

Ann-Kathrin Rahm

Dr. med.

## **Regulationsmechanismen des Zwei-Porendomänen-Kaliumkanals TRESK ( $K_{2P18.1}$ )**

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dierk Thomas

Der humane  $K_{2P18.1}$ -Kanal und sein Ortholog im Zebrafisch ( $zK_{2P18.1}$ ) gehören zur Familie der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle. Die Erforschung dieser Kanäle hat in den letzten Jahren stetig an Bedeutung gewonnen. Sie sind verantwortlich für Kalium-Hintergrundströme, die das Ruhemembranpotential stabilisieren und dadurch die Dauer und Frequenz von Aktionspotentialen beeinflussen. Die Regulation dieser Kanäle stellt einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle der zellulären Erregbarkeit dar.  $K_{2P18.1}$  ist dabei besonders in neuronalem Gewebe von Bedeutung. Eine loss-of-function Mutation des  $hK_{2P18.1}$ -Kanals konnte assoziiert werden mit einer familiären Form der Migräne. Ebenso spielt dem  $hK_{2P18.1}$ -Kanal auch in der Pathophysiologie der Schmerzentstehung eine Rolle. Kardial scheint der Kanal keine nennenswerte Relevanz zu besitzen. Die Untersuchung der Regulation des  $K_{2P18.1}$ -Kanals ist für das funktionelle Verständnis und zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien erforderlich.

Das primäre Ziel der Arbeit war es, die Proteinkinase C (PKC)-abhängige Regulation des  $hK_{2P18.1}$ -Kanals zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass der Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu einer signifikanten Aktivierung der  $hK_{2P18.1}$ -Ströme führt. Diese Aktivierung konnte durch PKC-Inhibitoren signifikant reduziert werden. Ebenfalls konnte eine Proteinkinase A (PKA)-abhängige Aktivierung des Kanals bestätigt werden. Durch ein Mutagenese-Screening, in dem selektiv als potentielle Phosphorylierungsstellen identifizierte Serin- und Threoninreste zu Alanin mutiert wurden, konnte gezeigt werden, dass acht potentielle Phosphorylierungsstellen nicht für eine PKC-abhängige Phosphorylierung des Kanals verantwortlich sind. Weiterhin wurden als mögliche Intermediärproteine der PMA-abhängigen Kanalaktivierung die Phosphatase Calcineurin und Diazylglyzerolkinasen (DGK) untersucht. Die Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A zeigte keinen Effekt auf die PMA-abhängige Aktivierung, jedoch konnte eine Inhibition der DGK eine signifikante Reduktion der  $hK_{2P18.1}$ -Aktivierung bewirken. Auch der Phosphoinositol (PI)-Kinase Inhibitor Wortmannin zeigte eine signifikante Reduktion der PMA-abhängigen Stromaktivierung. Diese Ergebnisse zusammen mit der Kanalaktivierung durch Phospholipase C (PLC)-Inhibitoren betrachtet, führten indirekt zu dem Schluss, dass  $hK_{2P18.1}$  analog zu anderen  $K_{2P}$ -Kanalfamilienmitgliedern durch  $PIP_2$  aktiviert wird

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das häufig verwendete Migränetherapeutikum Sumatriptan keinen direkten Effekt auf die hK<sub>2P</sub>18.1-Kanalaktivität hat.

Schließlich wurde das Kanalortholog zK<sub>2P</sub>18.1 des Zebrafisches untersucht, um den Zebrafisch als Modellorganismus für zukünftige medizinische K<sub>2P</sub>18.1-Studien zu evaluieren. Der Zebrafisch ist bereits ein etablierter Modellorganismus für kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen des Menschen. Auch in Hinblick auf die Pathophysiologie von Schmerzen wurde der Zebrafisch als adäquater Modellorganismus postuliert und kann für das Screening von „small molecules“ auf pharmakologisch relevante Eigenschaften dienen. Der zK<sub>2P</sub>18.1-Kanal steuert ebenso wie sein humanes Ortholog kaliumselektive Hintergrundleitfähigkeiten. Wichtige Übereinstimmungen und Unterschiede in der Regulation des humanen Kanals im Vergleich zu seinem Zebrafischortholog konnten herausgearbeitet werden: Die Regulation durch PKA, PKC und die Sensitivität für Bariumionen und Arachnidonsäure war vergleichbar zwischen den Spezies. Der zK<sub>2P</sub>18.1-Kanal zeigte jedoch keine NFAT-ähnliche Bindungsstelle in der intrazellulären Domäne, was eine fehlende Aktivierung durch ein intrazelluläres Kalziumsignal via Calcineurin zur Folge hatte.

Das K<sub>2P</sub>18.1-Expressionsmuster im Zebrafisch wurde durch Anti-Sense *in-situ*-Hybridisierung untersucht. Es zeigte sich eine vorrangige Expression in zerebralen Strukturen des Zebrafisches. Eine kardiale Expression und eine Expression im Rückenmark konnten nicht festgestellt werden. Übereinstimmungen zwischen der Regulation des humanen und des Zebrafisch-K<sub>2P</sub>18.1-Kanals suggerieren, dass der Zebrafisch in zukünftigen Studien zur Pharmakologie und Regulation dieses Ionenkanals eingesetzt werden könnte. Signifikante Unterschiede müssten jedoch berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse dieser Dissertation konnten das Verständnis der Regulation des humanen K<sub>2P</sub>18.1-Kanals und seines Zebrafischorthologs erweitern. Insbesondere kann die dargestellte aktivierende Singaltransduktionskaskade zukünftige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Pharmaka zur Beeinflussung von Migräne und anderen Schmerzsyndromen liefern. Es konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass der Zebrafisch unter Berücksichtigung der differentiellen Regulation beider Kanalorthologe mit Einschränkungen als Modellorganismus zum Studium des K<sub>2P</sub>18.1-Kanals eingesetzt werden kann.