³⁷. Auch in der hier vorliegenden Arbeit kann ein solcher Effekt der Luciferase siRNA nicht ausgeschlossen werden. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Effekt der beiden p21 siRNAs spezifisch ist, da er sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene detektierbar war. Sowohl siRNA I als auch siRNA III führten zu einer deutlichen p21 Reduktion, die auf Proteinebene über den Effekt der Luciferase siRNA/scrambled siRNA hinausging. Eine mögliche Ursache für den *off-target* Effekt der Luciferase siRNA könnte der kürzlich beschriebene Umstand sein, dass eine siRNA auch als miRNA funktionieren kann¹³⁸. Bei miRNA handelt es sich um einzelsträngige 22bp lange RNA, die von dem Enzym Drosha, welches die gleiche Funktion wie Dicer besitzt, aus ca. 70bp langer prä-miRNA mit „Hairpin-Struktur“ prozessiert wird¹³⁹. Diese bindet mit einer unvollständigen Basenpaarung an komplementäre mRNA, wodurch die Stabilität der mRNA im Gegensatz zu siRNA nicht beeinflusst, die Translation jedoch effektiv unterbunden wird¹³⁵. Es wurde

gezeigt, dass es bei siRNA nur zu einer Spaltung der komplementären mRNA kommt, wenn bei der Bindung der siRNA in der mittleren Region keine Fehlpaarungen der Basen vorliegen⁹¹. Besitzt die siRNA dort keine Homologie, kann die Translation trotzdem inhibiert werden. Diese ist nicht so stark wie der Effekt einer komplementären siRNA, kann aber verstärkt werden, wenn die miRNA mehrere Bindungsstellen auf derselben mRNA aufweist¹³⁸. Die im menschlichen Organismus identifizierten miRNAs, wie z.B. *lin-4* und *let-7*, besitzen ebenfalls mehrere potentielle Bindungsstellen in den betreffenden Genen¹⁴⁰. Ein Sequenzvergleich der Luciferase siRNA mit der p21 Gensequenz zeigte eine Übereinstimmung von maximal 11 nicht hintereinander liegenden Basen. Es konnte gezeigt werden, dass in Einzelfällen eine Homologie von 11 aufeinander folgenden Basen ausreicht um eine Inhibition zu erzielen. Jedoch blieb die Expression von Genen mit größerer Homologie unverändert¹³⁴. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sogenannte *off-target* Effekte nicht vorherzusagen sind und die zunächst postulierte hohe Spezifität⁹¹ der siRNA auf die Expression eines Genes relativiert werden muss. Vielmehr ist anzunehmen, dass durch die Kontrolle von lediglich ein oder zwei Referenzgenen unspezifische Effekte in vielen Studien unentdeckt bleiben. Es zeigte sich zudem, dass diese Effekte nicht unbedingt von der Sequenz oder der Konzentration der siRNA abhängig sind¹³⁶. Sie treten sowohl durch siRNA als auch beim Einsatz von shRNA auf und können einen selektiven Effekt in Zellkultur bewirken. Die kontinuierliche Verbesserung und die Entwicklung spezieller Software zur Vorhersage möglicher *off-target* Effekte (<http://dscheck.mai.jp/>), wie sie für einige Organismen bereits entwickelt sind, zusammen mit einer verstärkten Analyse der Expressionsprofile nach siRNA Transfektion wird dazu beitragen, die Spezifität einer Anwendung auch im Hinblick auf Therapiestrategien weiter zu verbessern.

5.1.4.2 siRNA bedingte Interferonantwort

Ein weiterer möglicher unspezifischer Effekt ist die Interferonantwort. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass entgegen erster Erkenntnisse, nach der nur dsRNA mit einer Größe von mehr als 30bp eine Interferonantwort auslösen kann⁸⁹, auch 21bp lange siRNA unspezifisch Gene wie z.B. Oligoadenylate Synthetase 1 (OAS1) aktiviert, welche an der Interferonantwort beteiligt sind^{141,142}. Ebenso wurden in Versuchen mit shRNA Expressionskassetten Hinweise auf eine Interferonantwort gefunden. Die Expression von 19 bp langer dsRNA *Hairpin*-Strukturen, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurde, löste aber im Vergleich zu *Hairpin*-Strukturen mit längerer siRNA eine geringe Interferonantwort aus¹³¹.

