

Caroline Göhringer

Dr. med.

Systemische Gentherapie der Dilatativen Kardiomyopathie im Mausmodell mittels Adeno-assoziierten viralen (AAV)-Vektoren

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Müller

Mutationen im δ -Sarkoglykan-Gen führen zu Dilatativer Kardiomyopathie (DCM) mit autosomal-rezessivem Erbgang. Patienten mit DCM leiden häufig an komplexen ventrikulären Rhythmusstörungen und chronischer Herzinsuffizienz. Vor dem Hintergrund der Zunahme an genetisch bedingten Formen der Kardiomyopathie sind neue kausale Therapiestrategien von eminenter Bedeutung. Gentherapeutische Ansätze bieten hierbei die Möglichkeit, durch die Expression der funktionsfähigen Genkopie den gestörten Pathomechanismus auf molekularer Ebene der Herzmuskelzelle kausal zu korrigieren, um die Progression der Herzinsuffizienz möglichst frühzeitig zu verhindern.

Zukünftige Ansätze zum therapeutischen Gentransfer bei erblichen Herzmuskelerkrankungen erfordern ein Vektorsystem zur effizienten, langanhaltenden und idealerweise spezifischen Expression der therapeutischen DNA-Sequenz im Myokard. Zum kardialen Gentransfer eignen sich die auf Adeno-assoziierten Viren (AAV) basierenden Vektoren, welche bereits einen langanhaltenden Gentransfer in Tiermodellen und ersten klinischen Studien ermöglichten, wobei bisher eine Einschränkung in der fehlenden kardialen Spezifität liegt.

Grundlage der vorliegenden Arbeit waren Vorarbeiten zur Erhöhung der kardialen Zielgenauigkeit durch Kombination des effizientesten AAV-Serotyps in Verbindung mit einem geeigneten gewebespezifischen Promotor. Aufbauend auf dieser transduktionellen und transkriptionellen Modifikation der AAV-Vektoren wurden in der vorliegenden Arbeit AAV9-Vektoren eingesetzt, in deren Genom ein Herzmuskel-spezifischer Myosin-Leicht-Ketten-2(MLC-2v)-Promotor verbunden mit einer Cytomegalievirus(CMV)-Verstärker-Sequenz die Expression der Sarkoglykan-cDNA steuerte. Sechs Monate nach einmaliger intravenöser Applikation von 2×10^{11} vg von AAV9-CMV-MLC1500- δ -Sarkoglykan-Vektoren war es möglich, die Expression der intakten δ -Sarkoglykan-cDNA hochspezifisch auf 92 % der Kardiomyozyten von herzinsuffizienten δ -Sarkoglykan-defizienten Mäusen zu fokussieren und therapeutisch relevante Expressionslevel im Myokard

aufrechtzuerhalten. In der vorliegenden Arbeit ist es zudem gelungen, den therapeutischen Nutzen des Gentransfers anhand klinisch relevanter Parameter zu belegen: Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigten die Tiere nach dem δ -Sarkoglykan-Gentransfer keine kardiale Fibrose, wiesen eine signifikant bessere linksventrikuläre Herzfunktion in der Echokardiographie auf und zeigten eine erhöhte körperliche Belastbarkeit in den Laufraduntersuchungen. Durch die Rekonstitution des fehlenden Proteins wurde die Membranintegrität der Kardiomyozyten wiederhergestellt, was durch *Evans-Blue*-Injektion, einem *In-vivo-Tracer* für Membranschäden, am lebenden Tier bewiesen wurde. Zudem normalisierte sich die BNP-Expression, einem molekularen Marker der Herzinsuffizienz.

Für einen möglichen Einsatz beim Menschen wären bei systemischer Gabe der Vektoren hohe Dosen der AAV-Vektoren notwendig. In dem zweiten Ansatz dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob durch die Verwendung eines doppelsträngigen AAV-Vektorgenoms ohne Verlust der kardialen Spezifität eine erhöhte Effektivität und längere Transgen-Expression aufrechterhalten werden kann. Dieser Ansatz basiert auf der Tatsache, dass die Konversion des einzelsträngigen AAV-Vektorgenoms in die biologisch aktive doppelsträngige Form einen limitierenden Schritt bei der Transgenexpression darstellt.

Da der Doppelstrangvektor hinsichtlich seiner Verpackungskapazität limitiert ist, wurde ein auf 260 bp verkürzter ventrikulärer Myosin-Leicht-Ketten-2(MLC-2v)-Promotor verwendet. Das Doppelstrang-Konstrukt wurde ebenso wie das einzelsträngige AAV-Vektorgenom in AAV9-Viruskapside verpackt und 2×10^{11} vg von AAV9-CMV-MLC260- δ -Sarkoglykan-Vektoren wurden intravenös in die Schwanzvene von δ -Sarkoglykan-defizienten Mäusen injiziert. Nach zwölf Monaten zeigte sich bei Verwendung des 260bp-MLC-2v-Promotors im doppelsträngigen Gentransfer-Konstrukt zwar eine nahezu 100 %ige Transduktion der Kardiomyozyten, jedoch ein deutlicher Verlust der kardialen Spezifität zugunsten des Skelettmuskels. Die physiologischen und funktionellen Parameter der behandelten Tiere zeigten ebenso wie bei dem Einzelstrang-Vektor eine signifikant bessere Herzfunktion als die Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit konnten einen Beitrag leisten, eine herzmuskelspezifische Genexpression nach systemischen Gentransfer im Tiermodell durch transkriptionelle und transduktionelle Modifikation der Gentransfer-Vektoren zu erzielen, und belegen zugleich das therapeutische Potential des Gentransferansatzes durch die hohe Korrelation der histologischen mit den funktionellen und laborchemischen Daten. Das erfolgreiche Herzmuskel-spezifische *Targeting* der AAV-Vektoren in dieser Arbeit könnte darüber hinaus bei der Therapie weiterer

Formen der Herzinsuffizienz Anwendung finden: Mit Hilfe einer hochspezifischen kardialen Genaddition besteht die Möglichkeit, durch die Expression einer biologisch wirksamen DNA-Sequenz dysfunktionale Signaltransduktionswege in den Kardiomyozyten gezielt in therapeutischem Sinne zu modulieren und den geschädigten Herzmuskel auf molekularer Ebene zu unterstützen.