

Manuel Kraft  
Dr. sc. hum

## **Transkriptionelle Regulation und Pharmakologische Modulation des Zwei-Porendomänen Kaliumkanals TASK-1**

Fach: Innere Medizin  
Doktormutter: Prof. Dr. med. Constanze Schmidt

Vorhofflimmern ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung mit einer Prävalenz von 4 % in der westlichen Bevölkerung. Auf Grund des demographischen Wandels ist jedoch mit einem immer häufigeren Auftreten von Vorhofflimmern zu rechnen. Trotz dieser weiten Verbreitung sind die momentanen Behandlungsmöglichkeiten ungenügend, da sie entweder mit starken Nebenwirkungen oder einer mangelnden Wirkung assoziiert sind. In den letzten Jahren konnte jedoch mit dem TASK-1-Kaliumionenkanal eine neue Zielstruktur identifiziert werden, die auf Grund der fast ausschließlichen Expression im Vorhof und der Hochregulation unter Vorhofflimmern eine vorhofspezifische Vorhofflimmertherapie ermöglicht. Im Schweinemodell des Vorhofflimmerns konnte mit A293, einem experimentellen TASK-1-Inhibitor, und Doxapram, einem bereits zugelassenen Medikament zur Atemantriebssteigerung, deutliche Erfolge in der Terminierung und Suppression von Vorhofflimmern erzielt werden. Auf diesen Ergebnissen aufbauend und um ein tieferes Verständnis der ablaufenden pathophysiologischen Prozesse zu bekommen, wurde in dieser Arbeit zum einen die transkriptionelle Regulation von TASK-1 durch miRNAs untersucht, zum anderen die Modulation von TASK-1 durch Doxapram und seinem Metaboliten Ketodoxapram pharmakologisch und elektrophysiologisch charakterisiert.

Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von TASK-1 wurden Herzohrproben von 61 Patienten gesammelt und die Expression ausgewählter miRNAs mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert und nach Rhythmusstatus stratifiziert. Hierbei konnten fünf miRNAs (miR-9, miR-23a, miR-28, miR-34a und miR-124) identifiziert werden, die eine hohe Prävalenz aufwiesen und im Vergleich von Sinusrhythmus zu Vorhofflimmern signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Eine weitere Untersuchung dieser fünf miRNAs zeigte, dass die Transfektion von Imitatoren und Inhibitoren in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen zu einer veränderten Expression von TASK-1 auf mRNA-, quantifiziert mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, und Proteinebene, bestimmt mittels Western Blot, führt. In elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten führte miR-34a zu einer vermehrten Expression von TASK-1 und damit einem höheren Kaliumstrom und einem negativeren Ruhemembranpotential. Bei einer Untersuchung von zirkulierender miR-34a auf ihre Eignung als potenzieller Biomarker hin konnte unter Vorhofflimmern eine signifikant höhere Expression beobachtet werden und auch ein Zusammenhang mit einer verstärkten TASK-1-Expression. Eine Cluster-Analyse der miRNA-Expression und klinischen Parametern der Patienten enthüllte eine Gruppe von miRNAs (miR-1, miR-9, miR-21, miR-23a, miR-25, miR-29b, miR-34a, miR-124 und miR-485), die mit Myokarddilatation und Vorhofflimmerstatus signifikant assoziiert sind.

Die elektrophysiologische Charakterisierung von Doxapram und Ketodoxapram mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus laevis* Oozyten enthüllte eine ausgeprägte Inhibition des humanen TASK-1 im sehr niedrigen Konzentrationsbereich für beide Substanzen (0,81  $\mu$ M Ketodoxapram; 0,98 $\mu$ M Doxapram) und auch der porcine TASK-1 wurde in einem ähnlichen Konzentrationsbereich der Substanzen inhibiert. Eine Untersuchung des Effekts auf weitere atriale Kaliumkanäle und die Mitglieder der Zwei-Porendomänen-Kanalfamilie zeigte nur einen ausgeprägten Effekt auf den TASK-3-Kanal, der im humanen Herzen nicht exprimiert wird, und weist auf eine sehr selektive Inhibition im Atrium hin. In Patch-Clamp-Untersuchungen an frisch isolierten humanen Kardiomyozyten war der bereits beschriebene Effekt von erhöhten TASK-1-Strömen in Zellen von Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zum Sinusrhythmus zu erkennen, wodurch dessen Hochregulation in diesem Kollektiv bestätigt werden konnte. Mit Hilfe einer nach Leitlinien der FDA und EMA validierten bioanalytischen Messmethode (UPLC-MS/MS) wurde zur pharmakologischen Charakterisierung in Schweinen die Pharmakokinetik nach intravenöser Einmalgabe von 1 mg/kg Doxapram und Ketodoxapram bestimmt, sowie die Proteinbindung und das Gehirn-zu-Plasma-Verhältnis. Hierbei konnte für Ketodoxapram im Vergleich zu Doxapram eine deutlich reduzierte Verfügbarkeit im zentralen Nervensystem, ein Hinweis auf weniger zentralnervöse Nebenwirkungen, beobachtet werden und eine sehr hohe Proteinbindung von 99 %, die bei Doxapram mit 96 % geringer ist. Die Bestimmung der Halbwertszeit lag mit Werten von 1,7 h für Ketodoxapram und 1,4 h für Doxapram in einem ähnlichen Bereich. Nach intravenöser Bolusgabe von Doxapram und Ketodoxapram konnte in narkotisierten Schweinen ein akuter Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks beobachtet werden, der unter chronischer Anwendung nicht beobachtet wurde.

In Folge der positiven Ergebnisse der elektrophysiologischen und pharmakologischen Charakterisierung von Ketodoxapram im Vergleich zu Doxapram wurde die Anwendung von Ketodoxapram im Schweinmodell des Vorhofflimmerns getestet und es konnte eine reduzierte Vorhofflimmerlast sowie eine Verlängerung der atrialen effektiven Refraktärzeit gemessen werden. Auch kam es unter der akuten Anwendung von Ketodoxapram zur Terminierung von Vorhofflimmern.

Zusammengefasst zeigte sich, dass die miR-34a einen bedeutenden Anteil an der Regulation der TASK-1-Expression hat und das Ketodoxapram seiner Muttersubstanz Doxapram sehr ähnlich ist, aber entscheidende Vorteile in Bezug auf Verfügbarkeit im zentralen Nervensystem hat. Auch konnte eine ausgeprägtere Inhibition von TASK-1 gezeigt werden, die der von Doxapram überlegen ist. Somit konnte Ketodoxapram als ideale Substanz für eine TASK-1 basierte Vorhofflimmertherapie identifiziert werden.