

# Genterapi ved hjertesvikt

**Leif Erik Vinge, Medisinsk avdeling,  
Diakonhjemmet sykehus og Rikshospitalet**

Hjertesvikt er det sørgelige endelikt på et utall kardiovaskulære sykdommer og utgjør i dag en betydelig andel av den totale mortalitet og morbiditet i den vestlige verden. Til tross for stor satsning på utvikling av legemidler for behandling av hjertesvikt, virker det i dag som om man har nådd en terskel for behandlingseffekt, og nye farmakologiske behandlingsprinsipper har ikke medført store endringer av prognose. På bakgrunn av dette er det et behov for utvikling av nye, forbedrede behandlingsstrategier. De siste 10-15 år har vi fått en betydelig økt forståelse for de molekylære og cellulære forandringer som finner sted ved utvikling av hjertesvikt. Disse erkjennelsene har gjort oss i stand til å danne hypoteser for hvorledes man på det molekylære/cellulære plan ser for seg behandling av hjertesvikt, men også teste ut disse teoriene eksperimentelt med direkte genetisk intervensjon i myokard. I utgangspunktet er det kun to nødvendige forutsetninger for effektiv genterapi av hjertesvikt: en sikkert etablert molekylær mekanisme og effektive måter å levere nødvendig genetisk materiale til hjertevev/-celler. Genterapi av humane kardiovaskulære sykdommer er fortsatt å regne som "fremtidsmedisin", dog er tidsgapet i dag mellom basal eksperimentell erkjennelse og human terapeutisk applikasjon betydelig kortere enn tidligere, og det er allerede igangsatt to fase I-studier med genterapi av sviktende humant myokard og kardiomyocytter. Dette sammendraget har som mål å definere status for genterapi ved hjertesvikt.

## Praktiske forutsetninger for effektiv kardial genterapi

Genterapi av hjertesvikt er introduksjon av DNA eller RNA til hjerteceller der konsekvensen av overført genmateriale er korrigering av patogen intracellulær prosess/signalvei. På dette grunnlag må nødvendigvis de molekylære endringer i hjerteceller som fører til dødelige arytmier, akutt hjertesvikt og progresjon av kronisk hjertesvikt, adresseres. I utgangspunktet virker

det urimelig at intervensjon i kun et molekylært system vil være tilstrekkelig for betydelig endring av prognose. Det finnes derimot flere eksperimentelle studier der nettopp mono-genetisk intervensjon har vært tilstrekkelig for betydelig endring av hjertesviktførløp. Det er videre flere eksperimentelle observasjoner som viser at visse molekylære endringer ved hjertesvikt er felles for hjertesviktilstander med ulike etiologiske utgangspunkt. Likevel virker det rimelig å gen-behandle flere patogenetiske signalveier i ulike kardiale celletyper. I tråd med denne tanken vil genterapi av hjertesvikt etablert på et iskemisk grunnlag måtte:

- gen-regulere koronare vaskulære celler med hensikt å stabilisere koronare plakk samt inducere neoangiogenese
- forhindre apoptose av kardiomyocytter og inducere økt inotropi og relaksasjon uten utilsiktede effekter
- forhindre ugunstig ekstracellulær remodellering via gen-regulering av ulike kardiale celletyper
- forhindre arytmier ved endring av patogene kardiale elektrofysiologiske signalmolekyler

Felles for disse mål er behovet for grundig forståelse av de molekylære endringer som ligger til grunn for den patologiske utviklingen. Selve den genetiske intervensjon kan være:

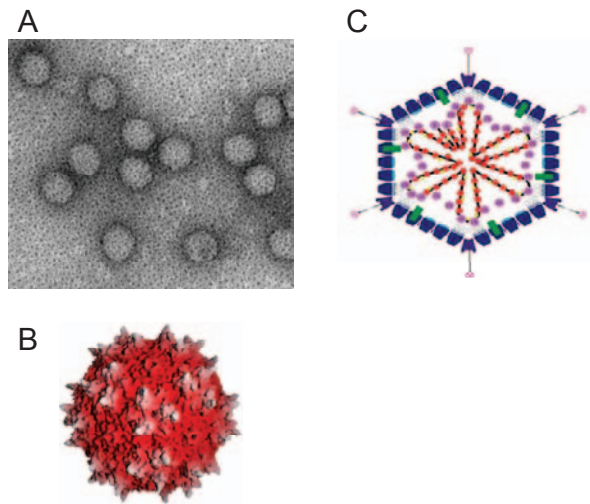
1. øke *nivået* (overekspresjon) av mål-molekyl (les protein),
2. endre måten mål-proteinet *transporteres* inne i cellen/hindre mål-proteinet å komme frem til virkested inne i cellen ved uttrykk/ekspresjon av annet *blokkerende* protein ("narresubstrat", jamfør mekanisme for  $\beta$ ARKct/GRK2ct skissert i figur 6),
3. "tap-av-funksjon"-strategier, altså *hindre målproteinet i å bli produsert* eller forhindre allerede produsert målprotein å *virke*.
4. *korreksjon av patogene mutasjoner* (skift av geninformasjon)/delesjoner (tap av

gen-informasjon) på genom (arvemassen)- eller primær-mRNA-nivå (forløper for mRNA, det som til slutt leses/oversettes til protein) eller

5. *installasjon av genetisk modifiserte celler* (stamceller eller differensierte celler). Noen av disse strategiene er brukt i studier som er referert i denne oversiktsartikkelen. I tillegg må man ha vektorer ("gen-transportører") som evner å installere genetisk materiale til et nødvendig antall hjerteceller, samt robuste intervensjons-teknikker for effektiv kardial deponering av ekspresjonssystemene/-vektorene.

## Vektorer (ekspresjonssystemer) for myokardial genterapi

Et krav til genterapi ved hjertesvikt er effektiv *overføring* av genetisk materiale. Man må også sikre *langtidsekspresjon* av transgen (dvs. det genetiske materialet som overføres og som oversettes til "terapeutisk" protein). Dette utelukker genterapi med "nakent" DNA og foreløpig tilfredsstillende kun virale vektorer (altså virus som er "pakket" med ønsket genetisk materiale) disse krav. Ved overføring av "nakent" DNA vil det genetiske materialet raskt brytes ned og uttrykk av terapeutisk gen raskt opphøre. Selv ved tilstander der man teoretisk ser for seg at kortvarig produksjon av terapeutisk molekyl kan være tilstrekkelig (forårsake neoangiogenese ved produksjon av vekstfaktorer), viser prekliniske studier skuffende resultater<sup>1</sup>. Dette har i ettertid vist seg å være konsekvens av genoverføring til for få kardiace celler og at ekspresjonen totalt sett har vært marginal eller ikke målbar (som sannsynligvis reflekterer hvor ustabil "nakent" DNA er når det blir overført til vev/celler). Ved bruk av virus som genvektor (gentransportør), har man genmanipulert virus til å uttrykke ønsket genmateriale etter infeksjon av hjerteceller. Dette overførte genmateriale vil produsere ønsket protein når det blir satt inn i en celle. Det finnes i dag flere lovende virale vektor-systemer, alle med sine fordeler og ulemper. De hyppigst brukte og mest lovende er virus i adenovirus-gruppen (AdV) og med-



Figur 1. Panel A: Elektronmikroskopisk bilde av et adenoassosiert virus. Den krystallinske fremstilling sees i panel B. Panel C: Skjematiske skisse av oppbygningen av modifisert adenovirus. For tiden er det de humane adenovirus serogruppe 2 og 5 som utgjør de vanligste platteformene.

lemmer av parvovirus-/dependovirus-gruppen, nærmere bestemt adenoassosiert virus (AAV) (se figur 1).