Neben der Interferonantwort sind auch zytotoxische Effekte von „Hairpin-Strukturen“ beschrieben. Diese sind nicht Sequenz-spezifisch, da sie sich durch eine Wiederherstellung der Genexpression mittels eines zweiten Vektors nicht reduzieren ließen und auch von *scrambled* siRNA verursacht wurden. Dieselbe Veröffentlichung zeigte weiterhin, dass die lentiviral vermittelte siRNA Reduktion mit der Zeit

abnahm, während in den Zellen weiterhin Virus-codierte GFP Expression nachgewiesen werden konnte. Nach einem Monat erreichte die Genexpression wieder das Niveau der Kontrollen ohne siRNA Expressionskassette, während sie nach FACS-Analyse immer noch GFP-positiv waren. Es wurde vermutet, dass zytotoxische Effekte einer shRNA Expression den Zellen mit geringer shRNA Expression einen selektiven Vorteil verschaffen. Die Selektion führte zu Zellen mit geringer shRNA Expression und somit wurde die Genexpression in der Zellpopulation wieder hergestellt, während die GFP-Expression zu keiner Selektion führte und unverändert bleibt¹³¹.

5.1.4.3 Toxische Effekte des Vektorsystem

Die Infektion der Myoblasten mit aufkonzentriertem Virus und den verwendeten MOIs zeigte toxische Effekte, die bei der Verwendung von virushaltigem Überstand nur vereinzelt beobachtet wurde. Eine erhöhte Apoptose durch p21 Inhibierung wurde bislang in Versuchen an verschiedenen Zellen nicht beobachtet^{126,129}. In den transienten Transfektionen mit p21 siRNA zeigte sich keine Apoptose gegenüber den Kontrollen. Eine Zunahme des Zellsterbens war erwartet worden, da eine höhere MOI zu einer vermehrten Integration von Virus-DNA in das Genom führt und die Chance erhöht, die Expression essentieller Gene zu unterbrechen. In der Literatur sind bereits höhere Konzentrationen von Lentiviren verwendet worden ohne dabei Zellsterben auszulösen. Diese haben jedoch Gene exprimiert und besaßen keine shRNA Kassetten¹⁴³. Eine mögliche Ursache könnte der kombinierte Effekt von p21 Inhibierung und Virusintegration sein. P21 stoppt Zellen in der G1-, S- und G2 Phase des Zellzyklus, um die Teilung von Zellen mit geschädigter DNA zu unterbinden¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Somit wird der Zelle Zeit gegeben diese zu reparieren. Kommt es nicht zum Stopp des Zellzyklus durch p21 oder p53 Mutation, schreitet die Zelle im Zellzyklus fort, was zu Apoptose führt¹⁴⁷. Durch die Integration von viralen p21 siRNA Konstrukten kam es zu einer DNA-Schädigung und zusätzlich zu einer Inhibierung von p21, was eine Ursache für das Zellsterben sein könnte. Dagegen spricht jedoch, dass die Auswirkungen der p21 Inhibition nach den Ergebnissen der transienten Transfektion erst nach 72 Stunden zu erwarten waren, während das Zellsterben bereits nach 24 Stunden zu beobachten war. Auch wurden toxische Effekte nach lentiviral vermittelter p53 Inhibierung in 293T Zellen nicht beschrieben¹⁴⁸.

Die Dys- Zellen wurden im Anschluss an die Infektion mit Viruskonzentrat für 17-20 Tage kultiviert, da der hohe Verlust an Zellen eine Analyse durch FACS, PCR und Westernblot zu einem früheren Zeitpunkt nicht zuließ. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass eine Selektion stattgefunden hat. Dagegen spricht jedoch, dass es in der ersten Infektion der Zellen 77/02 mit dem Vektor pLV-THM-p21-H1 zu einer vollständigen p21 Proteinreduktion gekommen ist, obwohl die Zellen ebenfalls drei Wochen lang nach Infektion kultiviert wurden.

Um zytotoxische Effekte zu reduzieren, wurde beim Vektor pIV-THM-p21-H3 neben der verwendeten MOI von 40 auch eine MOI von 10 verwendet. Die FACS Analyse zeigte keine Unterschiede im Anteil

GFP-positiver Zellen fünf Wochen nach Infektion. Eine niedrigere MOI verringerte das Zellsterben und zeigte ebenfalls eine Wirkung sowohl auf die Proliferation als auch auf die p21 mRNA Expression, doch eine Reduktion im p21 Proteingehalt blieb aus.

