

Muskelstammzelltherapien

Stammzelltherapien für Muskeldystrophien

HELENA ESCOBAR

MUSCLE RESEARCH UNIT, MAX-DELBRÜCK-CENTER FOR MOLECULAR MEDICINE IN THE HELMHOLTZ ASSOCIATION, (MDC), BERLIN

Muscular dystrophies are devastating and untreatable genetic diseases leading to progressive muscle degeneration and weakness. The expanding landscape of CRISPR-Cas-based genome editing tools allows the *in situ* repair of many disease-causing mutations in patient cells in an unprecedented manner. Here, I discuss recent advances and challenges for using gene edited muscle stem cells in autologous cell replacement therapies to treat muscular dystrophy.

DOI: 10.1007/s12268-022-1807-5
© Die Autorin 2022

■ Unter dem Begriff „Muskeldystrophie“ versteht man eine heterogene Gruppe von genetischen Krankheiten, die zu einem fortschreitenden Verlust von intakter Skelettmuskulatur führen und zum Teil auch den Herzmuskel betreffen können. Muskeldystrophien sind monogene Krankheiten, d. h. Mutationen in einem einzigen Gen verursachen die Krankheit. Gene sind der Bauplan für Proteine und diese sind entscheidend für die Funktionsfähigkeit von Zellen. Die meisten krankheitsauslösenden Mutationen führen dazu, dass entweder kein oder ein funktionsunfähiges Protein hergestellt wird. Handelt es sich um bestimmte Proteine, die in der quergestreiften Muskulatur eine wichtige Rolle spielen, verursacht dies Muskeldystrophien. Derzeit sind etwa 50 Gene bekannt, bei denen Mutationen zu Muskeldystrophien führen können.

Muskeldystrophie-Patient:innen leiden unter fortschreitendem Muskelkraftverlust mit erheblichen Einschränkungen im täglichen Leben und medizinischen Problemen. Patient:innen verlieren die Fähigkeit, den Arm zu heben, nach Gegenständen zu greifen oder sind auf einen Rollstuhl angewiesen. Einige sind aufgrund der Beeinträchtigung ihres Zwerchfellmuskels in ihrer Atmungsfunktion eingeschränkt. Die verschiedenen

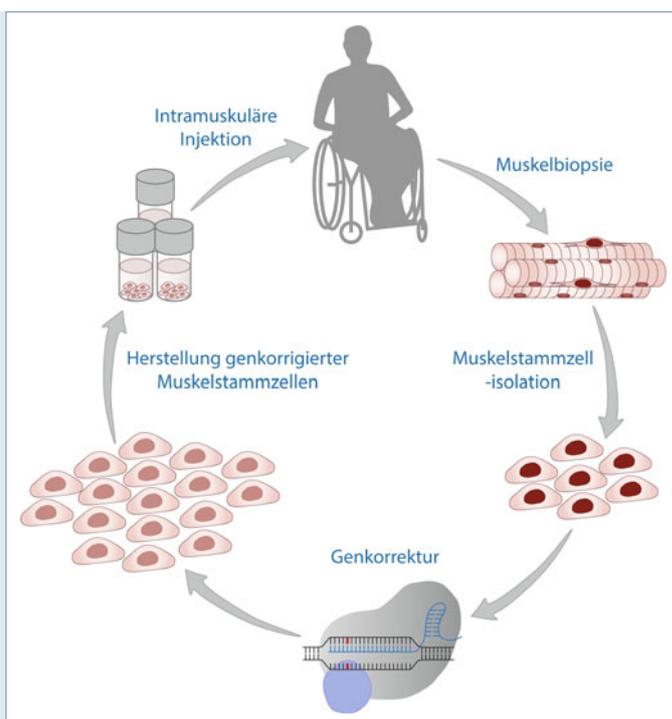
Muskeldystrophien unterscheiden sich im Krankheitsbeginn (Alter), Krankheitsverlauf, klinischen Symptomen und den besonders betroffenen Muskelgruppen. Eines haben jedoch allen Muskeldystrophien gemeinsam: Derzeit existiert weder eine effektive Thera-