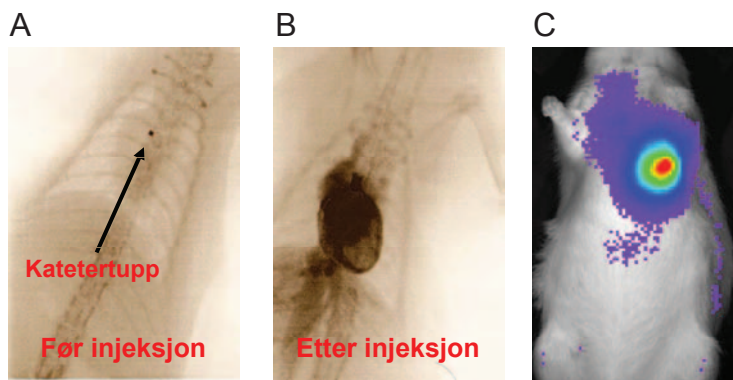
Adenovirus er lette å genetisk manipulere og har plass til mye genetisk informasjon. Det er videre svært lett å produsere store mengder virus; en nødvendig forutsetning for adekvat genoverføring til større organer som et humant hjerte er. Disse virusene har vist tilstrekkelig potensial for effektiv, funksjonsendrende genoverføring *in vivo*<sup>2</sup>. Den desidert største utfordringen og ulempe ved bruk av rekombinante / genmanipulerte adenovirus er den betydelige inflammatoriske responsen man ser ved bruk *in vivo*. Denne immunologiske reaksjon medfører at man kun oppnår en forbigående ekspresjon av virus-overført transgen. Et tilleggsproblem er at sekundær immunitet umuliggjør ny infeksjon. Nyere generasjoner rekombinante adenovirus ("gutted" adenovirus) har atskillig færre immunogene overflatestrukturer og er således mer lovende med tanke på stabil, langtidsekspresjon av overført transgen.

Adenoassosiert virus er på et generelt grunnlag oppfattet atskillig mer lovende enn andre virale vektorer med tanke på human, kardial genterapi. Dette skyldes at adenoassosiert virus er atskillig mindre immunogene enn f.eks. tradisjonelle adenovirus. Det er videre slik at adenoassosiert virus har vist evne til å infisere

og forårsake transgen-overføring av mål-molekyl med virkning som varer i måneder og år. Epidemiologisk finnes data som tyder på at adenoassosierte virus ikke er assosiert med noen kjent human sykdom<sup>3</sup>. Men det finnes naturlig forekommende antistoffer mot adenoassosierte virus som kan begrense nytteverdien av denne vektoren<sup>4,5</sup>. Et svært spennende aspekt ved adenoassosierte virus er at ulike serotyper viser ulik grad av tropisme (forkjærlighet) mot ulike vev. Stor kardial tropisme har bl.a. vært vist ved serotype 1, 6 og 9<sup>6-8</sup>, egenskaper ved adenoassosierte virus som i dag brukes ved ulike genterapi-strategier.

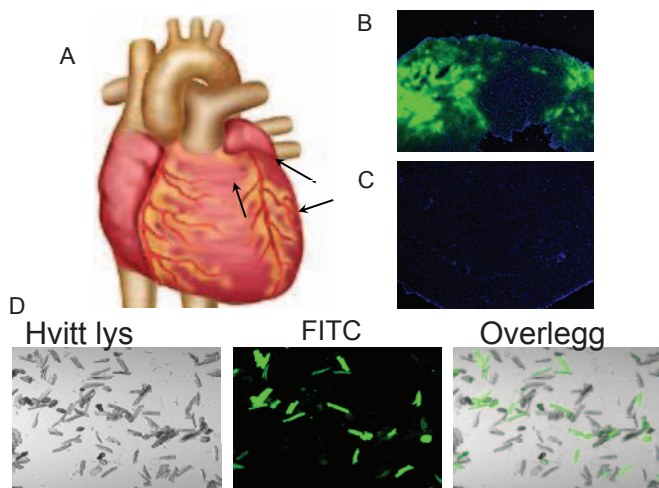
## Intervensjonsstrategier

Den ideelle intervensjonsteknikk for genterapi av myokard ville være å ha en viral vektor som etter intravenøs administrasjon effektivt og spesifikt blir tatt opp av kardiomyocytter. Som nevnt over finnes allerede i dag virale vektorer som delvis har denne egenskapen<sup>7,8</sup>. Dokumentasjonen for slik effekt foreligger bare med gnagere som eksperimentell modell, og i disse forsøk er det brukt store mengder virus. Det er derfor ikke sikkert om man uten videre kan oppskalere en slik intervensjons-strategi til å gjelde større arter, herunder menneske. Det virker derfor i dag nødvendig at virale vektorer må hjelpes til myokard for optimal kardiomyocyt-infeksjon og genoverføring. Det er kun to intervensjonsstrategier som har vist seg effektive i så måte; 1) intravasal administrering og 2) intramyokardial administrering. Intrakoronar administrering av virale vektorer (se figur 2 for eksperimentell demonstrasjon) ville av naturlige årsaker være å foretrekke dersom dette lot seg effektivt gjennomføre. Slik administrering er derimot oftest svært lite effektivt med mindre man samtidig benytter helt bestemt forbehandling (øke endotel-permeabilitet med vasoaktive stoffer som histamin, VEGF, substans P mm.,



Figur 2. (Egne upubliserte data). Koronar perfusjon av rotte-hjerte. Perfusjonen inneholder et adenoassosiert virus serogruppe 6 pakket med en CMV (cytomegalovirus)-promotor-drevet Luciferase-gen (genet som koder for proteinet som gjør at ilddfluer lyser). Et 2 F ballongkateter ("custom made", Millar Inc.) blir plassert supravulvært i aorta (panel A), hjertet blir stanset med adenosin og med høyt trykk blir AAV6-Luciferase sammen med kontrast og Substans P injisert intrakoronart (panel B). Fire uker etter genoverføring blir dyret anestetisert og injisert med Luceferin (stoffet som etter Luciferase-behandling blir lysende). Luciferase-aktivitet blir så detektert (panel C). Som det fremgår av fotografiet, er Luciferase-aktivitet i all hovedsak konsentrert til hjertet.