Schlussfolgerungen :

Entscheidend bei einer permanenten Inhibition durch siRNA ist eine gleichbleibende und ausreichende Expression der shRNA *in vitro*. Lentiviren bieten die Möglichkeit, siRNA Expressionskassetten stabil in das Genom zu integrieren. Die Expression der siRNA wird jedoch von Faktoren wie dem Integrationsort, der Anzahl integrierter Kopien und möglichen zytotoxischen Effekten beeinflusst. Die Expression der siRNA, die Integration sowie unspezifische Effekte können zu einer Selektion bei längerer Kultivierung führen. Dies kann zu einer Variabilität in der Effektivität der siRNA vermittelten Inhibition in den Experimenten führen. Es ist daher wichtig bei der Infektion eine Viruslast zu verwenden, die zum einen zu einer effektiven Reduktion des Zielgens führt aber gleichzeitig die negativen Effekte einer multiplen Integration in Grenzen hält. Die Identifizierung des Integrationsortes sowie der Nachweis der exprimierten siRNA sind daher von Interesse.

5.2 Einsatz von viralen Vektorsystemen in der Gentherapie

Retroviraler Gentransfer bietet die Möglichkeit die Expression eines Transgens in den Zielzellen für eine lange Zeit aufrecht zu erhalten⁴⁴. Es ist dabei möglich, durch Pseudotypisierung Zell- oder Gewebespezifität zu erreichen¹⁴⁹. Das Virus bietet mit einer Kapazität von 8 kb-10 kb die Möglichkeit zur Insertion von einem oder mehreren Transgenen¹⁵⁰. Die Verwendung von lentiviralen Vektoren bringt jedoch auch Risiken mit sich, die bei einem Einsatz am Menschen sorgfältig abgewogen werden müssen. Hierbei sind vor allem drei Risiken zu erwähnen:

- Die Möglichkeit des Entstehens von Replikations-kompetenten Viren bei der Produktion durch Rekombination¹⁵¹.
- Die Möglichkeit der Mobilisation des integrierten Provirus durch vorausgegangene oder anschließende Infektion mit HIV¹⁵².
- Die Gefahr einer Insertions-bedingten Onkogenese durch das Virus.

Die Möglichkeit, dass das Virus durch homologe Rekombination die Fähigkeit zur Replikation wiedererlangt, ist durch die Weiterentwicklung der Vektorsysteme praktisch ausgeschlossen. Die hierzu benötigten Enzyme und Struktur codierenden Gene wurden aus dem Vektor entfernt und auf drei bzw. vier Helferplasmide verteilt, was die Chance einer Wiederherstellung durch Rekombination drastisch reduziert¹⁵³.

Die Entwicklung von viralen Vektoren mit mutierter U3 LTR, den sogenannten *self inactivating* (SIN) Vektoren, bei denen dort liegende Promotoren und Enhancer deletiert sind, half das Risiko eines Replikations-kompetenten Virus einzuschränken¹⁵⁴. Es kann jedoch auch dort noch zu einer Expression von Transkripten voller Länge kommen. Genauere Untersuchungen dieser Region ermittelten weitere Bereiche, die für eine Expression ausgehend von der LTR verantwortlich sind. Deren Deletion führte zu einer weiteren Reduktion in der Expression von Transkripten voller Länge¹⁵⁵.

