

Dominic Mathias Schwab

Dr. med.

## **Untersuchungen zur gentherapeutischen Modulation des Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 in murinen Herzinsuffizienzmodellen**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Oliver J. Müller

Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems sind in Deutschland immer noch die häufigste Todesursache. Insbesondere die Herzinsuffizienz als Folge einer Vielzahl von Grunderkrankungen gilt allgemein als eine Erkrankung mit sehr schlechter Prognose. Eine zentrale Intervention in der Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz stellt die Blockade von myokardialen  $\beta$ -Adrenozeptoren durch  $\beta$ -Blocker dar. Aus klinischer und pathophysiologischer Sicht ist die Blockade aller  $\beta$ -adrenerg-vermittelten Effekte jedoch nicht immer sinnvoll bzw. erwünscht. Dies impliziert Therapieprinzipien zu entwickeln, die ihren primären Angriffspunkt im Kardiomyozyten selbst haben und dort die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade spezifischer modulieren.

Ein Charakteristikum des insuffizienten Myokards ist eine gestörte Calcium-Homöostase, die auf Imbalancen im Phosphorylierungsstatus sowie auf Veränderungen des Expressionsmusters subzellulärer Schlüsselproteine zurückzuführen ist. Der Phosphatase-Inhibitor-1 (I-1) ist ein positiver und distal-fungierender Modulator der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade, der nach PKA-abhängiger Phosphorylierung an Threonin 35 die kardial dominierende Protein-Phosphatase-1 (PP1) potent und selektiv hemmt. PKA-aktivierter I-1 vermittelt seine Effekte präferenziell am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch spezifische Regulation der PKA- (PLB Ser16) und CaMKII- (RyR2 Ser2814) abhängigen Phosphorylierungsstellen. Die Rolle des I-1 in der Herzinsuffizienz wird bis heute kontrovers diskutiert. Bisherige tierexperimentelle Studien legen nahe, dass sowohl die Überexpression einer konstitutiv aktiven I-1-Form (I-1c) als auch eine Hemmung von I-1 im Sinne einer „distalen  $\beta$ -Blockade“ einen günstigen Einfluss auf die Krankheitsprogression haben kann und spezifischer den pathologischen Aspekten einer Herzinsuffizienz entgegenwirken könnte. Bisher ist eine pharmakologische Beeinflussung des I-1 durch niedermolekulare Substanzen nicht möglich, weshalb in dieser Arbeit ein gentherapeutischer Ansatz mittels Adeno-assoziiertes Virus-Vektoren verfolgt wurde, wie er auch tatsächlich in der humanen Herzinsuffizienz praktikierbar wäre. Anhand zweier Hauptstudien wurde untersucht, welche Konsequenzen eine akute herzspezifische I-1c-Überexpression im Kontext einer druckinduzierten Herzinsuffizienz (TAC) der Maus hat und wie sich eine Langzeit-I-1-Abschaltung auf Basis der RNA-Interferenz in einem Mausmodell genetisch bedingter Kardiomyopathie (DMD<sup>mdx</sup>-Linie) auswirkt.

Die herzspezifische Expression der konstitutiv aktiven I-1-Mutante (I-1c) mittels AAV9-hTnnT-I-1c-Vektoren führte *in vivo* unter basalen Bedingungen zu einem hyperkontraktilen Phänotyp, ohne die basale Herzfrequenz zu beeinflussen. Auf molekularer Ebene zeigten die Herzen eine Hyperphosphorylierung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Inhibitors PLB an Ser16, welche mechanistisch den hyperkontraktilen Phänotyp erklären könnte. Im murinen druckinduzierten Herzinsuffizienzmodell (TAC) verstärkte die I-1c-Expression überraschend die kardiale Dysfunktion, Hypertrophie und Fibrose signifikant. Dieser Effekt zeichnete sich bereits eine Woche nach Gentransfer ab und setzte sich im zeitlichen Verlauf über die gesamte Beobachtungsdauer von 4 Wochen fort. Die Herzen zeigten auf Proteinebene weiterhin eine gesteigerte PLB-P Serin 16 Phosphorylierung sowie Hinweise auf eine verstärkte myokardiale Apoptose.

Der *in vivo*-Gentransfer des shRNA-exprimierenden Vektors AAV9-H1-I-1 zur I-1-Herunterregulation führte in gesunden Wildtyp-Mäusen zu einer Verminderung des kardialen I-1 mRNA-Levels um ca. 20% sowie zu einer Verminderung der PLB-P Serin 16 Phosphorylierung um 35%. Aufgrund der geringen Fallzahl waren diese Veränderungen statistisch nicht signifikant. Mit der Anwendung einer höheren Vektordosis konnte in Dystrophin-defizienten Mäusen (DMD<sup>mdx</sup>-Linie) eine Reduktion des kardialen I-1 mRNA-Levels um 45% erzielt werden. Die funktionelle echokardiographische Analyse dieser Mäuse zeigte eine Desensibilisierung gegenüber  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Dobutamin im Sinne einer „distalen intrazellulären  $\beta$ -Blockade“, wohingegen die basale und maximale Herzfrequenz davon unbeeinflusst blieb. Diese Beobachtungen decken sich gut mit den Befunden aus I-1-*Knockout*-Mäusen. Interessanterweise resultierte die shRNA-induzierte I-1-Langzeitrepression im Modell der Muskeldystrophie 11 Monate nach Gentransfer in einer unerwarteten diastolischen Dysfunktion und Hypertrophie und konnte die Zunahme des pathologischen Phänotyps nicht verhindern. Als Alternative zu RNA-Interferenz-basierten Ansätzen führte die AAV9-vermittelte Expression eines inhibitorischen, an EGFP fusionierten Nonapeptids (anti-I-1) durch eine kompetitive PP1/I-1-Interaktionshemmung zu einer attenuierten Kontraktilität nach Dobutamin-Stimulation, ohne Einfluss auf die basale Kontraktilität oder die Herzfrequenz zu nehmen. Dies ging mit einer Hypophosphorylierung von PLB-P Ser16 einher. Des Weiteren zeigten die AAV9-anti-I-1/EGFP-Vektoren eine hohe kardiale Transduktionseffizienz *in vivo*.

Für den Erfolg einer gentherapeutischen I-1-Modulation scheint das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren, wie etwa das Krankheitsmodell, der Zeitpunkt der gentherapeutischen Intervention und die Vektordosis maßgeblich zu sein. Weitere Kenntnisse über die optimale Intensität, Dauer und den richtigen Zeitpunkt einer I-1-basierten Verstärkung bzw. Abschwächung der cAMP/PKA-Achse könnte den Weg für die Entwicklung klinisch anwendbarer Ansätze zur therapeutischen Modulation dieser vielversprechenden Zielstruktur ebnen.