

David Clemens Lennermann
Dr. med.

Investigation of sex and gender differences in RNA binding motif protein 20 cardiomyopathy

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Johannes Backs

Hintergrund: RNA binding motif protein 20 (RBM20) hat eine wichtige Rolle als Splicing-Faktor im Herz. Verlust der RBM20-Funktion durch eine Mutation führt zu einer Form der dilatativen Kardiomyopathie, die durch eine reduzierte Herzfunktion, einer Weitung der Ventrikel und dem Auftreten von Arrhythmien gekennzeichnet ist. Nach neuen Erkenntnissen ist diese Kardiomyopathie bei Patienten deutlich schwerer ausgeprägt als bei Patientinnen, aber bisher ist kein möglicher Mechanismus hierfür bekannt.

In dieser Arbeit wird ein Knockout-Mausmodell der *RBM20*-Kardiomyopathie funktionell und auf Zellebene charakterisiert um mögliche Mechanismen für diese geschlechtsabhängigen Unterschiede aufzudecken. Ebenfalls wird eine retroperspektive Analyse von *RBM20*-Kardiomyopathie-Patient*innen aus Deutschland und den Niederlanden durchgeführt, um die vorherigen Berichte zu validieren.

Methoden: Männliche und weibliche Mäuse eines bereits etablierten Knockout-Modells der *RBM20*-Kardiomyopathie sowie Wildtyp-Mäuse wurden untersucht. Es wurde eine Langzeit-Echokardiographie-Untersuchung für über ein Jahr durchgeführt. Um die Suszeptibilität für Arrhythmien zu messen wurden telemetrisch EKGs abgeleitet nachdem durch chemische Injektion Arrhythmien induziert wurden. Ein Zwei-Treffer-Mausmodell wurde etabliert und untersucht, welches einen *Rbm20*-Knockout mit der Induktion von kardialem Stress durch β-Agonisten kombiniert. Eine histologische Untersuchung der Mausherzen auf Fibrose wurde durchgeführt. Das Splicing in Knockout- und Wildtyp-Mausherzen wurde sowohl auf dem RNA-Level durch reverse-Transkriptase quantitative und qualitative Polymerase-Kettenreaktion als auch auf dem Protein-Level durch Western Blotting untersucht. Um Muster in der Veränderung der Genexpression zu entdecken wurde eine RNAseq-Analyse aus Maus-Herz-Geweben durchgeführt. Um Änderungen im Phosphorylierungsmuster aufzudecken wurde eine Phosphoproteomics-Analyse durchgeführt. Zusätzlich wurde eine zweite Mauslinie mit einer *Rbm20*-R636Q-Mutation untersucht, um mögliche zusätzliche funktionelle Veränderungen durch fehlerhaft lokalisiertes *RBM20* aufzudecken.

Ebenfalls wurde eine retrospektive Analyse von Patientendaten von Patient*innen mit *RBM20*-Kardiomyopathie aus Deutschland und den Niederlanden durchgeführt, um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede darzustellen.

Ergebnisse: Wie erwartet zeigten die Knockout-Mäuse einen Phänotyp, der durch eine schlechtere Herzfunktion und eine heruntergesetzte Resistenz gegenüber Arrhythmien gekennzeichnet war. Auf Zellebene war das Splicing von wichtigen kardialen Proteinen deutlich verändert und die Genexpression einer Großzahl von kardialen Genen war ebenfalls deutlich verändert. Es zeigten sich auch deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp. Kardiale Fibrose war nur geringfügig vorhanden. Allerdings zeigten sich nur minimale funktionelle Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Knockout-Mäusen. Zwar gab es deutliche Unterschiede in Bezug auf Genexpression und Phosphoryierungsmuster, diese schienen aber nicht zu relevanten Unterschieden in der Herzfunktion zu führen.

Auch das hinzufügen von kardialem Stress führte nicht zur Demaskierung von funktionalen geschlechtsspezifischen Unterschieden. Die R636Q-Mäuse zeigten ähnliche (aber etwas stärker ausgeprägte) Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp, hatten aber auch keine relevanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen.

Im Gegensatz zu der zuvor publizierten Studie zeigte sich in der hier untersuchten Patientenkohorte kein Unterschied zwischen Patienten und Patientinnen in Bezug auf Herzfunktion, der Prävalenz von Arrhythmien oder dem Zeitalter der Erstdiagnose.

Diskussion und Schlussfolgerungen: Zwei Mausmodelle und eine Patientenkohorte der *RBM20*-Kardiomyopathie zeigten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Schwere der Krankheit. Die zuvor beobachteten Unterschiede in Patient*innen aus Dänemark könnten auf Störfaktoren zurückgehen, die spezifisch zu diesen Patient*innen waren, und nicht eine inhärente Eigenschaft der Kardiomyopathie sein. Beispielsweise könnten nur spezifische Mutationen mit einer schlechteren Prognose in männlichen Patient*innen verbunden sein, was mit der neuen Erkenntnis, dass die Fehllokalisierung von defektem *RBM20* bei manchen Mutationen zur Bildung von pathomechanisch relevanten RNA-Granula führt, zusammenhängen könnte. Tiermodelle, die diesen Prozess besser wiederspiegeln, könnten für die weitere Forschung relevanter sein.

Außerdem stellt diese Arbeit erstmals Veränderungen im Phosphorylierungsstatus als Teil des Pathomechanismus der *RBM20*-Kardiomyopathie dar.