

Uusia lääkevaikutuskohteita ja geneettisiä ennustetekijöitä iskeemisten sydänsairauksien hoitoon

Juho Heliste, LL

tohtorikoulutettava, Turun yliopisto, Lääketieteellinen biokemia ja genetiikka; Helsingin yliopisto, Suomen molekyyllilääketieteen instituutti

Tiivistelmä

Sepelvaltimotauti on edelleen johtava kuolinsyy länsimaissa (1), huolimatta merkittävistä edistysaskeleista etenkin akuutin iskemian hoidossa. Sydämen suojaaminen iskemian aiheuttamilta vaurioilta ja sydämen regeneraation aktivoiminen vajaatoiminnan estämiseksi ovat lupaavia terapeuttisia alueita, joiden hyödyntämiseen etsitään uusia lääkevaikutuskohteita. Sydäninfarktin reperfuusiohoitoon liittyvä iskemia-reperfuusiovaurio pahentaa osaltaan jo syntynyttä sydänvauriota useilla mekanismeilla, ja sen estämiseksi on kokeiltu erilaisia lääkkeellisiä hoitomuotoja ja lisäksi mm. terapeuttista hypotermiaa (2). Sydänlihaksen uusiutumiskyvystä ja arpeutumisen estämisestä lääkkeellisesti ja soluhoidojen avulla on paljon näyttöä eläinmalleissa, esimerkiksi hiirissä ja seeprakalassa (3). Näiden uusien hoitomuotojen translaatio kliiniseen käyttöön on vielä kokeiluvaiheessa.

Etsin omassa väitöskirjatyössäni erilaisilla seulontamenetelmillä uusia lääkevaikutuskohteita ja geneettisiä ennustetekijöitä iskeemisen sydänvaurion ja sydämen vajaatoiminnan hoitoon. Osa käyttämästäni menetelmistä on prekliinisiä ja solumallipohjaisia, ja siksi kliinistä merkitsevyyttä löydöksille haetaan myös potilasaineistoista.

Reseptorityrosiinikinaasit: lupaava joukko sydäniskemian ja vajaatoiminnan lääkehoidon kohteiksi

Reseptorityrosiinikinaasit ovat solun pinnalla toimivia reseptoreita, jotka vaikuttavat solujen elossapysymiseen, proliferaatioon ja migraatioon. Perheeseen kuuluu 55 jäsentä, joista osa on välttämättömiä sydämen kehityksen kannalta ja joidenkin RTK:ien aktivaatiolla on osoitettu olevan iskemialta suojaavaa ja sydämen regeneraatiota parantavaa vaikutusta. ERBB2- eli HER2-reseptorin geenin poistaminen hiiressä aiheuttaa häiriöitä sydämen trabekulaatiossa ja hiiret kuolevat jo sikiövaiheessa (4). ERBB2:n blokkaminen rintasyövän hoidossa trastuzumabi-vasta-aineella aiheuttaa toksisia sydänvaurioita (5), mikä on myös selvä osoitus reseptorin tärkeästä roolista sydämen kannalta. Samankaltainen letaali, trabekulaation häiriöitä aiheuttava hiiren sydänfenotyyppi

liittyy *ErbB4*-geenin poistoon (6). Aktiivisen ERBB2:n induktio sydämessä aiheuttaa hiirellä iskemian jälkeistä sydämen regeneraatiota (7), ja ERBB4:n aktivaatio sen ligandilla, neureguliini 1:llä, pienentää infarktiarpea hiiressä (8) ja rotassa (9). ROR2-reseptorin geenin poisto aiheuttaa hiirellä sydämen kammioväliseinän aukon ja on postnataalisesti letaali (10). *Ror1/Ror2*-yhdistelmäpoistogeenisessä hiiressä sydänfenotyypin kuuluu lisäksi suurten suonten transpositio (11).

