

Nadine Vonderlin
Dr. med.

Die adrenerge Regulation des humanen atrialen Kaliumkanals Kv1.5 sowie seine pharmakologische Inhibition durch das Anästhetikum Midazolam

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: PD Dr. med. Eberhard Scholz

Die „delayed rectifier“ sind verzögert gleichrichtende, spannungsabhängige Kaliumkanäle, die eine wichtige Rolle in der Repolarisation humaner Kardiomyozyten spielen. Der Kv1.5-Kanal bildet die α - Untereinheit der ultraschnell aktivierenden Komponente (I_{Kur}) und wird im Gegensatz zu den anderen „delayed rectifiern“ selektiv im Atrium exprimiert. Aus diesem Grund wird ihm eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie und Therapie von Vorhofflimmern (VHF) zugesprochen. VHF ist die häufigste Arrhythmie des Erwachsenen in westlichen Industrienationen. Mutationen des Kv1.5- Gens können sowohl über einen Funktionsverlust als auch über eine -zunahme zu einer Modulation des I_{Kur} führen und VHF auslösen. Folglich kommt dem I_{Kur} bzw. seiner molekularen Basis eine wichtige Funktion in der Repolarisationsphase des atrialen Aktionspotenzials zu. In den vergangenen Jahren ist das Interesse an der Entwicklung von Antiarrhythmika, die selektiv I_{Kur} inhibieren, stetig gestiegen. Diese würden erwartungsgemäß nur die atriale Repolarisation und Refraktärzeit verlängern ohne proarrhythmische Effekte auf den Ventrikel, wie z.B. eine Verlängerung der QT- Zeit, zu implizieren. Die regulatorischen und kinetischen Eigenschaften des Kv1.5-Kanals können durch Koassemblierung mit akzessorischen β - Untereinheiten modifiziert werden. In humanen Kardiomyozyten scheint die α - adrenerge Regulation, die zu einer Reduktion des I_{Kur} führt, über die Protein Kinase C (PKC) vermittelt zu werden.

In Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch eine Koexpression der Kv β 1.2-Untereinheit mit dem Kv1.5- Kanal die α - adrenerge Stimulation potenziert wird. Um zu untersuchen welche der elf PKC- Isoformen für die Vermittlung des Effekts verantwortlich ist, wurde der Kv1.5/Kv β 1.2- Kanalkomplex heterolog in *Xenopus*- Oozyten exprimiert und mit Hilfe der „Voltage- Clamp“- Technik untersucht. Der Einsatz verschiedener PKC- Modulatoren führte zu einem eindeutigen Ergebnis: PKC β II ist die relevante PKC- Isoform, die für die α - adrenerge Regulation des Kv1.5/Kv β 1.2- Kanalkomplexes verantwortlich ist. Ergänzende Versuche mit siRNAs, die spezifisch die Expression einzelner PKC- Isoformen inhibieren, bestätigten das Ergebnis. Das Aufzeigen der Isoenzym- spezifischen Signaltransduktion trägt wesentlich zum Verständnis der differentiellen Regulation des Kv1.5/Kv β 1.2- Kanalkomplexes bei und könnte ein weiterer Schritt in der Entwicklung einer strukturell neuen Klasse von Antiarrhythmika sein.

Das „*human ether- à- go- go- related gene*“ (hERG) kodiert für die α - Untereinheit der schnellen Komponente der „delayed rectifier“ I_{Kr} . Aufgrund seiner besonderen kinetischen Charakteristik wird dem I_{Kr} eine wichtige Rolle in der Repolarisation und deren Beendung zugetragen. Neben angeborenen, hereditären können auch erworbene Formen, die oftmals iatrogen induziert sind, zu einer Störung des I_{Kr} führen. Im Elektrokardiogramm wird diese als verlängerte QT- Zeit sichtbar und führt typischerweise über die Ausbildung kreisender

Erregungen zu Arrhythmien des Torsade de Pointes- Typ. Die besondere molekulare Struktur hERGs favorisiert die Bindung chemischer Substanzen. Dabei spielen zwei aromatische Residuen (Y652 und F656) der S6- Domäne hERGs, die in die Kanalpore hineinragen, eine besonders wichtige Rolle.

Midazolam wird dank seiner favorablen Charakteristika weitverbreitet verwendet: Neben der Induktion und Aufrechterhaltung der Anästhesie wird es zur Therapie des Status epilepticus oder bei psychiatrischen Notfällen eingesetzt. Zudem findet Midazolam zunehmend vor und während interventionellen Eingriffen, wie z.B. elektrophysiologischen Untersuchungen, Anwendung. Trotz des verbreiteten Einsatzes wurde bislang keine systematische Analyse der elektrophysiologischen Effekte von Midazolam auf kardiale Ionenkanäle durchgeführt. Aus diesem Grund wurden die inhibitorischen Eigenschaften des Anästhetikums auf die wichtigen repolarisierenden kardialen Kaliumkanäle Kv1.5 und hERG untersucht.

Die Analyse ergab keine klinisch relevanten Veränderungen der Kanalkinetik sowohl des Kv1.5- als auch des hERG- Kanals. Bei beiden Kanälen war der Midazolam vermittelte Block nicht frequenzabhängig. Obwohl dies eher proarrhythmische Eigenschaften impliziert, wird Midazolam mit solchen Nebenwirkungen bisher nicht assoziiert. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Medikamente wie Midazolam, die mehrere Kanäle – insbesondere Kalziumkanäle – inhibieren („multi- channel“- Inhibitoren) eher ein günstiges, antiarrhythmisches Profil aufweisen. Das Wirkprofil Midazolams konnte durch Experimente an den zwei hERG- Porenmutanten Y652A und F656A weiter spezifiziert werden. Die Resultate demonstrierten, dass beide aromatischen Residuen eine wichtige Rolle in der Kanalbindung Midazolams spielen. Die Inhibition beider Kanäle durch Midazolam war konzentrationsabhängig. Um physiologisch relevantere Daten zu erhalten, wurden „Patch-Clamp“- Versuche an HEK- Kulturzellen durchgeführt, die stabil mit Kv1.5- bzw. hERG- DNA transfiziert worden waren. Der ermittelte IC_{50} war mit $17.42 \mu\text{mol/l}$ für den Kv1.5- Kanal relativ hoch und immerhin $10 \mu\text{mol/l}$ Midazolam waren notwendig um den hERG- Strom um $48.69 \pm 3.68 \%$ zu reduzieren. Somit liegen beide Werte über den klinisch gemessenen Midazolam- Konzentrationen. Allerdings kann bei Patienten mit einem veränderten Metabolismus (wie z.B. einer Hemmung der CYP- Enzyme), die gleichzeitig eine erhöhte Vulnerabilität für Rhythmusstörungen aufweisen, eine klinische Relevanz nicht völlig ausgeschlossen werden. Um eine bessere physiologische Vergleichbarkeit zu gewährleisten, sollten die Ergebnisse durch *in vitro* und *in vivo* Experimente weiter vertieft werden.

Neben der „klassischen“ Inhibition – dem direkten Kanalblock – beeinflussen manche Kanalblocker durch eine subakute Inhibition zusätzlich das „channel trafficking“ der Kanäle. Durch immunochemische Techniken (Immunostaining bzw. Western Blot), die an Zellkulturlinien durchgeführt wurden, konnte ein solcher Einfluss Midazolams bei beiden Kaliumkanälen ausgeschlossen werden.