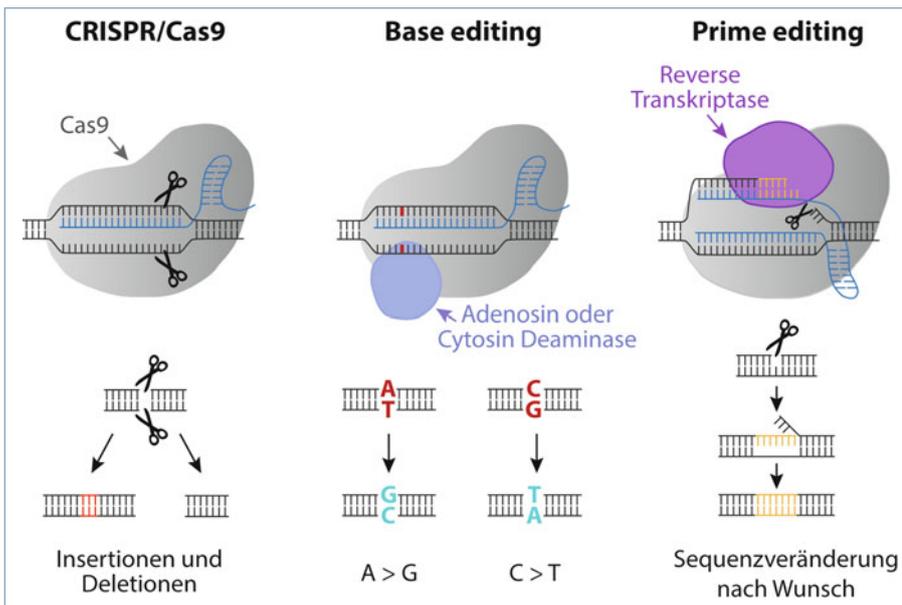
pie noch eine Heilung. Die Standardbehandlung besteht darin, palliative Unterstützung anzubieten. Bisher konnte jedoch nicht die Krankheitsursache repariert werden, die krankheitsauslösende Veränderung im betroffenen Gen.

Die Muskelstammzelle

Alle Muskeldystrophien führen zu einer fortschreitenden Degeneration der Skelettmuskulatur. Bei Gesunden ist der Skelettmuskel ein sehr plastisches Organ. Er muss sich schnell an Veränderungen des Lebensstils anpassen und ist immer großen mechanischen Belastungen und Stress ausgesetzt. Dies ist zum Großteil nur möglich, weil der Skelettmuskel mit einem eigenen Reservoir an erwachsenen Stammzellen ausgestattet ist. Muskelstammzellen, auch Satellitenzellen genannt, befinden sich in einer spezialisierten Nische zwischen Muskelfasern und sind normalerweise im Ruhezustand. Werden sie als Reaktion auf bestimmte Reize, wie z. B. einer Muskelverletzung aktiviert, vermehren sie sich und können eine große

► **Abb. 1:** Konzept zur autologen Zellersatztherapie mit genkorrigierten Muskelstammzellen. Aus Muskelbiopsien von Muskeldystrophie-Patient:innen werden Muskelstammzellen isoliert. Diese werden mittels CRISPR-Cas-basierten Werkzeugen genkorrigiert und ausführlich charakterisiert. Zuletzt werden sie dem Patienten auf autologe Weise injiziert.





▲ Abb. 2: Verschiedene Arten der Genom-Editierung mit CRISPR-Cas-basierten Werkzeugen. Beim klassischen CRISPR-Cas9 (links) schneidet Cas9 die Ziel-DNA. Der Doppelstrangbruch wird von der Zelle repariert, was zu verschiedenen Ergebnissen führt. Beim *base editing* (Mitte) wird Cas9 an eine Adenosin- oder Cytosin-Desaminase fusioniert, die an bestimmten Positionen der sgRNA-Zielsequenz jeweils A>G/C>T-Nukleotide umwandelt, ohne die DNA zu schneiden. Beim *prime editing* (rechts) kopiert eine reverse Transkriptase eine Sequenz von einer modifizierten gRNA und fügt sie an der Zielstelle ein. Ziel-DNA: schwarz, gRNA: blau.