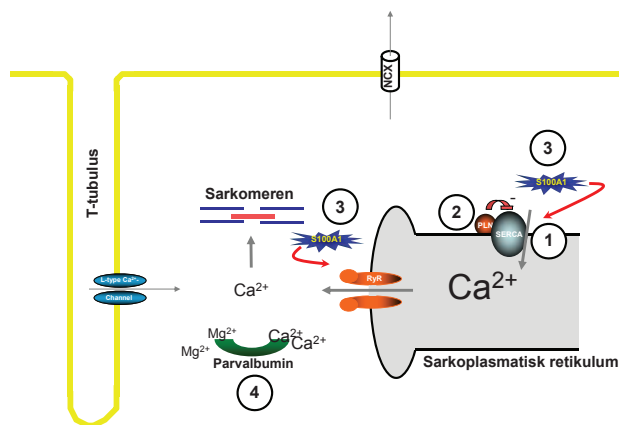
tilføre virus under stort perfusjonstrykk og øke kontakttid mellom kardiomyocyt og virus)<sup>2,9,10</sup>. Dyreeksperimentelt er dette tiltak som forbedrer overføring av vektor/transgen (se figur 2), men de er klart forbundet med økt risiko og sannsynligvis ikke umiddelbart forsvarlig å gjøre på pasienter. Man har derimot med suksess overført en adekvat mengde virus til myokard i større dyr (gris og sau) ved for eksempel intrakoronar administrasjon av virus og samtidig blokkert venøs tilbakestrøm, eller ved såkalt retroinfusjon (perfusjon via kanylering av sinus coronarius) av virus-vektorer. Dette øker perfusjonstrykket og tillater lengre kardiomyocyt-virus-kontaktid<sup>11,12</sup>. Det er også utviklet helt bestemte koronare resirkulasjonssystemer for å øke overføring av virale vektorer til myokard<sup>13</sup>. Direkte intramyokardiale deponeringer av virale vektorer (se figur 3) er også vist å være effektivt for genterapi av myokard i større dyr<sup>14</sup>. Effektiviteten vil her selvsagt begrenses til tilgjengelige områder av myokard og antall deponeringer. Det er også en risiko for skade ved gjentatte nålestikk i myokard. Slik administrasjonsstrategi er likevel appellerende ved human hjertesvikt i forbindelse med prosedyrer der myokard blottlegges (hjerstekirurgi).



Figur 3. (Egne upubliserte data). Panel A: Skisse av injeksjonsområder for direkte intramyokardiell injeksjon i mus og rotter. Kanyle blir plassert langs etter myokard i gitte regioner, og virus blir injisert under tilbaketrekning av kanyle. Panel B: Histologi av tverrsnitt-seksjoner av fremre vegg av venstre ventrikel fra mus fire uker etter injeksjon av et adenoassosiert virus serogruppe 6 med en CMV-drevet ekspresjon av "green fluorescent protein" (GFP). Panel C: Histologi av tverrsnitt-seksjon av høyre ventrikel, som her sett ikke tilgjengelig for injeksjon. Panel D: Rotte-kardiomyocytter høstet fire uker etter intramyocardiell injeksjon av samme overnevnte virus (AAV6-CMV-GFP) scannet i et konfokal laser-mikroskop. Infiserte, GFP-uttrykkende celler sees grønt fluorescerende.

## Lovende genterapi-kandidater

Det er flere molekylære systemer som i dag virker lovende med tanke på genterapi ved hjertesvikt. I de følgende avsnitt vil jeg diskutere tre hovedfelt noe mer inngående: 1) Genterapi av molekylære mål involvert i  $Ca^{2+}$ -håndtering



Figur 4. Enkel, skjematisk skisse av normal EC  $Ca^{2+}$ -håndtering. Lovende gen-terapeutiske mål-molekyler angitt med tall.

i kardiomyocytene, 2) genterapi av molekylære mål i kardiomyocytens  $\beta$ -adrenerge signalveier og 3) genterapi av monogenetiske årsaker til hjertesvikt. Dette valg er en konsekvens av at disse feltene har vært gjenstand for betydelig forskning (spesielt de to første) og at visse molekylære medlemmer i disse systemene allerede er, eller er nære, human klinisk utprøving.

## Genterapi av molekylære mål involvert i $Ca^{2+}$ -håndtering i kardiomyocytene

Håndtering av  $Ca^{2+}$  under eksitasjon-kontraksjon (EC)-koplingen er en vesentlig egenskap ved kardiomyocytten (se figur 4). Forskning relatert til forståelse av de molekylære mekanismer som styrer normal og patologisk EC  $Ca^{2+}$ , utgjør en høy andel av den totale basale forskningsaktivitet innenfor det kardiovaskulære

felt, og dette felt er også det første terapeutiske mål for genterapi ved human hjertesvikt. En detaljert beskrivelse av EC  $Ca^{2+}$ -homeostase ligger ikke innenfor rammene av denne oversikten. Jeg velger likevel å gi en kort beskrivelse av de basale trekk da dette er nødvendig for å danne et konseptuelt grunnlag for genterapi-strategiene. EC-koplingen begynner med kardiomyocyt-aksjonspotensialet (AP). Dette medfører en innstrømning av  $Ca^{2+}$  gjennom de spennings-regulerte L-type  $Ca^{2+}$ -kanalene (som vi klinisk kan blokkere med verapamil og diltiazem). Denne initiale  $Ca^{2+}$ -innflusen trigger frigjøring av en større mengde  $Ca^{2+}$  fra sarkoplasmatiske retikulum via ryanodin-reseptoren (RyR), såkalt  $Ca^{2+}$ -mediert  $Ca^{2+}$ -frigjøring<sup>15</sup>. Cytoplasmatiske  $Ca^{2+}$  igangsetter kardiomyocyt-kontraksjon ved å binde troponin C i myofilamentene i sarkomeren. Vel så viktig som frigjøringen av  $Ca^{2+}$ , er reopptaket av  $Ca^{2+}$  fra cytosol tilbake til SR. Dette medieres av den kardiale

SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (SERCA2a) og den sarkolem-male  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -bytteren (NCX) som kvantitativt er de viktigste bidragsyterne<sup>15</sup>. I tillegg til de overnevnte molekylære elementene er også nøkkelmolekyler som styrer aktiviteten til disse, samt molekyler som bufer cytosolisk  $\text{Ca}^{2+}$ , kritiske for vedlikeholdelse av EC  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostase-stabilitet. Av sistnevnte molekyler vil dette sammendraget redegjøre for phospholamban (en nøkkelregulator av SERCA2a, phospholambans aktivitet er igjen sterkt influert av  $\beta$ -adrenerg aktivitet) og S100A1 (som regulerer både SERCA2a og RyR).

Derangert strømning av  $\text{Ca}^{2+}$  i kardiomyocytten er et kjernetrekk ved hjertesvikt. Det foreligger nedsatt konsentrasjon av SR- $\text{Ca}^{2+}$  og forlengede  $\text{Ca}^{2+}$ -transienter (forlenget tid for reopptak av  $\text{Ca}^{2+}$  fra cytosol til SR i diastole). Studier har vist at disse endringene er konsekvens av økt NCX, reduksjon av SERCA2a og økt phospholamban/SERCA2a-ratio, samt økt tendens til lekkasje fra RyR<sup>16,17</sup>. De sistnevnte endringene er dog ikke unisont rapportert og er mulig avhengig av hjertesviktetiologi samt valg av dyre-eksperimentell modell<sup>18</sup>.