Für die Gefahr einer Insertions-bedingten Onkogenese gibt es bis heute keine zufriedenstellende Lösung. Obwohl retrovirale Integration in der Regel nur ein Allel betrifft und somit die Auswirkungen nur bei dominanten Genen bzw. Y oder X chromosomal codierten Genen bei Männern zu einem Ausfall des Gens führt, kam es im klinischen Versuch bei drei von elf Kindern mit einem SCID-Syndrom (*Severe Combined Immunodeficiency*) zu unkontrollierter T-Zell Proliferation drei Jahre nach einem *ex vivo* Gentransfer in autologe CD34+ hämatopoetischen Stammzellen^{156,157}. Genauere Untersuchungen der betroffenen Kinder zeigten in zwei von drei Fällen die Integration des Virus nahe der LMO2 Promotor - Region. Es wird vermutet, dass die viruscodierenden Sequenzen als Enhancer auf den Promotor wirkten und somit die Expression des proto-Onkogen steigerten¹⁵⁶, welches in 45% der Leukämiefälle aktiviert ist¹⁵⁸. Die Untersuchung des dritten Kindes steht noch aus. Obwohl die Therapie zu einer teilweisen oder vollständigen Wiederherstellung des Immunsystems führte, wurde die Studie aufgrund der Risiken abgebrochen. Eine zweite klinische Studie in England an vier SCID Patienten wies 29 Monate nach Behandlung nicht auf eine Onkogenese hin und führte zu einer klinischen Verbesserung des Immunsystems. Eine Identifizierung von über 200 Integrationsstellen zeigte keine retrovirale Integration in der Nähe der LMO2 Region¹⁵⁹. Um die Integration von Retroviren genauer zu charakterisieren, wurden große Studien durchgeführt. Die Integration von HIV-1 und Analyse von 524 Integrationen zeigte eine Präferenz für aktiv transkribierte Gene und es konnten einige sogenannte *Hotspots* in Zelllinien identifiziert werden. Dabei gab es keine Präferenz in der funktionalen Klasse der Gene. Intron-Integrationen waren häufiger als Integrationen in codierende Regionen, was vermutlich an ihrem größeren Anteil am Genom liegt¹⁶⁰. Auch andere retrovirale Vektoren wurden untersucht. Während das MLV-Virus eine Präferenz für Transkriptions-Startregionen in einer humanen Krebszelllinie zeigte¹⁶¹, war die Integration des *avian sarcoma leukosis virus* in oder in der Nähe von aktiven Regionen nicht erhöht¹⁶². Es ist zurzeit nicht möglich, den Integrationsort eines Retrovirus vorherzusagen oder zu beeinflussen.

Die Retroviren bieten jedoch in der Gentherapie für die Duchenne Muskeldystrophie bereits erwähnte entscheidende Vorteile, wie eine erhöhte Kapazität gegenüber AAV basierenden Vektoren, die Fähigkeit differenzierte Myoblasten zu infizieren und durch stabile Integration die Expression des Transgens über lange Zeit zu gewährleisten⁴⁵.

Die adenoviralen Vektoren bieten gegenüber den retroviralen Vektoren den Vorteil, dass sie ihr Genom nicht in das des Wirtes integrieren. Somit kann es auch nicht zu einer integrationsbedingten

Onkogenese kommen. Die ersten *in vivo* Studien an Hunden und Affen führten AV jedoch nur zu einer kurzzeitigen Expression des Transgens und zur immunologischen Abwehr, die zu Schädigungen von Organen, vorwiegend der Leber, führten^{163,164}. Die hohe Viruslast einer systemischen Injektion von *fully truncated* Adenoviren führte in einer klinischen Studie zum Tod einer 18-jährigen Patientin, die an einer seltenen Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz litt. Dabei kam es zu einer massiven Immunantwort, die zu Organversagen führte¹⁶⁵. Es wird vermutet, dass es bei der Patientin zu einer vorausgegangenen Sensibilisierung gegenüber dem Wildtyp Virus kam, da eine identisch behandelte Patientin keine Nebenwirkungen zeigte¹⁶⁶. Auch *fully truncated* Adenoviren können im Tiermodell eine Immunantwort auslösen, da sie immer noch Hüllproteine präsentieren¹⁶⁷. Dies erlaubt keine wiederholte Gabe des viralen Vektors wegen der zu erwartenden Verstärkung der Immunantwort¹⁶⁸. Hinzu kommt, dass in der Therapie für die DMD wie auch bei der Therapie für SCID oder cystische Fibrose nur bestimmte Zellen das Ziel einer Gentherapie sind und eine Expression von Transgenen bzw. die Integration des Vektors in anderen Zellen vermieden werden sollte. Gewebespezifische Promotoren würden bei adenoviralen Vektoren eine Expression in anderen Zellen verhindern¹⁶⁹. Die Integration von Retroviren in Zellen, die nicht das Ziel der Therapie sind, könnte nur durch den Einsatz von spezifischen *envelope* Glycoproteinen verhindert werden^{170,171}. Diese stehen bislang jedoch noch nicht für alle Zell- oder Gewebearten zur Verfügung.