Anzahl von Muskelvorläuferzellen generieren. Diese fusionieren miteinander und bauen die vielkernigen Muskelfasern auf, die funktionellen Einheiten der Skelettmuskulatur.

Muskelstammzellen machen nur etwa zwei Prozent aller Muskelzellen aus, sind aber in der Lage, das Muskelgewebe bis ins hohe Alter trotz täglicher „Abnutzung“ funktionsfähig zu halten. Sie besitzen zudem die Fähigkeit, Muskeln nach Verletzung zu regenerieren. Bei vielen Muskeldystrophien ist die Funktion der Muskelstammzellen nicht direkt durch den Gendefekt beeinträchtigt. Die Muskelfasern sind jedoch aufgrund der genetischen Fehlfunktion instabil und müssen ständig repariert oder durch neue ersetzt werden.

Zellersatztherapien

Zellersatztherapien für Muskeldystrophien zielen darauf ab, das kranke Gewebe mit transplantierten Zellen zu unterstützen oder sogar wiederherzustellen. Die Zellen müssen sowohl neue gesunde Muskelfasern bilden als auch die Stammzellnische mit neuen Satellitenzellen besiedeln. Letzteres ist erforderlich, um eine gesunde Muskelhomöostase und -regeneration langfristig aufrechtzuerhalten. Die vielversprechendsten Quellen sind derzeit primäre Muskelstamm- und

-vorläuferzellen, die aus einem Muskelbiopsiepräparat isoliert werden, oder myogene Zellen, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) differenziert werden.

Menschliche iPS-Zellen wurden erstmals 2007 gewonnen. Durch das Einbringen von spezifischen Transkriptionsfaktoren können Körperzellen eines Erwachsenen in einen embryonalen stammzellähnlichen Phänotyp zurückprogrammiert werden [1]. Aus den iPS-Zellen können dann wieder unterschiedlichste gewebespezifische Zelltypen generiert werden. Für die Entwicklung dieser Technologie erhielt Shinya Yamanaka 2012 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Seitdem haben zahlreiche Labore Protokolle zur *in vitro*-Differenzierung von iPS-Zellen in eine Vielzahl von Zelltypen entwickelt, darunter auch muskelvorläuferähnliche Zellen [2, 3]. Als Quelle transplantierbarer myogener Zellen haben iPS-Zellen den Vorteil, dass sie nahezu unbegrenzt vermehrt werden können, bevor sie in die gewünschten Gewebezellen differenziert werden. Es ist jedoch eine Herausforderung, reine Kulturen iPS-abgeleiteter muskelspezifische Zellen zu generieren ohne kontaminierende Zelltypen oder nur teildifferenzierte Zellen als Nebenprodukte zu erhalten. Das ist umso entscheidender, da iPS-Zellen ein intrinsisches Potenzial haben, Tumore zu bilden. Daher ist der

therapeutische Einsatz von aus iPS-Zellen generierten Muskelvorläuferzellen derzeit noch mit Sicherheitsbedenken verbunden. Des Weiteren ähneln iPS-abgeleitete Muskelzellen noch eher den embryonalen Vorläuferzellen als den adulten Muskelstammzellen und bilden im Vergleich nach der Transplantation in Muskelgewebe kleinere Muskelfasern aus [4, 5]. Diese Herausforderungen könnten in Zukunft durch weitere Innovation gelöst werden.

Primäre Muskelstamm- und -vorläuferzellen hingegen haben eine klar definierte Identität. Tumore, die aus diesen Zellen entstehen, sind extrem selten. Nachteilig ist, dass sie außerhalb des Körpers (*ex vivo*) nur begrenzt vermehrt werden können und bei längerer Kultivierung allmählich ihren Stammzellcharakter und folglich ihre Regenerationsfähigkeit verlieren. Wir und andere haben gezeigt, dass ihre Stammzeleigenschaften durch neue Methoden der Zellisolierung und *ex vivo*-Kultur erhalten werden können. Bei Transplantation in immunosupprimierte Mäuse können diese primären menschlichen Muskelstammzellen neue Muskelfasern erzeugen und die Satellitenzellnische mit neuen funktionellen Stammzellen besiedeln [6, 7].