## SERCA2a

Genterapi med SERCA2a ved human hjertesvikt virker konseptuelt forlokkende. I teorien vil dette bedre den derangerte diastoliske  $\text{Ca}^{2+}$ -håndteringen man ser ved hjertesvikt, ved å øke reopptak av  $\text{Ca}^{2+}$  i diastole fra cytosol til SR og dermed bedre hemmet relaksasjonsfase. Slik genbehandling vil også bygge opp SR- $\text{Ca}^{2+}$  og øke den kontraktile reserve. Adenovirus-mediert SERCA2a-genoverføring til sviktende humane kardiomyocytter viser nettopp dette<sup>19</sup>. Denne *in vitro*-observasjonen er igjen styrket ved flere basale dyre-eksperimentelle studier på mus, rotte og gris der genbehandling med SERCA2a har ført til betydelig bedret kardial funksjon og dramatisk økt overlevelse<sup>20-23</sup>. Det foreligger derimot også data som indikerer at genterapi med SERCA2a kan føre til letale ventrikulære arytmier<sup>24</sup> og bortfall av inotrop reserve<sup>25</sup>. *Food and Drug Administration* (FDA) i USA har likevel godkjent den første humane genterapi-studien der mål-cellen er den sviktende kardiomyocyt. I den ene av de to nå igangsatte fase 1-studiene vil et adenoassosiert virus som inneholder SERCA2a-genet (AAV1-SERCA2a, i studien kalt MYDICAR – se også [http://www.](http://www.celladon.net)

[celladon.net](http://www.celladon.net)) bli overført intrakoronart<sup>26</sup>. Studien er blitt kalt CUPID (Calcium-Upregulation by Percutaneous administration of gene therapy *In cardiac Disease*) og har to deler. Den første delen er en dose-eskalerings-studie der fire doser MYDICAR vil bli gitt til pasienter med iskemisk og ikke-iskemisk hjertesvikt med et gitt tidsintervall der hensikten er å finne adekvat dose. Den andre delen av studien er en randomisert, placebo-kontrollert studie med predefinert terapeutisk dose. Av betydning for studien (og som adresserer den prekliniske bekymring) er at alle innrullerte pasienter må ha implantert ICD. I den andre fase 1-studien vil hjertesvikt-pasienter som får implantert LVAD (left ventricular assist device), samtidig motta kodende sekvens for SERCA2a; denne gang med et adenoassosiert virus serogruppe 6 (AAV6-SERCA2a). Formålet med denne studien er å undersøke sikkerhet og biologisk effekt.

## Phospholamban

Deaktivert phospholamban (via økt  $\beta$ -adrenerg induert PKA-aktivitet) fører til økt SERCA2a-aktivitet. Motsatt vil fravær av  $\beta$ -adrenerg aktivitet føre til økt phospholamban-mediert hemning av SERCA2a. Økt phospholamban-aktivitet fører til kardiomyopati<sup>27,28</sup>, mens tap av phospholamban-aktivitet medfører økt kardial funksjon<sup>29</sup>. Fravær av phospholamban har vist dels gunstige effekter på hjertesvikt<sup>30,31</sup>, dels indifferente<sup>32,33</sup>. Alle studiene viser forventet endring i  $\text{Ca}^{2+}$ -strømninger (her raskere tømning av cytosolisk  $\text{Ca}^{2+}$  i diastole) noe som klart indikerer at molekylære endringer som bedrer  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostase ved hjertesvikt, i utgangspunktet ikke er det samme som bedret hjertesviktforløp. Genbehandling som fører til tap av phospholamban-aktivitet, viser likevel gunstige effekter på hjertesvikt i både smådyrs- og stordyrsmo-deller<sup>34-36</sup>.

## Parvalbumin

Parvalbumin er et cytosolisk  $\text{Ca}^{2+}$ -sekvestrerende protein som normalt ikke er uttrykt i myokard. Proteinene kan mediere en energi-uavhengig fjerning av diastolisk cytosolisk  $\text{Ca}^{2+}$ . Genbehandling med parvalbumin ved eksperimentell hjertesvikt har vist seg å være gunstig<sup>37,38</sup>. Ved høye nivåer av parvalbumin eller forlengede systoliske perioder vil derimot parvalbumin også kunne binde  $\text{Ca}^{2+}$  i systolisk fase og

førring systolisk funksjon<sup>25</sup>. Studier på større arter med kontrollert ekspresjon av parvalbumin er klart nødvendig for human applikasjon.

## S100A1

S100A1 er et lite  $Ca^{2+}$ -bindende cytosolisk protein som påvirker RyR (der den stabiliserer reseptor under diastole og derved forhindrer tendens til "lekkasje" av  $Ca^{2+}$ , i tillegg promoterer  $Ca^{2+}$ -frigjøring i systole) og SERCA2a (der den øker SERCA2a-aktivitet under diastole)<sup>39-41</sup>. Studier på S100A1-transgene mus, S100A1 "knockout"-mus og S100A1-genbehandlede rotter med iskemisk hjertesvikt viser klart gunstige effekter av overproduksjon av S100A1 og motsatt svært ugunstige effekter av bortfall av S100A1 ved hjertesvikt<sup>42, 43, 40</sup>. Genterapi med S100A1 ved human hjertesvikt virker i så måte å være et hensiktsmessig foretagende. Flere eksperimentelle studier (fortrinnsvis i større forsøksdyr) må til for å bane vei for humane utprøvinger. En større grisestudie (utgående fra miljøet i Heidelberg og München, Tyskland) der AAV6-S100A1-overføring skjer via retroperfusjon etter etablering av hjertesvikt er allerede igangsatt.

## Genterapi av molekylære mål i kardiomyocytters $\beta$ -adrenerge signalveier

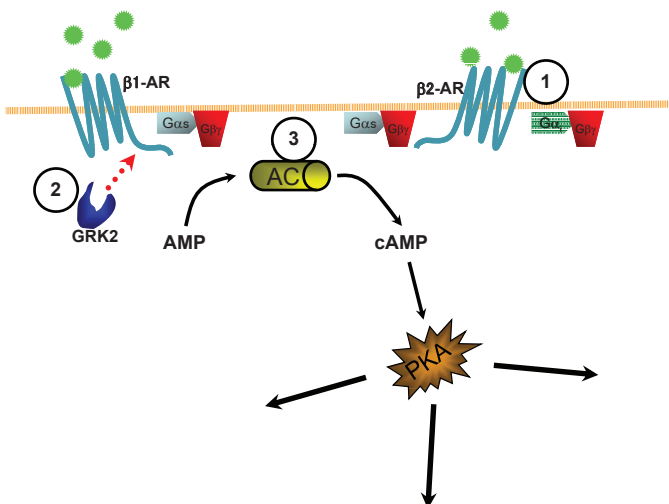
Det  $\beta$ -adrenerge reseptor-signalveisystemet har lenge vært kjent å være endret ved hjertesvikt.