RTK-perheen jäseniä on tutkittu kliinisesti sydämen vajaatoiminnan ja iskemian hoitokohteina. Vuonna 2010 julkaistiin kliininen faasin II tutkimus, jossa tutkittiin neureguliini 1:tä sydämen vajaatoiminnan hoitona (12). Ejektiofraktio ja sydämen kammiokoko paranivat neureguliini-hoidettujen ryhmässä, mutta muutokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (12). Tutkimuksessa käytettiin rekombinanttia neureguliiniproteiinia, joka vastasi tiettyä neureguliinin alayksikköä. Tuoreemmassa, vuonna 2016 julkaistussa faasin I kliininessä tutkimuksessa, käytettiin kokopitkää neureguliini 1 β 3-proteiinia (13). Tässä tutkimuksessa ejektiofraktio nousi 9 %-yksikköä korkeimmalla neureguliiniannoksella hoidettujen ryhmässä 28 päivää hoidon jälkeen. Ero oli tilastollisesti merkitsevä verrattuna plaseboryhmään (13). Tässä tutkimuksessa 73 %:lla tutkituista vajaatoiminta oli iskemiasta johtuvaa.

Akuutin iskemia-reperfuusioaurion hoitomuotona on tutkittu insuliinireseptorin – myös RTK-perheen jäsen – aktivoimista glukoosi-insuliini-kaliuminfuusiolla (GIK). Kliinisessä IMMEDIATE-tutkimuksessa GIK-hoidetuilla ST-nousuinfarktipotilailla havaittiin vuoden seurannassa merkitsevä lasku sydänpysähdysten, vajaatoiminnan ja sydänperäisen kuolleisuuden ilmaantuvuudessa (14). Koko hoitokohortissa, joka sisälsi muitakin kuin ST-nousuinfarktipotilaita, merkitseviä tuloksia ei havaittu (14).

Oman väitöskirjani ensimmäisessä osatyössä olen tutkinut koko RTK-perheen reseptorien säätelyä iskeemisessä sydämessä. Aineistona käytimme IST Online -tietokannan geeniekspressiodataa terveiden ja iskeemisten ihmissydänten näytteistä. Lisäksi käytimme kokeellisia iskemia-reperfuusionäytteitä sian sydäimestä, joista tutkittiin RTK:ien fosforylaatiotasoja. Näistä seulonnoista valitsimme yhden merkittävimmin säädellyistä ja aktiivisista reseptoreista, ROR1:n, jota tutkimme tarkemmin vielä kardiomyosyytimalleissa. Havaitimme, että ROR1:n poistaminen sydänsoluista siRNA-tekniikalla parantaa solujen elossa pysymistä, sekä normaalissa happipitoisuudessa että hypoksia-reoksygenaatioasetelmassa, joka toimii iskemia-reperfuusioaurion mallina. Puolestaan ROR1:n aktivaatio sen Wnt-5a-ligandilla heikensi solujen elossa pysymistä. ROR1 on havaintojemme mukaan mahdollinen iskeemisen sydänvaurion lääkehoitokohde. Tuloksia ei ole vielä julkaistu.

Lääke- ja geenipohjaiset seulontamenetelmät sydänsairauksissa

Lääkekirjastoseulonnat ovat tehokas tapa etsiä uusia kohteita täsmähoidoille. Kirjastoseulonnat tehdään pääasiassa soluilla, jotka altistetaan sadoille tai jopa tuhansille lääkemolekyyleille. Kokeilluista molekyyleistä tarkempiin jatkotutkimuksiin valitaan ne, jotka aiheuttivat seulonnassa merkittävimmän vasteen esimerkiksi solujen elossapysymiseen tai sydänsolujen tapauksessa supistuvuuteen. Tätä lähestymistapaa on käytetty paljon syöpätutkimuksessa, ja enenevästi myös sydänsolumalleissa. Esimerkiksi tyrosiinikinaasi-inhibiittori- eli TKI-lääkkeiden kardiotoksisuutta on seulottu ihmisen indusoiduista pluripotentista kantasoluista erilaistettujen kardiomyosyyttien avulla (15). Kardioprotektiivisia, iskemia-reperfuusioaurion hoitoon soveltuvia lääkkeitä on aiemmin seulottu rotan H9c2-kardiomyoblastisolulinjan avulla (16). Tutkimuksessa validoitiin tarkemmin viisi parhaan seulontatuloksen saanutta lääkettä, joista yksi oli kloksikiini (cloxyquin). Kloksikiinin osoitettiin myöhemmässä tutkimuksessa aiheuttavan kardiomyosyyteissä autofagiaa, joka toimii kardioprotektiivisena tekijänä (17). Kloksikiinihoidetuilla hiirillä kokeellisen sydäninfarktiarven koko pieneni noin puolella verrattuna kontrolliryhmään (17). Näistä tuloksista on kuitenkin luonnollisesti vielä pitkä matka kloksikiinin mahdolliseen kliiniseen käyttöön.