Zellersatztherapien mit körpereigenen bzw. autologen Zellen haben den Vorteil, keine Immunabwehr hervorzurufen. Der krankmachende Gendefekt muss aber repariert werden, bevor die Zellen den Muskeldystrophie-Patient:innen injiziert werden (**Abb. 1**). Erst dann können sie nachhaltig neues gesundes und voll funktionsfähiges Muskelgewebe aufbauen.

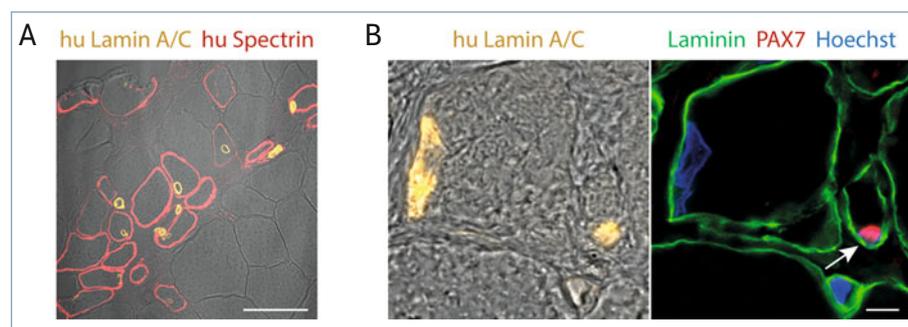
Genom-Editierung mit CRISPR-Cas-Systemen

Zahlreiche Werkzeuge und Methoden wurden über letzten Jahrzehnte hinweg entwickelt, um das Genom vieler Organismen zu manipulieren. Doch erst seit der Entdeckung der Funktionsweise der bakteriellen CRISPR-Cas-Systeme im Jahr 2012 wurde die gezielte Manipulation bestimmter Sequenzen, die Genom-Editierung (*gene editing*), in der Entwicklung von Gentherapien in ungeahntem Ausmaß möglich [8]. Für diese Entdeckung erhielten Emmanuelle Charpentier und Jennifer A. Doudna den Nobelpreis für Chemie im Jahr 2020.

CRISPR steht für *clustered regularly interspersed short palindromic repeats* und Cas für *CRISPR-associated*. Cas-Proteine sind programmierbare Nukleasen, die DNA oder RNA

ortsspezifisch binden und schneiden. Sie werden gesteuert von kurzen RNA-Sequenzen, den *guide* RNAs (gRNAs), mit denen sie einen Komplex bilden. Die gRNA ist in ca. 20 Nukleotiden passend zur Zielsequenz. Das bisher am besten untersuchte und am häufigsten verwendete System ist CRISPR-Cas9. Cas9-gRNA-Komplexe können mit verschiedenen Methoden in menschliche Zellen eingebracht werden. In die Zelle eingeführt wirkt Cas9 als eine Genschere, die durch die Anpassung der gRNA-Sequenz auf praktisch jeden Sequenzabschnitt im Genom gerichtet werden kann, wo sie dann gezielt schneidet. Der generierte DNA-Bruch wird von der Zelle repariert, in der Regel auf eine leicht fehlerhafte Weise, wodurch kleine Insertionen oder Deletionen entstehen. Dies ist ein sehr effektiver Weg, um Änderungen im genetischen Leseraster einzuführen, die wirksam genutzt werden können, um z. B. Gene zu inaktivieren oder Leserastermutationen zu korrigieren. Gentechnisch inaktivierte Cas-Enzyme, die die DNA nicht schneiden, können mit zusätzlichen Proteinen kombiniert werden, um den genetischen Code auf noch präzisere Weise umzuschreiben. Mit *base editing* können spezifische Basenpaare umgewandelt werden, um eine Vielzahl einzelner Basenaustauschmutationen mit hoher Präzision zu reparieren. *Prime editing* nutzt eine modifizierte gRNA als Vorlage, um eine gewünschte Sequenz an der Zielstelle einzufügen (Abb. 2, [9]).