Det er nå drøye 25 år siden Bristow og kolleger demonstrerte at følsomheten for  $\beta$ -adrenerge agonister (adrenalin, noradrenalin mm.) er nedsatt ved hjertesvikt<sup>44</sup>. I kjølvannet av denne observasjonen har det vært nedlagt en betydelig mengde basal og translatorisk forskning for å kartlegge, forstå og terapeutisk utnytte det sviktende  $\beta$ -adrenerge reseptor-systemet. Klinisk foreligger to erkjennelser: 1) bruk av  $\beta$ -adrenerge reseptor-antagonister ved hjertesvikt er gunstig<sup>45</sup> og 2) bruk av medikamenter som øker  $\beta$ -adrenerge signalering ved hjertesvikt, er ugunstig<sup>46</sup>. Det er likevel en rekke basale studier som nå klart viser at visse mo-

lekylære intervensjoner som øker  $\beta$ -adrenerge signalering ved hjertesvikt, har positive effekter på hjertesviktforløpet. Sistnevnte kan virke paradoksalt gitt ovennevnte kliniske observasjon, dog er kompleksiteten i dette signalveisystemet slik at man neppe kan konkludere "på" eller "imot" på er gunstig"<sup>47</sup>. Kardiomyocytter har både  $\beta_1$ -adrenerge reseptorer og  $\beta_2$ -adrenerge reseptorer på cellemembranen med en 4:1 fordeling i myokard<sup>48, 49</sup>. Ved hjertesvikt er ca. 50 % av de  $\beta_1$ -adrenerge reseptorene nedregulert, resten er partielt frikoplet fra videre signalvei<sup>48</sup>. Sistnevnte øker betydningen av  $\beta_2$ -adrenerge reseptorer for inotrop støtte. En enkel skisse der hovedmediatorene i den  $\beta$ -adrenerge signalvei vises er fremstilt i figur 5.  $\beta$ -adrenerge reseptorer i kardiomyocytter kopler via et G-protein til sitt effektor-molekyl som ved inotrop signalering er adenylyl cyclase (AC). Aktivisering av adenylyl cyclase fører til økte mengder cAMP, som igjen aktiverer protein kinase A (PKA) (se figur 5). PKA er selve nøkkel-enzymet i den  $\beta$ -adrenerge signalvei med en rekke sentrale mål-molekyler (bl.a. RyR, phospholamban).

## $\beta_2$ -adrenerge reseptor

Historisk sett vurderte man den observerte  $\beta$ -adrenerge reseptor-nedreguleringen som mulig ugunstig, og via basale transgene musforsøk så man hvordan overekspresjon av  $\beta$ -adrenerge reseptorer påvirket kardial funksjon. Resultatene av disse basale forsøkene illustrerer meget godt kompleksiteten i det



Figur 5. Enkel, skjematisert skisse av normal  $\beta$ -adrenerge signalering. Lovende gen-terapeutiske mål-molekyler angitt med tall.

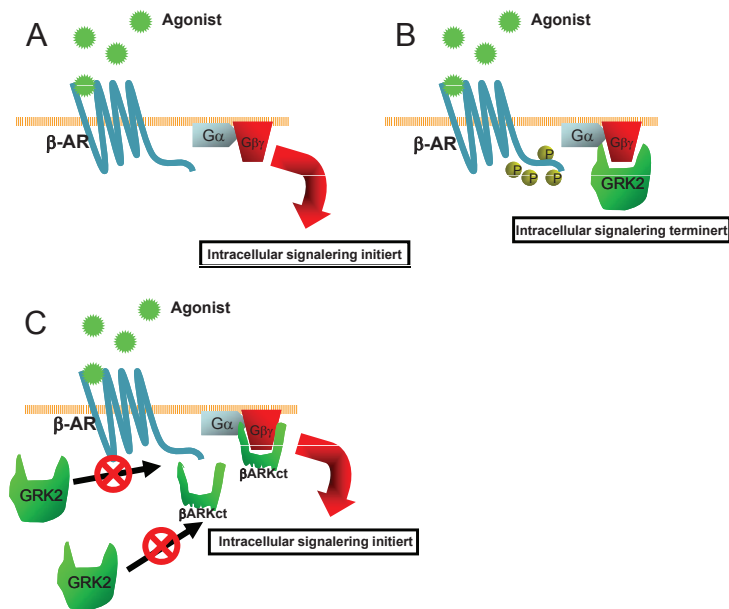
$\beta$ -adrenerge reseptor-systemet. Kardiomyocyt-overekspresjon av den humane  $\beta$ 1-adrenerge reseptoren medførte tidlig debut av alvorlig kardiomyopati<sup>50</sup>, mens overekspresjon av  $\beta$ 2-adrenerge reseptor førte til økt systolisk og diastolisk funksjon samt preservert kardial funksjon etter myokardinfarkt<sup>51-53</sup>. På dette grunnlag kan man se for seg human genterapi med  $\beta$ 2-adrenerg reseptor som et mulig fornuftig foretagende. Biokjemisk er det store forskjeller på hvorledes  $\beta$ 1-adrenerge reseptorer og  $\beta$ 2-adrenerge reseptorer signalerer.  $\beta$ 2-adrenerge reseptorer kopler mot både  $G_{\alpha s}$  og  $G_{\alpha i}$  ("motarbeidende" G-proteiner) og har vist å promotere "overlevelses-signalerings" og forhindre apoptose (programmert celledød)<sup>54,55</sup>. Genbehandling av dysfunksjonelt rotte- og kanin-myokard med  $\beta$ 2-adrenerge reseptorer medførte betydelig bedring av kardial funksjon<sup>56,57</sup>.

Andre studier på mus har derimot vist at svært høye ekspresjonsnivåer av  $\beta$ 2-adrenerge reseptorer er forbundet med utvikling av kardiomyopati på sikt og forverring av hjertesvikt<sup>52</sup>. Igjen, studier i relevante stordyr-modeller og bruk av genterapi-plattformer som medfører effektiv langstidsekspresjon av  $\beta$ 2-adrenerge reseptorer, er nødvendige før human utprøving.

## G-protein-koplet reseptor-kinase 2 (GRK2)

GRK2 (også kalt  $\beta$ -adrenerg reseptor-kinase -  $\beta$ ARK) er et nøkkelenzym ved  $\beta$ -adrenerg signalering og fungerer som en endogen  $\beta$ -blokker som kun blokkerer når reseptor er aktivert (se figur 6). Den nedsatte følsomheten man ser i det  $\beta$ -adrenerge reseptorsystemet ved hjertesvikt er foreslått å være konsekvens av oppregulert GRK2<sup>58</sup>, og en rekke eksperimentelle arbeider

har styrket denne hypotesen<sup>59-62</sup>. Initialt trodde man at oppregulering av GRK2 var en fornuftig biologisk respons (teoretisk vil dette bremse  $\beta$ -adrenerg-overstimulering og derav forhindre letale arytmier og patologisk remodelering). Ekspresjon av kun karboksyl-delen ("halen") av GRK2 ( $\beta$ ARKct) hemmer endogent uttrykt GRK2<sup>63</sup> (se figur 6, panel C). Ut i fra klinisk erfaring ville man forvente at slik behandling (økt  $\beta$ -adrenerg reseptor-signalering) ville være ugunstig ved hjertesvikt. En rekke studier på transgene mus, genbehandlede hjertesvikt-kaniner og sviktende humane kardiomyocytter viser derimot det motsatte resultat<sup>61,64-68</sup>. Forsøk på human kardial genterapi ved hjertesvikt med  $\beta$ ARKct har utvilsomt et eksperimentelt grunnlag. Det er derimot indisert med nye studier på mer relevante stordyr-modeller og bruk av virale vektorer som



Figur 6. Panel A: Normal  $\beta$ -adrenerg kopling mot G-protein etter stimulering av reseptor. Panel B: Reseptor-blokade via G-protein-koplet reseptor kinase 2 (GRK2 – en endogen reseptor blokker). Ved reseptor-aktivering av G-proteinet spaltes denne i to deler ( $G_{\alpha}$  og en  $G_{\beta\gamma}$ ). GRK2 binder spaltet  $G_{\beta\gamma}$  som fører til transport av GRK2 til cellemembranen og aktivert reseptor. Her setter GRK2 fosfat-grupper på  $\beta$ -adrenerg reseptor og dette medfører hemning av videre reseptor signalering – endogen reseptor-blokade/reseptor-desensitivisering (gassen er på, men clutchen er satt inn...). Panel C: Virkningsmekanismen til  $\beta$ ARKct (Beta-adrenerg reseptor kinase carboxyl terminus).  $\beta$ ARKct hindrer GRK2 å binde  $G_{\beta\gamma}$  som medfører at GRK2 ikke transporteres til cellemembranen og aktivert reseptor. GRK2 mister derav sin reseptor-signal-blokkerende funksjon (gassen er på, clutchen er borte...) som medfører frigjort, uhemmet reseptor signalering.

promoterer langtidsekspresjon, før evt. human utprøving.

