

Daniel Christian Scherer

Dr. med.

## **Die Regulation des kardialen $I_{K1}$ -Stroms durch die Proteinkinase C $\beta$ und $\beta_3$ -Adrenozeptoren**

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Christoph A. Karle

Der einwärts gleichrichtende Kaliumstrom  $I_{K1}$  besteht auf molekularer Ebene aus heteromeren Kanälen, die sich aus Kir2.1, Kir2.2 und - zu einem geringeren Anteil - Kir2.3 Kanaluntereinheiten zusammensetzen. Er ist durch seine elektrophysiologischen Eigenschaften von entscheidender Bedeutung für die Stabilisation des Membranpotentials in vielen erregbaren Geweben. Am Herzen ist er zudem beteiligt an der terminalen Repolarisation des Aktionspotentials. Wie der Phänotyp des Andersen-Syndroms (Langes QT-Syndrom 7) demonstriert, ist eine Reduktion des  $I_{K1}$ -Stroms arrhythmogen. Interessanterweise ist jedoch auch eine gesteigerte  $I_{K1}$ -Stromdichte, wie sie beim Kurzen QT-Syndrom 3 (SQT3) beobachtet wird, mit Arrhythmien assoziiert. Diese Krankheitsbilder, die klinisch mit ventrikulären Tachykardien und plötzlichem Herztod symptomatisch werden können, demonstrieren anschaulich die rhythmologische Bedeutung des  $I_{K1}$ -Stroms.

Es ist gezeigt worden, dass adrenerge Signaltransduktion über Adrenozeptoren und Serin/Threonin-Proteinkinasen wie die Proteinkinasen A und C mit einer Inhibition des  $I_{K1}$ -Stroms assoziiert ist. Eine reduzierte  $I_{K1}$ -Stromdichte gilt zudem als charakteristisch für die zellulären Remodelingvorgänge im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz, wobei ebenfalls die adrenergen Signaltransduktionskaskaden chronisch überstimuliert sind und zur Krankheitsprogression beitragen. Diese Zustände prädisponieren zum Auftreten von ventrikulären Rhythmusstörungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der Inhibition des  $I_{K1}$ -Stroms durch die Proteinkinase C (PKC) untersucht. Im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem wurde der Kir2.2 Kanal als die molekulare Zielstruktur der PKC bestätigt. Diese Regulation wird vermittelt über 2 der insgesamt 4 PKC „consensus sites“ in der Sequenz des Kir2.2 Kanals: Serin-64 und Threonin-353. Als insensitive gegenüber einer Regulation durch die PKC stellte sich der Kir2.1 Kanal heraus. Kir2.1/Kir2.2 Kanalheteromere, die das wesentliche molekulare

Korrelat des  $I_{K1}$ -Stroms darstellen, wurden nach Koexpression von Kir2.1 und Kir2.2 in *Xenopus* Oozyten ebenfalls durch die PKC inhibiert. Die beobachtete Stromabnahme war hier weitaus stärker ausgeprägt, als es der errechnete Anteil an PKC-sensitiven Kir2.2 Homomeren hätte erwarten lassen. Ergänzend zur Methode der Koexpression der einzelnen Kanäle wurden Kir2.1-Kir2.2 Konkatemere verwendet, die das Vorhandensein von homomeren Kir2.2 Kanälen ausschließen. Der inhibitorische Effekt auf den Strom der Kir2.1-Kir2.2 Konkatemere war mit dem Effekt auf die koexprimierten Heteromere vergleichbar. Dies ist am besten vereinbar damit, dass Kir2.2 Kanaluntereinheiten als Bestandteil eines Kir2.1/Kir2.2 Heteromers dessen PKC-Sensitivität vermitteln. Die Anzahl der PKC-Phosphorylierungsstellen im Heteromer, definiert durch die funktionellen „consensus sites“ in der Kir2.2 Untereinheit, ist dabei für die Ausprägung des Effektes maßgeblich. Auf diese Weise könnte *in vivo* ein heteromerer Kir2.x Kanal schon dann sensitiv gegenüber der PKC sein, sobald er eine einzige Kir2.2 Untereinheit besitzt. Dieses Modell lässt sich gut in Einklang bringen mit einer fast vollständigen Inhibition des nativen  $I_{K1}$ -Stroms durch den PKC-Aktivator Thymeleatoxin, wie sie in den Patch-Clamp Experimenten an ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte und der Maus beobachtet wurde.

In der Regulation des Kir2.2 Kanals wurde durch die Anwendung spezifischerer pharmakologischer Substanzen eine bedeutende Rolle „konventioneller“ PKC-Isoenzyme, vor allem des PKC $\beta$ -Isoenzym, demonstriert. In ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte konnte die fast vollständige Blockade des  $I_{K1}$ -Stroms durch den Aktivator „konventioneller“ PKC-Isoenzyme Thymeleatoxin durch die Koapplikation eines pharmakologischen PKC $\beta$ -Inhibitors aufgehoben werden. In Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen zeigte sich ebenfalls eine deutliche Inhibition des  $I_{K1}$ -Stroms durch Thymeleatoxin, wohingegen dieser Effekt in Kardiomyozyten einer Mauslinie mit einem globalen PKC $\beta$ -„knockout“ aufgehoben war. Dies illustriert die Bedeutung des PKC $\beta$ -Isoenzym in der inhibitorischen Regulation des  $I_{K1}$ -Stroms durch die PKC.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Regulation der Kir2.x Kanäle durch den  $\beta_3$ -Adrenozeptor untersucht. Die Signaltransduktion von  $\beta_3$ -Adrenozeptoren ist komplex und beinhaltet die Proteinkinasen A und C, welche mit einer Regulation des  $I_{K1}$ -Stromes assoziiert worden sind. Im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem zeigte sich eine ausgeprägte Aktivierung von Kir2.1 und Kir2.2 Ströme durch Stimulation von  $\beta_3$ -Adrenozeptoren, während Kir2.3 Ströme nicht reguliert wurden. Interessanterweise bedingte im Fall von Kir2.1 Kanälen ein PKC-abhängiger, im Fall von Kir2.2 Kanälen ein PKA-abhängiger Signalweg diesen Effekt. Auch die heteromeren Kanäle wurden durch  $\beta_3$ -Adrenozeptoren

aktiviert und zeigten eine deutliche Stromzunahme, welche *in vivo* beteiligt sein könnte an einer Verkürzung des kardialen Aktionspotentials. Ebenso könnte ein verstärkter Strom der Kir2.x Kanäle *in vivo* eine Hyperpolarisation favorisieren, was beispielweise an Gefäßen eine Vasodilatation zur Folge hätte.

Die Ergebnisse dieser Dissertation tragen zum Verständnis der Pathophysiologie adrenerg getriggelter Arrhythmien bei. Insbesondere in der Bedeutung des PKC $\beta$ -Isoenzym für die Inhibition des kardialen I<sub>K1</sub>-Stroms liegt ein interessanter Ansatzpunkt für die Evaluation neuer pharmakologischer Zielstrukturen in der Behandlung solcher Arrhythmien.