Wir haben kürzlich gezeigt, dass reine und regenerative primäre Muskelstammzellen von Patient:innen mit Muskeldystrophie isoliert und mit CRISPR-Cas9-basierten Werkzeugen sehr effizient korrigiert werden können. In Mäusen regenerieren diese genkorrigierten Zellen Muskelgewebe und besiedeln die Stammzellnische neu (Abb. 3, [10]). Autologe Zellersatztherapien mit geneditierten Muskelstammzellen könnten daher eine langfristige therapeutische Wirkung haben. Hier konnten wir zudem zeigen, dass mRNA ein ideales Substrat für die sichere und robuste Einführung von CRISPR-Cas-Werkzeugen in menschliche Muskelstammzellen ist. mRNA wird nach wenigen Tagen in der Zelle abgebaut und dadurch werden Risiken der Genom-Editierung, wie die ungewollte Veränderung von DNA an anderer Stelle, minimiert. In menschlichen Muskelstammzellen konnte mittels mRNA eine sehr hohe Editierungseffizienz erreicht werden [11]. Insbesondere *base editing* ermöglicht eine nahezu vollständige und präzise Reparatur krank-



▲ **Abb. 3:** Gen-editierte Patient-Muskelstammzellen regenerieren Muskel *in vivo*. Muskelstammzellen eines Patienten, der eine Muskeldystrophie verursachende *SGCA c.157G>A*-Mutation trägt, wurden durch *base editing* genkorrigiert und in den Tibialis anterior-Muskel immundefizienter (NSG) Mäuse transplantiert. Schnitte eines transplantierten Muskels wurden mit Antikörpern gefärbt. **A**, menschliche Zellkerne (gelb) und menschliche Muskelfasern (rot), die in dem Maus-Muskel angewachsen sind. Maßstabsskala: 100 µm. **B**, zwei Bilder desselben Bereichs. Links: Menschliche Zellkerne (gelb), rechts: Basallamina, die Muskelfasern umringt (grün). PAX7 (rot) kennzeichnet eine menschliche Zelle, die die Muskelstammzellnische neu besiedelt hat (Pfeil). Alle Zellkerne (Maus und Mensch) sind blau dargestellt. Maßstabsskala: 5 µm.

heitsauslösender Mutationen in kultivierten Patient:innen-Muskelstammzellen. Diese jüngsten Fortschritte in der Stammzellbiologie und Genom-Editierung machen daher die Muskelstammzellen für autologe Genersatztherapien zur Behandlung von Muskeldystrophien sehr interessant.

Derzeitige Limitierungen und Zukunftsperspektiven

Die Limitierung von primären Muskelstammzellen für die therapeutische Nutzung liegt in ihrer begrenzten Zellteilungsfähigkeit nach Isolation aus dem Gewebe. Deswegen können nach Stand der Technik nur eine begrenzte Menge an Muskelgewebe im Rahmen einer autologen Transplantation rekonstruiert werden. Auch wenn Muskeldystrophien grundsätzlich alle Muskeln betreffen können, ist der Grad des Funktionsverlusts für die jeweiligen Muskelgruppe sehr unterschiedlich ausgeprägt. Für Patient:innen ist es von entscheidender Bedeutung, vor allem die leberhaltenden oder im täglichen Leben besonders relevanten Muskeln in ihrer Funktion zu stärken.