### Adenylyl cyclase (AC) Type 6

I hjertet er kun AC5 og AC6 av de 9 forskjellige AC av kvantitativ betydning<sup>69</sup>. Gen-intervensjon med AC6 ved hjertesvikt er i teori rasjonelt da AC6 kinetisk sett er hastighetsbegrensende i den  $\beta$ -adrenerge reseptor signal-kaskade og (i motsetning til andre molekylære elementer i den  $\beta$ -adrenerge signalvei) ikke medfører økte basalnivåer av cAMP (øker kun ved økt reseptoraktivitet)<sup>70-72</sup>. Genterapi med AC6 i mus og gris med kardial dysfunksjon er klart vist gunstig<sup>73-77</sup> og det er nå planlagt human utprøving.

### Genterapi av monogenetiske årsaker til hjertesvikt

Populasjonen av hjertesvikt-pasienter der etiologi i all hovedsak er genetisk arvet betinget, utgjør en liten andel av total-populasjonen. Likevel er kanskje nettopp denne gruppen mest lovende mtp. genterapi og kanskje den mest rasjonelle gruppen å se for seg genbehandlet. I motsetning til andre årsaker til hjertesvikt er utløsende årsak til hjertesvikt her ofte en genfeil og således atskillig lettere å forstå mekanistisk. Det er videre slik at mange i denne pasientgruppen sannsynligvis ikke profiterer på konvensjonell behandling. Det er også lite sannsynlig at legemiddelindustrien vil målstyre legemiddelutvikling som spesifikt adresserer de mange ulike genetiske defektene.

Den genetiske basis for denne svært heterogene gruppen er mutasjoner (skift av genetisk informasjon) eller delesjoner (tap av genetisk informasjon) i gener som uttrykker proteiner involvert i sarkomeren (det kontraktile apparat), cytoskjelettet ("reisverket" i kardiomyocytten) eller  $Ca^{2+}$ -homeostasen<sup>78, 79</sup>. I teorien vil en del av defektene kunne adresseres ved kun overekspressjon av normalvarianten av defekt protein. Det er blant annet vist at slik overekspressjon (ofte flere ganger over normalt uttrykt nivå) inngår i proteinkompleksene på en ordnet, organisert måte, men grunnet det mange ganger høyere ekspressionsnivået tipper det defekte proteinet ut av likevektsbalansen<sup>80</sup>. På den siste tysk-sveitsiske-østeriske kardiologi-konferansen i Mannheim i Tyskland ble det presentert et arbeid der man effektivt kardielt "reddet" en sarcoglycan-defekt muselinje (human kardio-

myopati-parallell foreligger) via intravenøs genterapi med et sarcoglycan-uttrykkende adenoassosiert virus serogruppe 9 (AAV9-sarcoglycan). Det finnes også mange transgene muselinjer som genetisk mimikerer kjente humane kardiomyopati, slik at ytterligere "proof of concept"-studier skal være mulige.

For humane kardiomyopati der utgangspunkt er delesjoner og mutasjoner i større gener, vil overnevnte strategi være svært utfordrende, hvis i det hele tatt mulig. Duchennes muskeldystrofi er en slik sykdom. Denne sykdommen skyldes ulike mutasjoner og delesjoner i dystrophin-genet, og i de mest alvorlige tilstandene (der uttrykt protein er svært avstumpet eller mangler helt) utvikles raskt alvorlige muskelsvekkelser og kardiomyopati<sup>81</sup>. Man har hatt delvis eksperimentell suksess med å genbehandle myokard i såkalte mdx-mus (mimikerer en av de vanligste humane mutasjonene) med et adenoassosiert virus serogruppe 6 pakket med et dystrophin-minigen (AAV6/micro-dystrophin)<sup>82</sup>. Større teoretisk suksess kan man derimot se for seg ved å korrigere selve defekten. Ved bruk av såkalt "exon skipping"-teknologi kan man tvinge en bestemt exon-splicing på primær-mRNA før dannelsen av maturt mRNA (exoner er de protein-kodende deler av et gen, introner er de ikke-kodende deler av et gen, primær-mRNA inneholder både introner og exoner, maturt mRNA inneholder kun exoner). På denne måten kan gen-sekvensen som inneholder den genetiske defekt, hoppes over med dannelse av et nært fullverdig dystrophin-protein. Denne tilnærmingen har vært gjort med suksess for å korrigere defekt tverrstripet muskulatur i mdx-mus<sup>83</sup> og et "proof of concept"-forsøk er også gjort i en human populasjon<sup>84</sup>.

### Sikkerhet

Genterapi av hjertesvikt er i teori appellerende av flere årsaker. Det vil i utgangspunktet være lettere, gitt adekvate leveringssystemer, å bygge bro mellom basal erkjennelse og klinisk applikasjon. Man har også muligheten til i mye større grad en klassisk farmakologisk behandling å målstyre behandling mot det organ (hjerne) og de celler man ønsker å intervensere i. Det vil også være lettere å gi en høyere grad av spesifikk behandling avhengig av etiologien for en bestemt type hjertesvikt enn det vi i dag har. Det er derimot flere sikkerhetsaspekter man må ha i



mente og som klart kompliserer bruk av genterapi ved hjertesvikt. De til nå mest sannsynlige vektorer for human genterapi er ulike virus. I motsetning til klassisk farmakologisk behandling er genterapi med virale vektorer i utgangspunktet irreversibelt. De fleste eksperimentelle studier til nå (inklusive de nå to igangsatte humane studiene) har ikke designet vektorer med celle-spesifikk ekspresjon og ingen av studiene har vektorer med ”retrett mulighet”. For å hindre ”off-target”-effekter finnes i dag bioteknologiske muligheter for å styre ekspresjonen av transgenet til helt bestemte celler ved bruk av celle-spesifikke promotorer (”gen-motoren”) <sup>40, 85, 86</sup>. Samme teknologi kan benyttes for å implementere styrbare promotorer (”gassen” i ”gen-motoren” kan reguleres via medikamenter). Et annet sikkerhetsaspekt er patogenisiteten av selve vektoren, her virusene. Som nevnt over medfører tradisjonelle adenovirus en voldsom inflammatorisk respons *in vivo*, et klart uheldig aspekt ved et allerede etablert sykt hjerte. Human død grunnet betydelig inflammasjon er allerede sett i forbindelse med genterapi (Jesse Geller, 1999). Adenoassosierte virus gir ikke i like stor grad denne inflammatoriske respons, men studier har vist at adenoassosierte virus kan integrere uheldig i genomet (arvemassen) og medføre en neoplasi <sup>87</sup>. Dette er dessverre også konklusjonen til en genterapi-”suksess”-historie der bruk av en annen viral vektor (som vellykket behandlet pasienter med kombinert immunsviktsykdom - SCID-X1) også etter hvert medførte en klonal T-celle-ekspansjon <sup>88</sup>. Det er en betydelig bioteknologisk forskningsaktivitet som pågår med hensikt å adressere disse aspektene.