5.3 Funktionelle Konsequenzen der p21 Reduktion

5.3.1 Mögliche Nebenwirkungen der p21 Reduktion

Obwohl p21 eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus zukommt¹⁷², zeigen p21-/- *knockout* Mäuse eine weitestgehend normale Entwicklung¹⁷³. Versuche an embryonalen Fibroblasten isoliert aus p21 *knockout* Mäusen können nach DNA Schädigung nicht in der G1 Phase verbleiben¹⁷⁴, was Ursache einer erhöhten Rate an chemisch induzierten Hauttumoren sein könnte¹⁷⁵. Weiterhin zeigen weibliche Mäuse eine verringerte Lebenserwartung durch fehlende Kontrolle der T-Zell Proliferation und eine verringerte Toleranz gegenüber nuklearen Antigenen, was Ähnlichkeiten zu der menschlichen Krankheit *Lupus erythematoses* aufweist¹⁷⁶. Zudem wird p21 eine Rolle als Tumorsuppressor zugesprochen. Diese ist jedoch weit geringer als zunächst angenommen¹⁷⁷. Eine erhöhte Tumorbildung zeigte sich zumeist in einer kombinierten Modifikation von p21 und einem Tumorsuppressor bzw. Tumoraktivator, wie z.B. p18 *knockout*¹⁷⁸, Ras Überexpression¹⁷⁹ oder in Mäusen mit einem mutierten Apc-Allel (adenomatöse Polyposis coli)¹⁸⁰. P21 *knockout* Mäuse entwickeln im Alter von etwa 16 Monaten Tumore, während Wildtyp Mäuse auch nach 24 Monaten noch ohne Tumor waren. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Tumorbildung nach ionisierender Strahlung in p21 *knockout* Mäusen gegenüber Wildtyp Mäusen signifikant reduziert war. Da es in p21

knockout Mäusen nicht zu einem p53 aktivierten Stop des Zellzyklus durch p21 kommt, wird in den betroffenen Zellen durch p53 Apoptose ausgelöst, wodurch die Karzinogenese reduziert ist¹⁸¹. Dies verstärkt die These, dass es neben der Proliferationssteigerung in der Onkogenese zu einer Inhibition der Apoptose kommen muss, da sonst die Zellen absterben¹⁸². In einer Untersuchung von 471 humanen Proben von 15 verschiedenen Primärtumoren und 36 verschiedenen Tumor Zelllinien wurden keine Mutationen im p21 Gen gefunden. Somit ist ein p21 *knockout* als primäre Ursache für die Tumorentstehung unwahrscheinlich¹⁷⁷.

Daraus lässt sich schließen, dass die Inhibition von p21 eine geeignete Strategie ist, die Proliferation von Zellen zu steigern ohne eine direkte Onkogenese auszulösen. Ein stabiler *knockout* ist jedoch im Hinblick auf eine selektive Unterstützung weiterer Mutationen in der Onkogenese ungeeignet. Daher wurde in dieser Arbeit mit einem regulierbaren System zur p21 siRNA Expression gearbeitet. Die Regulation der Expression durch das Tetrazyklin Repressor-System kam jedoch nicht zum Einsatz, da die Zellzahl nach Infektion mit dem siRNA exprimierenden Virus für eine weitere Infektion mit dem Repressor-tragenden Virus zu niedrig war. Vielmehr stand die Etablierung eines stabilen p21 *knockdown* durch siRNA und dessen Auswirkung im Vordergrund.

Ein weiteres Argument für die Verwendung eines induzierbaren Vektorsystems ist die Rolle von p21 in der Differenzierung und der Proliferation von Muskelvorläuferzellen. Hierbei wird durch myogene Faktoren wie MyoD die Expression von p21 erhöht, das Fortschreiten im Zellzyklus blockiert und so die Differenzierung eingeleitet¹⁸³. Die Tatsache, dass die p21 *knockout* Maus eine normale Muskelentwicklung zeigt¹⁷³, deutet darauf hin, dass andere Faktoren das Fehlen von p21 in der Differenzierung kompensieren können. Die Hypothese wird durch den Befund einer schweren Störung in der Muskelentwicklung bei einer p21, p57 doppel-*knockout* Maus unterstützt⁸⁵. Dennoch zeigen p21 *knockout* Mäuse eine geringere Muskelregeneration nach Kardiotoxin-induzierter Muskelschädigung im Vergleich zu Wildtyp Mäusen. Muskel-Vorläuferzellen der p21 *-/-* Maus zeigen eine erhöhte Proliferation, jedoch eine schlechtere Differenzierung und eine erhöhte Apoptoserate gegenüber Wildtyp Muskel-Vorläuferzellen¹⁸⁴. Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass Dys- Myoblasten nach Infektion mit pLV-THM-p21-H1 im Vergleich zu Kontrollzellen auch unter Differenzierungsbedingungen proliferieren und somit nicht in der Lage sind, vollständig zu differenzieren.

