

Paul Ammann
Dr. med.

The Role of the Retinoblastoma Protein in the Heart at Baseline and in Response to Pressure Overload

Fach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Stefan Hardt

Das Retinoblastomprotein pRb ist ein universeller Regulator des Zellzyklus in Säugetieren und ist an der Regulierung von vielen biologischen Funktionen wie Apoptose, Zellwachstum und Differenzierung beteiligt. Wenn pRb durch Cyclin-/CDK-Komplexe phosphoryliert wird, löst es sich vom Transkriptionsfaktor E2F-1, welcher nun die Transkription vorantreiben kann.

Bis heute ist die Funktion von pRb im Herzen nicht ausreichend verstanden. In Herzpräparaten von Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz konnte gezeigt werden, dass pRb sich in einen phosphorylierten Zustand befindet. Dies deutet darauf hin, dass der pRb/E2F-Signalweg in der Entstehung der pathologischen Veränderungen eine Rolle spielt. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von pRb im Herzen besser zu verstehen. Dies könnte auch in der Zukunft klinische Konsequenzen haben.

Im ersten Experiment zeigte sich in Wildtyp-Mäusen, die vier Wochen Drucküberlastung erhielten (erzielt durch „transverse aortic constriction“), ein signifikanter Anstieg von phosphoryliertem pRb an S780. Dieser Vorgang wurde in der Literatur bereits als Folge der Phosphorylierung durch Cyclin D/CDK4 in vitro beschrieben, welcher zur Loslösung von E2F-1 führt.

Um die Rolle von pRb im Herzen genauer zu untersuchen, wurden herzspezifische pRb Knockout-Mäuse mit Hilfe des Cre-loxP Systems generiert. Unter Ausgangsbedingungen zeigten diese Mäuse eine Erhöhung des Gesamtherzgewichts, des Gewichts des linken Ventrikels, sowie des Lungengewichts. Biochemisch konnte eine Erhöhung der Fibroserate und der Zellgröße sowie eine erhöhte Expression von Ki-67 und phospho-histone H3, beides Zellmarker für Proliferation, gezeigt werden. Des Weiteren war die Apoptoserate signifikant gesteigert, welche durch TUNEL-Färbung und der Messung von gespaltenen (aktivierter) Caspase 3 bestimmt werden konnte. Die Mäuse zeigten außerdem eine Abnahme der Herzfunktion (verminderte Ejektionsfraktion) und einen Anstieg in der Ventrikelgröße.

Um ein tieferes Verständnis für die Vorgänge zu bekommen, die zu den beobachteten Veränderung in den Knockout-Mäusen geführt haben, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt und diese mit IPA[®] und „DAVID analysis“ untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten eine signifikante Steigerung in der Expression von 38 E2F-1-Zielgenen, was dafür spricht, dass die Aktivität von E2F-1 in diesen Mäusen erhöht war.

Weiterhin waren Zellprozesse wie p53-vermittelte Signalwege, Zellzyklusprozesse und DNA-Replikationsprozesse angereichert. p107, ein weiteres Mitglied aus der „pocket protein“-Familie, war in den Knockout-Mäusen signifikant höher exprimiert und könnte für die partielle Kompensation des pRb-Verlustes verantwortlich sein. Die nachfolgend durchgeführte Elektronenmikroskopie zeigte die Ablösung von Zellen untereinander und deutliche Zeichen der

Apoptose, wie Pyknose, Membran-Blebbing und Schrumpfung. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der pRb Knockout zu einer Aktivierung von Apoptose führt.

Mit dem Ziel den Phänotyp weiter hervorzuheben und um ein Verständnis für die Effekte des pRb Knockouts unter Stress zu entwickeln, wurde eine „transverse aortic constriction“ in 3-5 Monate alten Mäusen durchgeführt, welche vier Wochen nach dem Eingriff untersucht wurden. Nach vier Wochen Drucküberlastung zeigten die Knockout-Mäuse ein noch stärker erhöhtes Herzgewicht, linksventrikuläres Gewicht, sowie Lungengewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Echokardiographie zeigte sich eine starke Verminderung der Funktion des linken Ventrikels, nachgewiesen durch eine stark eingeschränkte Ejektionsfraktion (Abnahme der Ejektionsfraktion um 45,3 %) sowie durch einen eingeschränkten systolischen Druck im linken Ventrikel. Zusätzlich waren die Fibroserate, die Zellgröße und Apoptoserate deutlich erhöht. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Mäuse zeigte viele Zellen mit Zeichen der Apoptose, wie auch mit einer zerstörten Sarkomerstruktur. Dies verdeutlicht nochmals den beträchtlichen Schaden der Kardiomyozyten.

Um diese Untersuchungsergebnisse weiter zu festigen, wurde ein pRb-Knockdown-Virus generiert um das pRb in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* auszuschalten. Die mit dem Virus behandelten Kardiomyozyten zeigten einen Anstieg der Zellgröße, der Expression von Ki-67 und phospho-histone H3 sowie eine höhere Anzahl von TUNEL-positiven Zellen und höhere Level von aktivierter Caspase-3. Die hiermit gewonnenen *in vitro* Ergebnisse unterstützen die *in vivo* Experimente.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der Knockout von pRb in Kardiomyozyten *in vivo* zu Hypertrophie, Fibrose, Apoptose, kardialer Dysfunktion und zur Expression von Proliferationsmarkern führt, insbesondere nach Drucküberlastung. Entsprechende Ergebnisse wurden durch *in vitro* - Experimente in neonatalen Kardiomyozyten bestätigt. pRb zeigte sich als bedeutungsvoll für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion und –struktur von Kardiomyozyten.

Da eine Inaktivierung des pRbs sowohl als Folge einer chronischen Drucküberlastung, als auch in Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz funktionell auftritt, könnten pharmakologische Interventionen, welche den pRb/E2F- Signalweg beeinflussen, in der Zukunft eine nützliche therapeutische Intervention darstellen.