Lääkeainepohjaisen lähestymistavan lisäksi lääkehoidon kohteeksi sopivia proteiineja voidaan seuloa myös sammuttamalla niitä koodaavia geenejä. Tässä ns. target-based-seulonnassa solupopulaatiossa hiljennetään tuhansia geenejä RNA-interferenssi- tai CRISPR-tekniikalla, ja tunnistetaan ne geenit, joiden hiljentäminen muuttaa solujen elossapysymistä tai muuta mitattavaa vastetta merkittävimmin. RNA-interferenssiin perustuvia short hairpin RNA (shRNA) -kirjastoseulontoja on käytetty seulottaessa syövän lääkevaikutuskohteita (18), mutta sydäntutkimuksen alueelta ei tiettävästi vielä ole julkaisuja tämän tekniikan käytöstä.

Väitöskirjaprojektini toisessa osatyössä yhdistin kaksi edellä kuvatun kaltaista kardiomyosyyteillä tehtyä seulontaa (kuva 1). Käytimme seulonnoissa hiiren HL-1-kardiomyosyyttisoluja, joihin vietiin shRNA-seulonnassa viruksen avulla shRNA-kirjasto, joka targetoi 4625 geeniä. Solut altistettiin iskemia-reperfuusioaurion mallina hypoksia-reoksygenaatiokäsittelylle tai kasvatettiin kontrolleina normaalissa happipitoisuudessa. Tämän jälkeen solupopulaatiosta tunnistettiin sekvensoimalla hapenpuutteen vaikutuksesta suhteellisesti rikastuneet tai hävinneet shRNA:t – tai pikemminkin geenit, joita ne hiljensivät. Toisessa seulonnassa saman solulinjan soluja altistettiin 694 eri lääkeaineelle, samoin hypoksia-reoksygenaatioasetelmassa. Lääkevaikutus mitattiin solujen elossa pysymistä kuvaavalla viabiliteettimittauksella. Näiden kahden seulonnan tulokset yhdistettiin bioinformaatiotekniikalla. Ne kohdemolekyylit ja signaalintireitit, jotka nousevat esiin molemmissa seulonnoissa, ovat oletettavasti

merkittäviä sydänsolujen selviytymiselle. Näin voidaan tunnistaa iskeemisen sydänvaurion kannalta hyödyllisiä ja haitallisia lääkkeitä ja lääkevaikutuskohteita.

Geenivariantit iskemiasta johtuvan sydämen vajaatoiminnan altisteena

Sydämen vajaatoiminta on monitekijäinen sairaus, ja noin 20–30 % sen kokonaisriskistä on periytyvää (19,20). Suvuttain periytyvissä vajaatoimintasyndroomissa periytyminen on useimmiten monogeenistä. Hypertrofisissa kardiomyopatiasyndroomissa MYH7-geenin (myosiinin raskas ketju 7) ja MYBPC3-geenin (myosiinia sitova proteiini C3) mutaatiot selittävät valtaosan tapauksista (19). Dilatoivassa kardiomyopatiassa selvä selittävä geenitausta tunnetaan noin 40 %:ssa tapauksista (20).

Sporadisen sydämen vajaatoiminnan osalta periytyminen on monitekijäistä, eli yksittäiset geenivariantit vaikuttavat kokonaisriskiin vain hieman. Vaihtelevaa näyttöä on mm. adrenergisten reseptorien varianttien vaikutuksesta vajaatoiminnan ennusteeseen ja betasalpaajavasteeseen (21,22) sekä reniini-angiotensiini-aldosteronijärjestelmän geenivarianttien vaikutuksesta ACE-estäjien toimintaan ja vajaatoiminta-alttiuteen (22). Erityisesti iskeemiseen sydämen vajaatoimintaan liittyviä variantteja on tutkittu toistaiseksi suhteellisen vähän. IL-4-geenin (interleukiini 4) tietyt variantit assosioituvat iskeemisen vajaatoiminnan riskiin joko suojaavasti tai altistavasti (23). Toinen esimerkki on CLCNKA-geenin (jänniteohjattu kloridikanava K(a)) variantti, jolla on yhteys sekä iskeemisen että ei-iskeemisen vajaatoiminnan riskiin (24).