## Konkluderende bemerkninger

Genterapi av hjertesvikt er eksperimentelt med hovedtyngden av data fra dyreeksperimentelle modeller. Forutsetningen for dagens kunnskap er likevel resultat av kun få års forskning, og som nevnt, er allerede to humane studier igangsatt med flere humane studier i ”pipeline”. Det foreligger en voldsom forskningsaktivitet for å ytterligere kartlegge de patogenetiske mekanismer som ligger bak hjertesvikt, og samtidig er det en veldig utvikling av teknologi for å effektivt levere og styre genetisk intervensjon i myo-

kard. Dette fagfelt er fortsatt i sin nyfødte-fase, men nærmer seg sin pubertet.

## Referanser

1. Rissanen TT, Yla-Herttuala S. Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther*. 2007;15:1233-1247.
2. Williams ML, Koch WJ. Viral-based myocardial gene therapy approaches to alter cardiac function. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:49-75.
3. Blacklow NR, Hoggan MD, Kapikian AZ, Austin JB, Rowe WP. Epidemiology of adenovirus-associated virus infection in a nursery population. *Am J Epidemiol*. 1968;88:368-378.
4. Chirmule N, Propert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther*. 1999;6:1574-1583.
5. Halbert CL, Miller AD, McNamara S, Emerson J, Gibson RL, Ramsey B, Aitken ML. Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther*. 2006;17:440-447.
6. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, McTiernan CF, Kay MA, Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*. 2006;14:45-53.
7. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction *in vivo*. *Circ Res*. 2006;99:3-9.
8. Palomeque J, Chemaly ER, Colosi P, Wellman JA, Zhou S, Del Monte F, Hajjar RJ. Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium *in vivo*. *Gene Ther*. 2007;14:989-997.
9. Donahue JK, Kikkawa K, Thomas AD, Marban E, Lawrence JH. Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin. *Gene Ther*. 1998;5:630-634.
10. O'Donnell JM, Lewandowski ED. Efficient, cardiac-specific adenoviral gene transfer in rat heart by isolated retrograde perfusion *in vivo*. *Gene Ther*. 2005;12:958-964.
11. Hayase M, Del Monte F, Kawase Y, Macneill BD, McGregor J, Yoneyama R, Hoshino K, Tsuji T, De Grand AM, Gwathmey JK, Frangioni JV, Hajjar RJ. Catheter-based antegrade intracoronary viral gene delivery with coronary venous

- blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H2995-3000.
12. Raake P, von Degenfeld G, Hinkel R, Vachenaue R, Sandner T, Beller S, Andrees M, Kupatt C, Schuler G, Boekstegers P. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1124-1129.
  13. Kaye DM, Prevolos A, Marshall T, Byrne M, Hoshijima M, Hajjar R, Mariani JA, Pepe S, Chien KR, Power JM. Percutaneous cardiac recirculation-mediated gene transfer of an inhibitory phospholamban peptide reverses advanced heart failure in large animals. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:253-260.
  14. Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, Lin H, Jiang F, Chu L, Leiden JM. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation*. 1999;99:201-205.
  15. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
  16. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*. 2007;35:430-442.
  17. Piacentino V, 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*. 2003;92:651-658.
  18. Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:380-387.
  19. del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation*. 1999;100:2308-2311.
  20. del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation*. 2001;104:1424-1429.
  21. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, Guerrero JL, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:793-798.
  22. Ito K, Yan X, Feng X, Manning WJ, Dillmann WH, Lorell BH. Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) atpase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure. *Circ Res*. 2001;89:422-429.
  23. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takekawa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif JC, Tanguay JF, Hajjar RJ. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1112-1119.
  24. Chen Y, Escoubet B, Prunier F, Amour J, Simonides WS, Vivien B, Lenoir C, Heimburger M, Choqueux C, Gellen B, Riou B, Michel JB, Franz WM, Mercadier JJ. Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. *Circulation*. 2004;109:1898-1903.
  25. Hirsch JC, Borton AR, Albayya FP, Russell MW, Ohye RG, Metzger JM. Comparative analysis of parvalbumin and SERCA2a cardiac myocyte gene transfer in a large animal model of diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H2314-2321.
  26. Hajjar RJ, Zsebo K, Deckelbaum L, Thompson C, Rudy J, Yaroshinsky A, Ly H, Kawase Y, Wagner K, Borow K, Jaski B, London B, Greenberg B, Pauly DF, Patten R, Starling R, Mancini D, Jessup M. Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *J Card Fail*. 2008;14:355-367.
  27. Haghghi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Kimura Y, Dorn GW, 2nd, MacLennan DH, Kranias EG. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem*. 2001;276:24145-24152.
  28. Pattison JS, Waggoner JR, James J, Martin L, Gulick J, Osinska H, Kleivitsky R, Kranias EG, Robbins J. Phospholamban overexpression in transgenic rabbits. *Transgenic Res*. 2007.
  29. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*. 1994;75:401-409.
  30. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J, Jr., Kranias EG, Giles WR, Chien KR. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum cal-