5.3.2 Proliferationsverdopplung als Therapie der Duchenne Muskeldystrophie

Bislang existiert keine effiziente kausale Therapie für die Duchenne Muskeldystrophie, obwohl Ursache und molekularer Hintergrund gut verstanden sind. Um diese zu erreichen, ist die Wiederherstellung der strukturellen Integrität der Muskelfasern durch die Expression von Dystrophin oder einem Analogon von entscheidender Bedeutung, denn nur so kann der fortlaufende Verlust von Myoblasten verhindert

werden. Zahlreiche Untersuchungen haben am mdx-Mausmodell gezeigt, dass dies durch die Expression von Dystrophin unter Verwendung verschiedener Vektorsysteme erreicht werden kann^{28,36,39,45}. Um eine Dystrophin-Expression in allen Muskeln des Körpers zu erreichen, wäre eine systemische Applikation notwendig. Diese kommt unter Verwendung von viralen Vektoren für die Therapie von DMD jedoch durch die genannten Risiken nicht in Frage und hat dazu geführt, dass verstärkt an lokaler Injektion in den betroffenen Muskel oder an *ex vivo* Therapieformen geforscht wird. Beide Alternativen führen nur in den behandelten Muskel zu einer Verbesserung und sie umgehen die Probleme der Gewebespezifität. Der entscheidende Vorteil einer *ex vivo* Therapie mit autologen Zellen ist jedoch, dass es hierbei zu keinem Kontakt des Immunsystems mit viralen Hüllenproteinen kommt und somit die Gefahr einer Immunantwort auf das Gentransfersystem verringert wird¹⁸⁵. Es ist möglich, nur bestimmte Zellpopulationen einer *ex vivo* Gentherapie zu unterziehen, wie Myoblasten⁴⁵ oder Muskelvorläuferzellen¹⁸⁶. Dies ermöglicht den Verzicht auf gewebespezifische Promotoren während bei einer intramuskulären Injektion stets das Risiko eines Transfer in andere Zellpopulationen, wie das versorgende Gefäß- oder Blutsystem, besteht. Ein weiterer Vorteil der *ex vivo* Therapie ist die Möglichkeit, das Transgen nicht viral in die zu behandelnden Zellen zu bringen sondern zum Beispiel durch die Integration mit Transposon Systemen, die ebenfalls zu einer stabilen Langzeitexpression führen aber keine viralen Sequenzen besitzen¹⁸⁷.

Die *ex vivo* Therapie besitzt jedoch auch Nachteile. Die Reimplantation der transgenen Zellen und das Ziel einer Verteilung im Muskel mit einer Verbesserung der physiologischen Eigenschaften ist bis heute problematisch¹⁸⁸. Eine neuere Studie wies nach Myoblastentransfer an drei DMD Patienten, die 25 parallele Injektionen in den *tibialis anterior* von Dys+ Spenderzellen unter Immunsuppression erhielten, einen Anteil an Dystrophin positiven Muskelfasern vier Wochen nach Behandlung von 6,8% bis 11% nach¹⁸⁹. Einen anderen Weg zeigten Cossu et al., die durch intra-arterielle Injektion von Mesoangioblasten in immunkompetenten α -Sarkoglykan defizienten Mäusen in der Lage war, die Morphologie und Funktionalität in allen Muskeln im Gefäßverlauf nach der Injektionsstelle zu korrigieren. Damit zeigten sie, dass es auch durch systemische Gabe von transgenen Zellen zu einer Verbesserung im skeletalen Muskel kommen kann. Die verwendeten Gefäß-assoziierten Stammzellen wurden jedoch aus fötalem Gewebe isoliert und es bleibt zu klären, ob auch aus adulten Tieren Zellen in ausreichender Menge isoliert werden können⁶⁰.