Omassa työssäni tutkimme Terveiden ja Hyvinvoinnin Laitoksen FINRISKI-potilasaineiston genotyyppatuista potilaista geneettisiä variantteja, jotka liittyvät juuri iskeemisen vajaatoiminnan syntyyn. Kyseessä on kandidaattigeenitutkimus, jossa ei välttämättä saavuteta genomilaajuisten assosiaatiotutkimusten tilastollista merkitsevyytensä, mutta löydökset validoidaan funktionaalisesti solu- ja eläinmalleissa. Tarkoituksena on muokata CRISPR-geenieditointimenetelmällä potilasaineistosta löydetyt geenivariantit sydänsolulinjaan, ja selvittää, aiheuttavatko variantit soluissa sarkomeerin organisoitumisen muutoksia tai heikompaa hapenpuutteen sietokykyä. Kyseiset kandidaattigeenit validoidaan myös seeprakalamallissa.

Lopuksi

Prekliiniset solu- ja eläinmallit ovat välttämättömiä uusia lääkevaikutuskohteita ja hoitomuotoja tutkittaessa. Geenieditointi- ja sekvensointitekniikoiden halventuessa ja kantasoluista indusoidujen sydänsolumallien yleistyessä iskeemisten sydänsairauksien hoitokohteiden ja altistavien markkereiden seulonta tehostuu jatkuvasti. Iskeemistä sydäntä suojaavia ja regeneraatiota edistäviä hoitoja on pitkään povattu ja odotettu kliiniseen käyttöön, mutta moni kokeiltu hoitomuoto on jäänyt

tehottomaksi. Hoitokohteiden seulonta nykyisillä tehokkailla menetelmillä tuo mahdollisuuksia uusiin terapeuttisiin avauksiin.

Sidonnaisuudet

Juho Heliste: Luentopalkkio (Farmasian oppimiskeskus, Suomalainen Lääkäriseura Duodecim), osakkeet/optiot (Abomics Oy), työsuhde/luottamustoimi (Abomics Oy, Mediradix Oy, Mehiläinen Oy), apuraha (Suomen Kardiologinen seura, Suomen Kulttuurirahaston Varsinais-Suomen rahasto, Paulon Säätiö, Turun yliopisto)

Kuvatekstit

Kuva 1. Iskeemisen sydänsairauden lääkevaikutuskohteiden seulonta kahdella eri tekniikalla.

A) Kardiomyosyyttipopulaatioon transfektoidaan tuhansia geenejä hiljentävä shRNA-kirjasto. Solut altistetaan hypoksia-reoksygenaatiolle (H/R), mikä toimii iskemia-reperfuusioaurion mallina, tai kasvatetaan kontrolleina normaalissa happipitoisuudessa. Käsittelyjen jälkeen populaatiosta tunnistetaan sekvensoimalla, mitä geenejä hiljentävät shRNA:t rikastuivat tai hävisivät H/R-käsittelyssä. Näin löydetään hypoksiavasteita merkittävimmin sääteleviä geenejä. B) Lääkevaikutuskohteita voidaan seuloa myös testaamalla satoja lääkeaineita kerrallaan kardiomyosyyttiviljelmässä. Iskemialle spesifejä kardioprotektiivisia – tai haitallisia – vasteita voidaan hakea käyttämällä seulonnassa H/R-altistusta. Merkittävimmät lääkevasteet mitataan solujen elossa pysymisen avulla. C) Molempien seulontojen tulokset voidaan yhdistää nk. pathway-analyysin avulla, ja näin löytyneet merkittävimmät lääkevaikutuskohteet ja solusignaalintireitit valitaan tarkempaan jatkotutkimukseen.

Viitteet

1. Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Geneva, World Health Organization; 2016.
2. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. 2013;123(1):92–100.
3. Cahill TJ, Choudhury RP, Riley PR. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: Translational opportunities for novel therapeutics. Nat Rev Drug Discov. Nature Publishing Group; 2017;16(10):699–717.
4. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. Nature. 1995;378:394–8.
5. Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. Cancer. 2002;95(7):1592–600.

6. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*. 1995;378(6555):390–4.
7. D’Uva G, Aharonov A, Lauriola M, Kain D, Yahalom-Ronen Y, Carvalho S, et al. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat Cell Biol*. 2015;17(5).
8. Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*. Elsevier; 23/07/2009;138(2):257–70.
9. Liu X, Gu X, Li Z, Li X, Li H, Chang J, et al. Neuregulin-1/erbB-Activation Improves Cardiac Function and Survival in Models of Ischemic, Dilated, and Viral Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(7):1438–47.
10. Takeuchi S, Takeda K, Oishi I, Nomi M, Ikeya M, Itoh K, et al. Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes to Cells*. 2000;5:71–8.
11. Nomi M, Oishi I, Kani S, Suzuki H, Matsuda T, Yoda A, et al. Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*. 2001;21(24):8329–35.
12. Gao R, Zhang J, Cheng L, Wu X, Dong W, Yang X, et al. A phase II, randomized, double-blind, multicenter, based on standard therapy, placebo-controlled study of the efficacy and safety of recombinant human neuregulin-1 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(18):1907–14.
13. Lenihan DJ, Anderson SA, Lenneman CG, Brittain E, Muldowney JAS, Mendes L, et al. A Phase I, Single Ascending Dose Study of Cimaglermin Alfa (Neuregulin 1 β 3) in Patients With Systolic Dysfunction and Heart Failure. *JACC Basic to Transl Sci*. 2016;1(7):576–86.
14. Selker HP, Udelson JE, Massaro JM, Ruthazer R, D’Agostino RB, Griffith JL, et al. One-year outcomes of out-of-hospital administration of intravenous glucose, insulin, and potassium (GIK) in patients with suspected acute coronary syndromes (from the IMMEDIATE Trial). *Am J Cardiol*. 2014;113(10):1599–605.
15. Sharma A, Burridge PW, McKeithan WL, Serrano R, Shukla P, Sayed N, et al. High-Throughput Screening of Tyrosine Kinase Inhibitor Cardiotoxicity with Human Induced Pluripotent Stem Cells. 2017;9(377).
16. Guo S, Olm-Shipman A, Walters A, Urciuoli WR, Devito S, Nadtochiy SM, et al. A cell-based phenotypic assay to identify cardioprotective agents. *Circ Res*. 2012;110(7):948–57.

17. Zhang J, Nadtochiy SM, Urciuoli WR, Brookes PS. The cardioprotective compound cloxyquin uncouples mitochondria and induces autophagy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2016;310(1):H29–38.
18. Fredebohm J, Wolf J, Hoheisel D, Boettcher M. Depletion of RAD17 sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Cell Sci*. 2013;126:3380–9.
19. Iyngkaran P, C. Thomas M, Johnson R, French J, Ilton M, McDonald P, et al. Contextualizing Genetics for Regional Heart Failure Care. *Curr Cardiol Rev*. 2016;12(3):231–42.
20. Tayal U, Prasad S, Cook SA. Genetics and genomics of dilated cardiomyopathy and systolic heart failure. *Genome Med*. *Genome Medicine*; 2017;9(20).
21. Liu WN, Fu KL, Gao HY, Shang YY, Wang ZH, Jiang GH, et al. β 1 adrenergic receptor polymorphisms and heart failure: A meta-analysis on susceptibility, response to β -blocker therapy and prognosis. *PLoS One*. 2012;7(7).
22. Guo M, Guo G, Ji X. Genetic polymorphisms associated with heart failure: A literature review. *J Int Med Res* . 2016;44(1):15–29.
23. Mahmoudi MJ, Hedayat M, Taghvaei M, Nematipour E, Farhadi E, Esfahanian N, et al. Association of IL-4 gene polymorphisms with ischemic heart failure. *Cardiol J*. 2014;21(1):24–8.
24. Cappola TP, Matkovich SJ, Wang W, van Booven D, Li M, Wang X, et al. Loss-of-function DNA sequence variant in the CLCNKA chloride channel implicates the cardio-renal axis in interindividual heart failure risk variation. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(6):2456–61.