- cium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*. 1999;99:313-322.
31. Sato Y, Kiriazis H, Yatani A, Schmidt AG, Hahn H, Ferguson DG, Sako H, Mitarai S, Honda R, Mesnard-Rouiller L, Frank KF, Beyermann B, Wu G, Fujimori K, Dorn GW, 2nd, Kranias EG. Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in calsequestrin overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J Biol Chem*. 2001;276:9392-9399.
  32. Delling U, Sussman MA, Molkentin JD. Re-evaluating sarcoplasmic reticulum function in heart failure. *Nat Med*. 2000;6:942-943.
  33. Freeman K, Lerman I, Kranias EG, Bohlmeier T, Bristow MR, Lefkowitz RJ, Iaccarino G, Koch WJ, Leinwand LA. Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 2001;107:967-974.
  34. Chu G, Lester JW, Young KB, Luo W, Zhai J, Kranias EG. A single site (Ser16) phosphorylation in phospholamban is sufficient in mediating its maximal cardiac responses to beta-agonists. *J Biol Chem*. 2000;275:38938-38943.
  35. Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, Date MO, Gu Y, Iwatate M, Li M, Wang L, Wilson JM, Wang Y, Ross J, Jr., Chien KR. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med*. 2002;8:864-871.
  36. Iwanaga Y, Hoshijima M, Gu Y, Iwatate M, Dieterle T, Ikeda Y, Date MO, Chrast J, Matsuzaki M, Peterson KL, Chien KR, Ross J, Jr. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J Clin Invest*. 2004;113:727-736.
  37. Coutu P, Bennett CN, Favre EG, Day SM, Metzger JM. Parvalbumin corrects slowed relaxation in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-linked alpha-tropomyosin mutations. *Circ Res*. 2004;94:1235-1241.
  38. Szatkowski ML, Westfall MV, Gomez CA, Wahr PA, Michele DE, DelloRusso C, Turner II, Hong KE, Albayya FP, Metzger JM. In vivo acceleration of heart relaxation performance by parvalbumin gene delivery. *J Clin Invest*. 2001;107:191-198.
  39. Most P, Rempis A, Pleger ST, Katus HA, Koch WJ. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R568-577.
  40. Pleger ST, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun JK, Pleger W, Gao E, Dasgupta A, Rengo G, Rempis A, Katus HA, Eckhart AD, Rabinowitz JE, Koch WJ. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation*. 2007;115:2506-2515.
  41. Volkers M, Loughrey CM, Macquaide N, Rempis A, DeGeorge BR, Jr., Wegner FV, Friedrich O, Fink RH, Koch WJ, Smith GL, Most P. S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*. 2007;41:135-143.
  42. Du XJ, Cole TJ, Tennis N, Gao XM, Kontgen F, Kemp BE, Heierhorst J. Impaired cardiac contractility response to hemodynamic stress in S100A1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2002;22:2821-2829.
  43. Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, Volkers M, Heierhorst J, Rempis A, Pleger ST, DeGeorge BR, Jr., Eckhart AD, Feldman AM, Koch WJ. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:1258-1268.
  44. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med*. 1982;307:205-211.
  45. Hunt SA, et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005;112:154-235.
  46. Packer M. The development of positive inotropic agents for chronic heart failure: how have we gone astray? *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:119A-126A.
  47. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002;415:206-212.
  48. Brodde OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev*. 1991;43:203-242.

49. Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 1999;51:651-690.
50. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:7059-7064.
51. Du XJ, Gao XM, Jennings GL, Dart AM, Woodcock EA. Preserved ventricular contractility in infarcted mouse heart overexpressing beta(2)-adrenergic receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2456-2463.
52. Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW, 2nd. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation.* 2000;101:1707-1714.
53. Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science.* 1994;264:582-586.
54. Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation.* 1999;100:2210-2212.
55. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1607-1612.
56. Kypson A, Hendrickson S, Akhter S, Wilson K, McDonald P, Lilly R, Dolber P, Glower D, Lefkowitz R, Koch W. Adenovirus-mediated gene transfer of the beta2-adrenergic receptor to donor hearts enhances cardiac function. *Gene Ther.* 1999;6:1298-1304.
57. Tevaearai HT, Eckhart AD, Walton GB, Keys JR, Wilson K, Koch WJ. Myocardial gene transfer and overexpression of beta2-adrenergic receptors potentiates the functional recovery of unloaded failing hearts. *Circulation.* 2002;106:124-129.
58. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1993;87:454-463.
59. Akhter SA, Skaer CA, Kypson AP, McDonald PH, Peppel KC, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:12100-12105.
60. Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN, Koch WJ. The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension.* 1999;33:402-407.
61. Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, Koch WJ. Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7000-7005.
62. Vinge LE, Øie E, Andersson Y, Grøgaard HK, Andersen G, Attramadal H. Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H2490-2499.
63. Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, Lefkowitz RJ. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science.* 1995;268:1350-1353.
64. Akhter SA, Eckhart AD, Rockman HA, Shotwell K, Lefkowitz RJ, Koch WJ. In vivo inhibition of elevated myocardial beta-adrenergic receptor kinase activity in hybrid transgenic mice restores normal beta-adrenergic signaling and function. *Circulation.* 1999;100:648-653.
65. White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Preservation of myocardial beta-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:5428-5433.
66. Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5809-5814.
67. Williams ML, Hata JA, Schroder J, Ramperasad E, Petrofski J, Jakoi A, Milano CA, Koch WJ. Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts. *Circulation.* 2004;109:1590-1593.
68. Shah AS, White DC, Emani S, Kypson AP, Lilly RE, Wilson K, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ. In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation.* 2001;103:1311-1316.
69. Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F400-416.
70. Dorn GW, 2nd, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, Liggett SB. Low- and high-level transgenic ex-

- pression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6400-6405.
71. Du XJ, Autelitano DJ, Dilley RJ, Wang B, Dart AM, Woodcock EA. beta(2)-adrenergic receptor overexpression exacerbates development of heart failure after aortic stenosis. *Circulation*. 2000;101:71-77.
  72. Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ. Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol*. 2001;60:712-717.
  73. Roth DM, Bayat H, Drumm JD, Gao MH, Swaney JS, Ander A, Hammond HK. Adenylyl cyclase increases survival in cardiomyopathy. *Circulation*. 2002;105:1989-1994.
  74. Roth DM, Gao MH, Lai NC, Drumm J, Dalton N, Zhou JY, Zhu J, Entrikin D, Hammond HK. Cardiac-directed adenylyl cyclase expression improves heart function in murine cardiomyopathy. *Circulation*. 1999;99:3099-3102.
  75. Rebolledo B, Lai NC, Gao MH, Takahashi T, Roth DM, Baird SM, Hammond HK. Adenylyl cyclase gene transfer increases function of the failing heart. *Hum Gene Ther*. 2006;17:1043-1048.
  76. Lai NC, Roth DM, Gao MH, Fine S, Head BP, Zhu J, McKirman MD, Kwong C, Dalton N, Urasawa K, Roth DA, Hammond HK. Intracoronary delivery of adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function and cAMP-generating capacity. *Circulation*. 2000;102:2396-2401.
  77. Lai NC, Roth DM, Gao MH, Tang T, Dalton N, Lai YY, Spellman M, Clopton P, Hammond HK. Intracoronary adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function in heart failure. *Circulation*. 2004;110:330-336.
  78. Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? *Curr Opin Cardiol*. 2007;22:193-199.
  79. Karkkainen S, Peuhkurinen K. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Ann Med*. 2007;39:91-107.
  80. Michele DE, Albayya FP, Metzger JM. Thin filament protein dynamics in fully differentiated adult cardiac myocytes: toward a model of sarcomere maintenance. *J Cell Biol*. 1999;145:1483-1495.
  81. Muntoni F. Cardiomyopathy in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 2003;16:577-583.
  82. Townsend D, Blankinship MJ, Allen JM, Gregorevic P, Chamberlain JS, Metzger JM. Systemic administration of micro-dystrophin restores cardiac geometry and prevents dobutamine-induced cardiac pump failure. *Mol Ther*. 2007;15:1086-1092.
  83. Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*. 2004;306:1796-1799.
  84. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooij AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhart PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, van Ommen GJ. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med*. 2007;357:2677-2686.
  85. Okada Y, Yano K, Jin E, Funahashi N, Kitayama M, Doi T, Spokes K, Beeler DL, Shih SC, Okada H, Danilov TA, Maynard E, Minami T, Oettgen P, Aird WC. A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. *Circ Res*. 2007;100:1712-1722.
  86. Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J, Robbins J. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1991;266:24613-24620.
  87. Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, Brunt EM, Russell DW, Sands MS. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*. 2007;317:477.
  88. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JJ, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302:415-419.