Wie bereits beschrieben kommt es durch das Fortschreiten des Krankheitsverlaufes der Muskeldystrophie zum Untergang des Muskelgewebes und dessen Ersatz durch Fett und Bindegewebe. Auch Muskel-Progenitor Zellen, aus denen die Bildung neuer Myoblasten nach einer Verletzung resultiert, sind im mdx-Mausmodell reduziert⁵³. Daher ist es für eine autologe *ex vivo* Therapie notwendig, den Patienten schon frühzeitig Zellen zu entnehmen und *in vitro* zu expandieren. Dabei sollte die Menge der entnommenen Zellen so gering wie möglich sein, um den im Muskel verursachten Schaden zu minimieren, gleichzeitig ist es notwendig eine ausreichend hohe Zellzahl zu

erreichen, die eine mehrfache intramuskuläre Injektion sowie die Behandlung von mehreren Muskeln zulässt¹⁸⁹. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es möglich ist, die Proliferation von Dys- Muskelzellen durch die Infektion mit einem lentiviralen Vektor und vermittelten Expression von p21 siRNA deutlich und nachhaltig zu steigern und somit die Expansion der Zellen zu beschleunigen. Dies könnte zu einer deutlichen Verbesserung der Strategie des Transfer autologer Myoblasten führen. Der Einsatz eines regulierbaren Systems für siRNA kann dafür sorgen, dass die Expression der siRNA unterdrückt wird¹¹³. Die Zellen wären in der Lage, durch ein wiederhergestelltes p21 Niveau zu redifferenzieren. Es wäre zudem denkbar, das hier eingesetzte Lentivirus zu modifizieren und die Sequenz eines Mikrodystrophins direkt in den pLV-THM-p21 Vektor zu klonieren. Eine beschleunigte Expansion der transgenen Zellen sowie eine Wiederherstellung der Dystrophinexpression nach Implantation wäre mit einer einzelnen Virusinfektion gegeben. Die Größe der regulierbaren Expressionskassette in der LTR Region des Vektor s beträgt lediglich ca. 700bp, was die Expression eines Mikrodystrophins ermöglichen würde. Für diesen Ansatz ist jedoch ein veränderter Repressor notwendig, da der von der Arbeitsgruppe Trono entwickelte Repressor die siRNA Expression zwar effektiv unterdrückt, dabei jedoch auch die Expression anderer Gene innerhalb von 3kb zum Operator unterdrückt wird¹¹³.

Das Problem der Immunantwort, die durch die Expression des Transgens ausgelöst wird, bleibt jedoch sowohl durch *in vivo* als auch durch *ex vivo* Therapiestrategien ungelöst. Eine Ausnahme wäre die Expression von Utrophin. Ob eine weitere Steigerung der Utrophinexpression über die per se erhöhte Expression in DMD Patienten in der Lage ist, den Ausfall des Dystrophin zu kompensieren, ist unklar. Eine Expression von Dystrophin führt im DMD Patienten stets zu einer Immunabwehr, die durch die Gabe von Immunsuppressiva unterdrückt werden muss¹⁸⁹. Um dies zu vermeiden wäre eine Therapie zu einer Zeit notwendig, in der das Immunsystem noch tolerant gegenüber Antigenen ist¹⁹⁰. Coutelle et al. konnten zeigen, dass es mit fetaler Gentherapie möglich ist, die Expression des Transgens durch Injektion in verschiedenen Muskelgruppen zu erreichen und das diese mit einer Toleranz des Immunsystems einhergeht^{46,191}. Dies setzt eine präventive pränatale Diagnostik voraus, die nicht ohne Risiko ist¹⁵⁵. Hinzu kommen ethische Bedenken¹⁹².

6 Ausblick

Weiterführende Arbeiten müssen folgende beobachtete Probleme und offenen Fragen abklären.

- Die initiale Toxizität nach Infektion primärer Muskelzellen mit lentiviralen Vektoren.
- Die mangelnde Reproduzierbarkeit der funktionellen Effekte (Proliferationssteigerung, p21 mRNA und Proteinreduktion) in Zellen desselben Patienten nach Infektion mit identischer Viruslast.
- Den Unterschied des siRNA/shRNA Effekts nach Transfektion von Myoblasten verschiedener Patienten.
- Die Redifferenzierung der Myoblasten nach p21 Inhibition.
- Die Wirksamkeit des Dystrophin- oder Utrophin-Gens im Vektor pLV-TM-p21-H3.