Adrian Christoph Serafin

Dr. med.

Pharmakologische Inhibition des mTOR-Signalwegs am Ischämie-Reperfusion-Modell des Herzens

Fach/ Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Dr. med. Mirko Völkers

Trotz verbesserter und beschleunigter Therapie der akuten Myokardischämie ist der durch die perkutane Koronarintervention mitverursachte Reperfusionsschaden am Myokardinfarkt noch ein relevantes und weitgehend ungelöstes Problem.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der Translationshemmung auf den kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell zu untersuchen. Während der Reperfusion wird der für die Initiation der Translation entscheidende Signalkomplex mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) stark aktiviert. Aufgrund der dadurch verstärkten Proteinbiosynthese erhöht sich der ATP-Verbrauch und die nötige Faltung dieser Proteine erhöht den Stress auf das Endoplasmatische Reticulum. Unter anderem über diesen Mechanismus kommt es zur Apoptose von Kardiomyozyten. Außerdem kann mTORC1 Autophagie inhibieren und über die verstärkte Translation von Zytokinen ebenfalls Einfluss auf die Entzündungsreaktion nach Ischämie-Reperfusion nehmen. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von mTORC1 auf die ATP-Konzentration, Proteinfehlfaltung, Autophagie, Apoptose und Inflammation während Ischämie und Reperfusion untersucht.

Die ATP-Konzentration sinkt nach simulierter Ischämie mit Schrittmachertherapie in NRCM und ist auch nach Reperfusion weiter erniedrigt. Auch *in vivo* konnte eine Reduktion der ATP-Konzentration nach Ischämie-Reperfusionsoption (I/R OP) festgestellt werden. Durch die Therapie mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin oder dem eIF4E/eIF4G Interaktionsinhibitor 4EGI-1 kam es zu gegensätzlichen Ergebnissen. Während *in vitro* Rapamycin keinen Einfluss auf die ATP-Konzentration nach I/R hatte und 4EGI-1 zu einer Reduktion der ATP-Konzentration führte, kam es *in vivo* durch die Therapie mit Rapamycin zu einer leichten Reduktion der ATP-Konzentration und die Therapie mit 4EGI-1 während der Reperfusion hatte keinen Einfluss darauf.

Die Proteinfehlfaltung wurde durch die Bestimmung des ER-Stresses über die Quantifizierung der GRP78 Expression untersucht. Dabei zeigte sich keine Erhöhung des ER-Stresses infolge von I/R *in vitro* und *in vivo*. Außerdem wurden Präamyloidoligomere mittels A11 *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte Konzentration nach Ischämie und Reperfusion *in vitro*. Sowohl durch Rapamycin, als auch durch 4EGI-1 kam es dabei zu einer leichten Reduktion dieser Präamyloidoligomere *in vitro*. *In vivo* wurden unlösliche Proteinaggregate analysiert. Dabei zeigte sich ein leichter Anstieg der Proteinaggregate drei Stunden nach Ischämie. Durch die Therapie mit 4EGI-1, nicht jedoch durch Rapamycin, reduzierte sich die Konzentration unlöslicher Proteinaggregate auch 28 Stunden nach I/R OP.

Die inflammatorische Antwort nach I/R wurde mittels FACS und qPCR nach I/R OP analysiert. Durch FACS konnte eine starke Infiltration von Leukozyten in das Herz nach I/R OP nachgewiesen werden.

Durch die Therapie mit Rapamycin oder 4EGI-1 kam es dabei zu einer leichten Reduktion der Leukozytenzahl. Dies war hauptsächlich auf eine Reduktion der Makrophagen und der Monozyten zurückzuführen. Auch in der Milz zeigte sich eine leichte Erhöhung der Leukozytenzahl nach Ischämie-Reperfusionsoperation und eine Reduktion der Monozytenanzahl durch eine Therapie mit Rapamycin oder 4EGI-1 während der Reperfusion. Im Knochenmark kam es dagegen zu keiner Änderung der Aktivität hämatopoetischer Stammstellen und zu keiner verstärkten Mitoserate nach I/R OP. Jedoch zeigte sich im peripheren Blut eine erhöhte Konzentration von zirkulierenden Granulozyten und Monozyten durch eine Therapie mit 4EGI-1. Mittels qPCR konnte eine starke Zunahme proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF α) sowie von L-Selectin nach I/R OP nachgewiesen werden. Durch Therapie mit 4EGI-1 konnte eine Reduktion von IL-1 β und TNF α festgestellt werden. Durch Rapamycin war dies nur bei TNF α der Fall. Bei den für die Diapedese von Leukozyten wichtigen Adhäsionsmolekülen L-Selectin, ICAM1, PCAM und VCAM1 kam es hingegen zu keiner veränderten Expression nach I/R OP und Therapie mit Rapamycin oder 4EGI-1 im Vergleich zu lediglich mit Vehikel therapierten Mäusen. Das für die Diapedese von proinflammatorischen Monozyten entscheidende Chemokin CCL2 wurde, ebenso wie dessen Rezeptor CCR2, durch Rapamycin und 4EGI-1 nach I/R OP signifikant gehemmt.

Die Autophagie nach I/R wurde anhand des LC3 II/ LC3 I-Quotienten und p62 untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte p62-Konzentration bei einem gleichzeitig leicht erniedrigten LC3 II/ LC3 I-Quotienten nach I/R-OP. Durch die Therapie mit Rapamycin oder 4EGI-1 kam es zu einer leichten Reduktion des LC3 II/ LC3 I-Quotienten und von p62. Dies könnte auf eine Verbesserung der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen durch die Therapie mit Rapamycin oder 4EGI-1 hindeuten.

Die Apoptose nach I/R OP wurde mittels TUNEL und anschließender Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich nach I/R OP eine starke Zunahme der Apoptoserate. Durch die Therapie mit Rapamycin oder 4EGI-1 kam es dabei ebenfalls zu einer etwa gleich starken Zunahme der Apoptoserate.

Zusammengefasst ergibt sich, dass die Inhibition der Translation nach I/R OP sowohl die Konzentration unlöslicher und toxischer Proteinaggregate als auch die proinflammatorische Immunantwort hemmt. Über diese Mechanismen kann eine Hemmung des mTORC1 zu einer Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens führen. Durch weitere Forschung kann dabei in Zukunft ein vertieftes Verständnis dafür erlangt werden, welche dieser Pathomechanismen eine entscheidende Rolle im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens einnehmen und inwieweit diese auf den Menschen übertragen werden können. Dadurch können neue Therapien entwickelt werden, die das Herz nach Myokardinfarkt und erfolgreicher Reperfusionstherapie vor dieser Schädigung schützen.