

Edgar Zitron
Dr. med.

Die antagonistische Regulation des humanen kardialen Kir2.2-Kaliumkanals durch die Proteinkinasen A und C

Geboren am 01.03.1977 in Jassy/Rumänien
Staatsexamen am 23.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Johann Kiehn

Der Kir2.2-Kaliumkanal bildet gemeinsam mit dem eng verwandten Kir2.1-Kanal die wesentliche molekulare Grundlage des I_{K1} -Stroms im menschlichen Herz. Dieser einwärts gleichrichtende Strom ist essentiell für die Stabilisierung des Ruhepotentials von Kardiomyozyten und für die Schlussphase der kardialen Repolarisation. Bei Patienten, die aufgrund eines Andersen-Syndroms (Langes QT-Syndrom Typ 7) eine reduzierte I_{K1} -Stromdichte aufweisen, kommt es infolgedessen zu einer Häufung ventrikulärer Extrasystolen mit konsekutiven ventrikulären Tachykardien. Es ist aber auch bekannt, dass die Blockade des I_{K1} -Stroms eine antiarrhythmische Wirkung haben kann und dass einige Antiarrhythmika den I_{K1} -Strom inhibieren.

Eine Abnahme des I_{K1} -Stroms ist auch akut unter adrenerger Stimulation und chronisch bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz als Teil des „electrophysiological remodeling“ beobachtet und als eine Grundlage gehäufeter ventrikulärer Arrhythmien gedeutet worden. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, insbesondere die Beteiligung von Proteinkinasen, sind zu Teilen noch unklar. Die adrenergen Signaltransduktionskaskaden beinhalten an zentralen Stellen eine Aktivierung der Proteinkinasen A und C. Zudem wird der Proteinkinase C eine wichtige Rolle im „remodeling“ des insuffizienten Myokards zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Abnahme des I_{K1} -Stroms führt und der zugrunde liegende Mechanismus konnte aufgeklärt werden. In nativen Kardiomyozyten, die aus menschlichen Herzhoren isoliert wurden, wurde mit der Patch-Clamp Technik eine ausgeprägte Inhibition des I_{K1} -Stroms nach der Aktivierung von Proteinkinasen durch den Phorbolester PMA beobachtet. Dieser Effekt konnte an Kir2.2-Kanälen im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem reproduziert werden, wobei detaillierte pharmakologische Experimente auf eine zentrale Rolle der Proteinkinase C (PKC) in der beobachteten Regulation hinwiesen. Daher wurden durch gezielte Mutagenese die vier PKC „consensus sites“ des Kir2.2-Kanals inaktiviert, um die molekulare Grundlage dieser Regulation zu klären. So konnte gezeigt werden, dass eine direkte Phosphorylierung des Kanalproteins durch die Proteinkinase C an den Aminosäuren Threonin-38, Serin-64 und Threonin-353 der Inhibition zugrunde lag.

Bei Kir2.2-Kanälen, die über keine funktionellen PKC consensus sites mehr verfügten, bewirkte PMA überraschenderweise eine deutliche Aktivierung des Stroms und besaß damit eine gegensätzliche Wirkung im Vergleich zu der auf den Wildtyp. In weiteren pharmakologischen Experimenten konnte demonstriert werden, dass dieser Effekt auf der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) beruhte. In Kir2.2-Mutanten, in denen die einzige

PKA „consensus site“ bei Serin-430 inaktiviert worden war, wurde jedoch der gleiche Effekt beobachtet. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass es zu keiner direkten Phosphorylierung des Kanalproteins kommt, sondern dass weitere Strukturen zwischengeschaltet sind.

Die antagonistische Regulation des Kir2.2-Kanals durch die Proteinkinasen A und C ermöglicht einen physiologisch und pathophysiologisch interessanten Einblick in die Steuerung der kardialen Erregbarkeit. Aus klinischer Sicht beleuchten diese Regulationsmechanismen Zusammenhänge zwischen dem veränderten Gleichgewicht der PKC und der PKA bei Stress, adrenerger Stimulation und dem „electrophysiological remodeling“, sowie dem gleichzeitig gehäuften Vorkommen von Rhythmusstörungen.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Wirkungsmechanismus des neuen Klasse III Antiarrhythmikums Bertosamil, das sich derzeit in der präklinischen Phase der Medikamentenentwicklung befindet, genauer aufgeklärt. Die therapeutische Wirkung von Bertosamil auf ventrikuläre Rhythmusstörungen, die im Tierexperiment beobachtet worden war, konnte durch die bereits charakterisierten pharmakologischen Effekte nicht hinreichend erklärt werden. Daher wurde die Hypothese untersucht, dass Bertosamil ähnlich wie andere Antiarrhythmika der Klasse III eine Inhibition von Kir2-Kanälen induziert.

Die Untersuchung der Wirkung von Bertosamil auf Kaliumkanäle im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem zeigte jedoch, dass Bertosamil den Kir2.2-Strom nicht beeinflusste. Hingegen kam es bei therapeutisch relevanten Konzentrationen zu einer Blockade von HERG-Kanälen, welche als molekulares Korrelat des „delayed rectifier“ Kaliumstroms im menschlichen Herz den wichtigsten pharmakologischen Angriffspunkt klinisch eingesetzter Antiarrhythmika der Klasse III darstellen. HERG-Kanäle wurden im offenen und im inaktivierten Zustand, nicht aber im geschlossenen Zustand blockiert. Bertosamil induzierte eine Verschiebung der Aktivierungskurve des HERG-Stroms in Richtung negativerer Potentiale und führte zu einer Beschleunigung der Inaktivierung. Der inhibitorische Effekt war bei positiven Potentialen abgeschwächt. Eine Frequenzabhängigkeit des Blocks wurde nicht beobachtet. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass zum Wirkungsprofil von Bertosamil eine Blockade von HERG-Kanälen gehört, deren Eigenschaften denen anderer Antiarrhythmika der Klasse III ähneln.

Die Ergebnisse dieser Dissertation konnten neue Befunde zur Erforschung der Pathophysiologie und Therapie kardialer Rhythmusstörungen beitragen. Insbesondere die antagonistische Regulation des Kir2.2-Kanals durch die Proteinkinasen A und C könnte als neuer Ansatzpunkt für die pharmakologische und genterapeutische Behandlung von Arrhythmien dienen.