Wenn die Gen-Editierwerkzeuge über die Blutbahn in das Muskelgewebe im Körper (*in vivo*) eingebracht würden, könnten Mutationen in vielen Muskeln im ganzen Körper, einschließlich des Zwerchfells und des Herzens, effizient repariert werden. Die derzeit größte Herausforderung im Zusammenhang mit *in vivo*-Genom-Editierungstherapien besteht in der effizienten und sicheren systemischen Verabreichung der CRISPR-Werkzeuge in den Muskel. Jüngste Entwicklungen, u. a. auf dem Gebiet der mRNA-

Therapeutika, wie z. B. die COVID19-Impfstoffe, könnten dies bald ändern. Mit einem solchen Verabreichungsverfahren auch die Satellitenzellen im Gewebe zu erreichen, scheint derzeit aufgrund der anatomischen Eigenschaften ihrer Stammzellnische und ihrer geringen Menge im Muskelgewebe eine Herausforderung darzustellen. Die Zellersatztherapie stellt daher, allein und zukünftig in Kombination mit systemisch verabreichten Genom-Editierungstherapie, eine vielversprechende Behandlungsoption mit einer langanhaltenden therapeutischen Wirkung dar. Ein besseres Verständnis der Biologie der Muskelstammzellen könnte der Schlüssel sein, um ihr therapeutisches Potenzial weiter zu erhöhen.

Trotz wachsender Anzahl von CRISPR-basierten Werkzeugen gibt es noch Einschränkungen bei der Reparatur bestimmter Arten von Mutationen. Der verfügbare Werkzeugkasten wird jedoch schnell erweitert. In Zukunft könnten daher neue Werkzeuge zur Verfügung stehen werden, die es ermöglichen, den genetischen Code in fast jeder gewünschten Weise umzuschreiben. Erste klinische Studienergebnisse unter Verwendung von CRISPR-basierten Verfahren in der Therapie von z. B. Blutkrankheiten sind vielversprechend. Dies könnte zukünftig auch ein echter „Gamechanger“ für die Behandlung von Muskeldystrophien sein.

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Simone Spuler für ihre Betreuung und Unterstützung danken. Ein großer Dank geht an die Patient:innen und ihre Familien, die unsere Forschung

möglich machen und an Dr. Verena Schöwel für das kritische Lesen und die Bearbeitung des Manuskripts. Ich möchte auch Stephan Dietrich und Christian Stadelmann herzlich für das Korrekturlesen danken. ■

Literatur

- [1] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872
- [2] Darabi R, Arpke RW, Irion S et al. (2012) Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 10: 610–619
- [3] Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z et al. (2015) Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol* 33: 962–969
- [4] Xi H, Langerman J, Sabri S et al. (2020) A human skeletal muscle atlas identifies the trajectories of stem and progenitor cells across development and from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 27: 158–176
- [5] Metzler E, Escobar H, Sunaga-Franze DY et al. (2022) Generation of hiPSC-derived skeletal muscle cells: exploiting the potential of skeletal muscle-derived hiPSCs. *Biomedicines* 10: 1204
- [6] Marg A, Escobar H, Gloy S et al. (2014) Human satellite cells have regenerative capacity and are genetically manipulable. *J Clin Invest* 124: 4257–4265
- [7] Marg A, Escobar H, Karaikos N et al. (2019) Human muscle-derived CLEC14A-positive cells regenerate muscle independent of PAX7. *Nat Commun* 10: 5776

- [8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821
- [9] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR (2020) Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol* 38: 824–844
- [10] Escobar H, Krause A, Keiper S et al. (2021) Base editing repairs an SGCA mutation in human primary muscle stem cells. *JCI Insight* 6: e145994
- [11] Stadelmann C, Di Francescantonio S, Marg A et al. (2022) mRNA-mediated delivery of gene editing tools to human primary muscle stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 28: 47–57

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der

genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Helena Escobar Fernandez
 Max Delbrück Center for Molecular Medicine
 in the Helmholtz Association (MDC)
 Robert-Rössle-Straße 10
 D-13125 Berlin
helena.escobar@mdc-berlin.de
www.mdc-berlin.de/de/spuler

AUTORIN



Helena Escobar

2004–2009 Biotechnologiestudium, Universidad de León, Spanien. 2009–2010 Masterstudium in Biomedizin, Universidad de Barcelona, Spanien. 2011–2015 Promotion in Biochemie, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin und FU Berlin. Seit 2016 Postdoc, Experimental and Clinical Research Center, MDC Berlin.