

Stanislas Werfel  
Dr. med.

## **Gezielte Geninaktivierung im Herzmuskel transgener Mäuse durch Gentransfer der Cre-Rekombinase mittels Adeno-assoziiierter viraler Vektoren**

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Oliver J. Müller

Ein konditionaler *Knockout* oder die Überexpression eines Gens in Herzen adulter Mäuse ist ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung komplexer kardialer Regelkreise. Mehrere Methoden wurden zu diesem Zweck etabliert, welche allesamt langwierige Verpaarungen mehrerer transgener Mausstämme erfordern und mit unerwünschter methodenbedingter Beeinflussung der Versuchsergebnisse einhergehen können. Insbesondere führt die bisher am häufigsten für konditionale *Knockouts* im Herzmuskel eingesetzte Methode, die Tamoxifen-Induktion im MHC-MerCreMer Modell, zur transienten Kardiomyopathie und systolischen Dysfunktion.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines vereinfachten Systems, welches durch kardialen Gentransfer der Cre-Rekombinase mittels Adeno-assoziiierter viraler (AAV) Vektoren einen konditionalen *Knockdown* in der Maus ermöglicht. Als Vektor wurde der AAV Serotyp 9 eingesetzt, welcher eine effektive Transduktion des Herzmuskels nach intravenöser Injektion ermöglicht (AAV9-Cre). Die Expression der cDNA der Cre-Rekombinase erfolgte dabei unter der Kontrolle des 0,26 kbp Myosin Leichtketten Promotors (MLC0.26), welcher durch den CMV-Enhancer verstärkt wurde.

Um die Effizienz der Vektoren zu bestimmen, wurden  $10^{12}$  Vg (genomische Partikel) AAV9-Cre in ROSA26-LacZ Mäuse injiziert, welche das Enzym  $\beta$ -Galactosidase (LacZ) nach Cre-vermittelter Exzision einer Stopp-Sequenz exprimieren. Nach der Sektion konnten durch X-Gal-Färbung auf Gefrierschnitten LacZ-positive Zellen blau angefärbt und gezählt werden. Dabei lag die Rekombinationsrate im Herzmuskel bei  $72\% \pm 5\%$  der Zellen zehn Wochen nach der Injektion. Es zeigte sich jedoch auch unerwartet eine starke LacZ-Expression in der Leber. In den anderen untersuchten Geweben (Niere, Milz, Lunge, quergestreifter Muskel, Gehirn) war der Anteil rekombinierter Zellen dagegen gering.

Anschließend wurde untersucht, ob mit Hilfe von AAV9-Cre ein kardialer *Knockdown* eines physiologisch relevanten Gens ausgelöst werden konnte. Hierzu wurden konditionale Serum Response Faktor (SRF) *Knockout* Mäuse verwendet (*Srf-flex1*). SRF spielt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle bei der Expression muskelspezifischer Gene. Es wurde zudem gezeigt, dass ein *Knockdown* von SRF in adulten Mäusen (unter Einsatz des MHC-MerCreMer Transgens) eine Kardiomyopathie verursacht. Im *Srf-flex1* Mausmodell

führt die Expression von Cre zur Rekombination und Exzision des loxP-flankierten, kodierenden Teils von Exon 1 von SRF.

Zur Bestätigung, dass durch Gentransfer von AAV9-Cre ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden kann wie im MHC-MerCreMer Modell, wurden in der vorliegenden Arbeit *Srf-flex1*-Mäuse mit  $10^{12}$  Vg AAV9-Cre intravenös injiziert. Nach sechs Monaten zeigten die Mäuse eine signifikant niedrigere Expression von SRF-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ihre linksventrikuläre Pumpfunktion im transthorakalen Ultraschall hatte sich signifikant verschlechtert und das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht signifikant erhöht. Es konnten zudem Zeichen einer dilatativen Kardiomyopathie in der Histologie beobachtet werden. In einer Gruppe gleichaltriger ROSA26-LacZ Mäuse wurden dagegen keine solchen Veränderungen nach einer Injektion der gleichen Menge AAV9-Cre festgestellt.

Um die Spezifität der AAV9-vermittelten Expression der Cre-Rekombinase zu erhöhen, wurden anschließend vier Abschnitte des humanen kardialen Troponin T (hTnnT2) Promotors mit der Renilla Luciferase als Reporter kloniert, in AAV9 verpackt und *in vivo* in NMRI-Mäusen untersucht. Dabei zeigte der Abschnitt von -502 bp bis +42 bp die höchste Expressionsstärke im Herzmuskel bei hoher Spezifität.

Daraufhin wurde die Eignung des effizientesten Fragments des hTnnT2-Promotors zur herzspezifischen Expression der Cre-Rekombinase geprüft, indem AAV9-hTnnT2-Cre-Vektoren hergestellt und in ROSA26-LacZ Mäuse ( $10^{12}$  Vg/Maus) injiziert wurden. Nach fünf Wochen zeigte sich eine erfolgreiche Rekombination in  $67\% \pm 9\%$  der Herzmuskelzellen, während in der Leber nur in wenigen Zellen eine Rekombination beobachtet wurde ( $<5\%$ ). Außer vereinzelt Zellen in der Lunge, wurden in den anderen untersuchten Geweben (Niere, Milz, quergestreifter Muskel) keine LacZ positiven Zellen beobachtet.

Insgesamt scheint die systemische Gabe von AAV9-Cre eine effektive, schnelle und nebenwirkungsarme Methode zu sein, um eine konditionale Überexpression oder einen *Knockdown* in Herzen adulter Mäuse auszulösen. Die Verwendung des humanen TnnT2-Promotors (-502 bis +42 bp) konnte vor allem die Spezifität von AAV9-Cre deutlich erhöhen. Die bisherigen aufwändigen transgenen Verpaarungsstrategien könnten durch diese ergänzt werden, was zur Verminderung des zeitlichen Aufwandes und der erforderlichen Versuchstierzahlen führen könnte. Darüber hinaus könnte der hTnnT2-Promotor wegen seiner geringen Größe, hoher Expressionsstärke und Spezifität für den Herzmuskel in zukünftigen kardialen Gentherapieansätzen mit AAV-Vektoren beim Menschen eingesetzt werden.