

Regina Huditz

Dr. med.

## **Optimierung des myokardialen Gentransfers im Großtiermodell durch Modifikation von Vektorapplikation und Vektordesign**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Herr PD Dr. med. Philip Raake

Die Gentherapie stellt seit einigen Jahren ein vielversprechendes Forschungsgebiet dar um sowohl hereditäre als auch erworbene Krankheiten auf molekularer Ebene zu therapieren. Dabei stehen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, welche in Deutschland derzeit die häufigsten Todesursachen darstellen, besonders im Fokus. Das fortschreitende Verständnis über die zugrundeliegenden molekularen Pathologien und die Identifizierung neuer therapeutischer Ziele zeigen immer weitere Einsatzmöglichkeiten einer myokardialen Gentherapie im Menschen auf. Während bereits zahlreiche Zielstrukturen definiert und deren therapeutische Wirkung in Kleintierstudien bestätigt werden konnte, bestehen jedoch noch Limitationen bezüglich eines sicheren, effizienten und spezifischen myokardialen Gentransfers in human relevanten Modellen und klinischen Studien. Besonders deutlich wurde dies in den kürzlich veröffentlichten CUPID-Trials. Bei dieser ersten kardialen Gentherapiestudie am Menschen blieb der gewünschte Therapieerfolg trotz potentem Zielgen aufgrund ungenügender Transfektionseffizienz aus. Dies macht die Notwendigkeit deutlich die bisherigen Methoden in einem human relevanten Großtiermodell weiter zu optimieren um die erfolgreiche Translation in die Klinik weiter voran zu bringen.

Der myokardiale Gentransfer kann sowohl über das Vektordesign als auch über die Applikationsart beeinflusst werden. Hierzu wurden in dieser Arbeit zwei Studien durchgeführt um zum einen die Möglichkeit der Optimierung der Vektorapplikation durch Synergismus zweier Verfahren zu überprüfen und zum anderen die Verwendung eines neuen Promoters im Großtiermodell zu evaluieren. Für beide Untersuchungen wurden Adeno-assoziierte-Viren des Serotyp 6 als Vektoren ausgewählt und per koronarvenöser Retroinfusion in das Herz von deutschen Landschweinen appliziert. Nach vier Wochen wurde die Transgenexpression im Myokard und in extrakardialen Organen analysiert und einander gegenübergestellt.

Die Studie zur Modifizierung des Promoters testete erstmals den kürzlich neu beschriebenen humanen TroponinT Promoter im Großtier. Dieser wurde bisher ausschließlich im Kleintiermodell erprobt und zeichnete sich dort durch eine hohe kardiale Spezifität aus. Als Standard diente der CMV-verstärkte Myosin-Leicht-Ketten Promoter, welcher sich in präklinischen Studien mit seiner hohen Effizienz bei gleichzeitiger guter Kardiospezifität bereits bewährte. Als Machbarkeitsstudie konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der TroponinT Promoter auch im klinisch relevanten Großtiermodell funktioniert und soweit bisher beurteilbar bezüglich der kardialen Transgenexpressionshöhe dem bereits etablierten Standardpromoter nicht unterlegen ist. Diese Ergebnisse ebnet somit den Weg für größere Studien um den humanen TroponinT Promoter.

Für die Studie zur Optimierung der Vektorapplikation wurde das Verfahren der koronarvenösen Retroinfusion mit der Ultrasound-targeted Microbubble Destruction (UTMD) kombiniert. Die Retroinfusion gilt als gut etablierte und wenig invasive Methode und konnte bereits in Großtiermodellen gentherapeutische Erfolge verzeichnen. Die UTMD hingegen stellte sich zwar mehrfach in Kleintierstudien als nicht invasive, effizienzsteigernde Methode dar, ob diese im Großtiermodell zu einer Verbesserung des Gentransfers mittels viralen Vektoren führt, war jedoch noch unklar. Die Analyse der Transgenexpression vier Wochen nach Gentransfer zeigte eine signifikante Erhöhung nach kombinierter Vektorapplikation im Vergleich zur alleinigen Durchführung der Retroinfusion. Gleichzeitig wurde die Transgenexpression im extrakardialen Gewebe wie Leber, Niere, Lunge, Milz und Skelettmuskel durch die zusätzlich applizierte UTMD nicht signifikant beeinflusst. Die genauere Evaluation der Transgendistribution über den einzelnen Myokardsegmenten deutete außerdem auf eine akzentuierte Transgenexpression in den hauptsächlich UTMD-fokussierten Regionen und somit auf eine spezifische lokale Verstärkung des Gentransfers hin. Damit reihen sich die Ergebnisse dieser Studie in die Beobachtungen der vorausgehenden Kleintierstudien ein. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die UTMD zum einen auch mit viralen Vektoren und zum anderen in Kombination mit der Retroinfusion im Großtier zu einer Verbesserung des myokardialen Gentransfers führt. Dies könnte zukünftig zu einer spezifischen Methode führen um einen gezielteren lokal-fokussierten Gentransfer in ausgewählte Myokardbereiche wie u.a. in hypokinetische Segmente oder Narbengewebe zu ermöglichen. Besonderen Nutzen könnte dies bei lokalen Wandbewegungsstörungen, hibernierenden Myokardarealen oder in der Rhythmologie zeigen.

Unter den bisherigen Ergebnissen stellte sich der Gentransfer in beiden Studien als sicher und praktikabel dar. Weder klinisch noch echokardiografisch konnten negative Auswirkungen auf die Tiere der Versuchsgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen verzeichnet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt somit in einem klinisch relevanten Großtiermodell zwei neuartige Ansätze auf um den myokardialen Gentransfer über die Vektorapplikation und über die Regulation der Transgentranskription weiter zu optimieren und dient als Grundlage für weitere Studien mit Übertragung in therapeutische Modelle.