

Ingo Staudacher

Dr. med.

Die Inhibition des kardialen „human ether-a-go-go related gene“-Kaliumkanals: Kardiotoxische Effekte und die Induktion von Apoptose

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Dierk Thomas

Die antidepressive Therapie mit Desipramin ist mit QT-Zeit-Verlängerungen, Arrhythmien oder plötzlichem Herztod assoziiert. Darüber hinaus kann es, im Rahmen einer Depression, zu einer bewussten Überdosierung von Desipramin kommen. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Desipramin auf den hERG-Kaliumkanal untersucht, um die pro-arrhythmischen und kardiotoxischen Effekte mechanistisch aufzuklären.

Die akute Blockade der hERG-Ströme durch Desipramin wurde anhand des etablierten Oozytenmodells, des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, sowie der Voltage Clamp-Methode untersucht. Für die akute Blockade in Oozyten zeigte sich ein IC_{50} -Wert von $50,1\mu M$, in stabil mit hERG transfizierten HEK-Zellen lag dieser bei $11,9\mu M$. Es ließ sich weiterhin beobachten, dass diese akut ausgelöste Blockade in Oozyten teilweise, an HEK-hERG-Zellen vollständig, durch Auswaschen aufgehoben werden konnte. Weitere Untersuchungen belegten eine Dosis- sowie eine Frequenzabhängigkeit der Blockade. Ferner zeigten Versuche mit den hERG-Mutanten Y652A und F656A eine deutliche Abnahme der Blockade. Dies ließ den Schluss zu, dass es sich hierbei um wichtige pharmakologische Bindungsstellen handelt. Als weiterer Aspekt konnte mittels Western Blot eine Desipramin-abhängige Reduktion des hERG-Kanalproteins auf der Zelloberfläche festgestellt werden. Hierbei konnte ein akuter Mechanismus ermittelt werden, bei dem die Kanäle nach kurzer Inkubation mit Desipramin (bis zu 120 Minuten) aus der Zellmembran entfernt werden. Weiterhin zeigte sich ein chronischer Effekt, bei dem die hERG-Proteine im Endoplasmatischen Retikulum akkumulieren und nicht mehr zur Zellmembran transportiert werden. Beide zuvor beschriebenen Mechanismen führen des Weiteren zu einer Stromreduktion. Dies konnte mittels Patch Clamp-Technik dargelegt werden. Ferner zeigten Messungen an isolierten Meerschweinchenkardiomyozyten ein verlängertes kardiales Aktionspotential nach der Applikation von Desipramin.

Als vierter Mechanismus konnte die hERG-abhängige Induktion von Apoptose durch Desipramin, mittels MTT-Test und Cleaved-PARP-Färbung, nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurden vier potentiell kardiotoxische Effekte im Zusammenhang mit Desipramin identifiziert: Akute Inhibition des hERG-Kaliumstroms, akute hERG-

Proteinreduktion auf der Zellmembran, chronische Inhibition des Proteintransports zur Zellmembran sowie die Induktion von Apoptose.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des hERG-Kanals in Bezug auf die Induktion von Apoptose in Tumorzellen genauer untersucht. Bei einigen Tumortypen konnte bereits im Vorfeld dieser Arbeit eine gesteigerte Expression des hERG-Kanals nachgewiesen werden. Hierzu zählen unter anderem das Kolonkarzinom, Mamma-Karzinom und das Glioblastom. Die Experimente wurden daher an LNT-229- und U87MG-Kulturzellen des humanen Glioblastoms durchgeführt. Als pharmakologische Substanz wurde hauptsächlich der Alphablocker Doxazosin verwendet, bei dem eine hERG-Blockade durch frühere Publikationen bereits bekannt war. Die Apoptose wurde mittels XTT-Test, TUNEL und Annexin V-FITC-Assay untersucht. Für beide Zelllinien konnte bezogen auf die Apoptose ein dosis- und zeitabhängiger Effekt ermittelt werden (LNT-229 $IC_{50} = 35,7\mu M$). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot die intrazelluläre Signalkaskade beleuchtet, die für die Induktion der Apoptose verantwortlich ist. Dabei zeigte sich eine Abnahme und Phosphorylierung von EphA2 und p38MAPK, eine Dephosphorylierung der Focal Adhesion Kinase, eine Erhöhung von GADD153 sowie eine Aktivierung der Caspasen 9, 7 und 3. Ebenso konnte belegt werden, dass PARP gespalten wird. Des Weiteren konnte, wie bereits zuvor anhand von Desipramin gezeigt wurde, auch für Doxazosin eine Reduktion des hERG-Kanals auf der Zelloberfläche von Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Knock-Down des hERG-Proteins mittels siRNA führte ebenfalls zu einer verminderten Zellviabilität. Zusätzlich konnte durch Doxazosin ein Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase hervorgerufen werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass Doxazosin in LNT-229- sowie in U87MG-Zellen Apoptose induziert, die über unterschiedliche Nachweismethoden bestätigt werden konnte. Ferner wurden die Zellen in der G_0/G_1 -Phase arretiert und somit das Zellwachstum vermindert. Insgesamt könnte also eine pharmakologische Blockade des hERG-Kanals durch Doxazosin das Wachstum eines Glioblastoms durch Apoptose, Autophagie und verminderte Zellteilung verlangsamen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen, welche Bedeutung dem hERG-Kanal einerseits auf der Ebene der Regulation der zellulären Erregbarkeit und andererseits auf der Ebene der Zellmigration und Zellviabilität zukommt. Daher sollten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse in Tiermodellen elektrophysiologisch, kardiologisch und onkologisch überprüft werden. Der hERG-Kanal könnte ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Tumorthérapien sein, jedoch muss auch hierbei eine mögliche pro-arrhythmische Wirkung durch die hERG-Blockade in Betracht gezogen und abgewogen werden. Für eine mögliche klinische Anwendung müssen deshalb noch zusätzliche Arbeiten erfolgen, die den Mechanismus und die Effekte in vivo weiter aufklären.