

Sebastian Seehausen  
Dr. med.

## **Expressionsanalyse und elektrophysiologische Charakterisierung des Zwei-Porendomänen-Kaliumkanals $K_{2P13.1}$ (THIK-1)**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin  
Doktorvater: Herr apl. Prof. Dr. med. Dierk Thomas

Seit der Entdeckung der Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle mit ihrer Funktion als Stabilisator des Ruhemembranpotentials und Regulator der Aktionspotentialdauer wurde immer mehr die Bedeutung dieser Ionenkanäle für die Arrhythmogenese deutlich. Der humane  $K_{2P13.1}$ -Kanal und das Zebrafisch-Ortholog  $zK_{2P13.1b}$  sind zwei funktionell aktive, kardial exprimierte Vertreter dieser Ionenkanäle, die maßgeblich die Erregbarkeit von Kardiomyozyten regulieren. Durch die kardiale Expression und das Remodeling unter Vorhofflimmern stellt  $hK_{2P13.1}$  ein mögliches Target in der molekular gezielten antiarrhythmischen Therapie der Zukunft dar.

Daher sollte als erstes Ziel dieser Arbeit der Einfluss bereits heute in der Therapie genutzter Antiarrhythmika sowie der Signaltransduktionskaskaden auf  $hK_{2P13.1}$  charakterisiert werden. Hierbei konnte eine Blockade von  $hK_{2P13.1}$ -Strömen durch Klasse-I-Antiarrhythmika wie Mexiletin, Lidocain und Propafenon gezeigt werden.

Mexiletin konnte dabei als einziges Pharmakon zusätzlich die biophysikalischen Eigenschaften von  $hK_{2P13.1}$  verändern. Die Blockade der  $hK_{2P13.1}$ -Ströme setzt ohne Verzögerung ein und ist frequenzunabhängig, mit wirksamen Konzentrationen im *Xenopus laevis*-Expressionssystem von 500 bis 1500  $\mu$ M und einer halbmaximalen Wirkungskonzentration von 356  $\mu$ M. Dies lässt eine direkte Interaktion zwischen Pharmakon und dem Kanalprotein vermuten.

Des Weiteren zeigt sich, dass mehrere weitere Substanzen anderer Wirkklassen  $hK_{2P13.1}$  beeinflussen. Es zeigte sich eine Blockade durch den unselektiven Beta-Blocker Propranolol, sowie die Aktivierung durch die Antiarrhythmika Chinidin und Amiodaron. Insgesamt konnte eine sehr heterogene pharmakologische Regulation experimentell nachgewiesen werden. Weiterhin wird  $hK_{2P13.1}$  durch den Einfluss der Proteinkinase C und Phospholipase C und die assoziierten Signalkaskaden aktiviert. Während der PKC-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu einer 60%-igen Steigerung der  $hK_{2P13.1}$ -Ströme führte, sorgte die Applikation des Phospholipase C-Inhibitors U73122 für eine über die Zeit stärker werdende Inhibition von  $hK_{2P13.1}$ -Strömen. Während der Einfluss der intrazellulären Kalziumkonzentration auf die Ionenströme ausgeschlossen werden konnte, zeigte sich bei der Inkubation des Phosphatidylcholin-spezifischen PLC-Inhibitors D609 eine Aktivierung der  $hK_{2P13.1}$ -Ströme. Somit kommt neben einer Diacylglycerin-vermittelten Proteinkinase C-Aktivierung nur noch der Einfluss von freiem Cholin als möglicher Mechanismus dieser gegensätzlichen Phospholipase C-Regulation in Frage. Neben diesen Einflüssen konnte eine Regulation von  $hK_{2P13.1}$  durch die Proteinkinase A und die Phosphatase Calcineurin, wie sie bei mehreren anderen  $K_{2P}$ -Kanälen der Fall ist, ausgeschlossen werden. Der PKA-Inhibitor KT 5720 und der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A zeigten keinerlei signifikante Effekte nach ausreichender Inkubationszeit.

Ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation des Zebrafisches und des Schweines als Tiermodelle zum Studium der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz von hK<sub>2P</sub>13.1 *in-vivo*. Dieser ist bereits zuvor für das Studium von kardiovaskulären, renalen und hämatopoetischen Erkrankungen etabliert worden sowie in mehreren pharmakologischen und elektrophysiologischen Studien eingesetzt worden. Um die kardiale Expression und damit die grundlegende Relevanz für kardiovaskuläre Studien mit Bezug auf hK<sub>2P</sub>13.1 zu evaluieren, wurde die Expression beider Zebrafisch-Orthologe mittels qPCR-Experimenten an cDNA-Proben bestätigt. Beide Orthologe werden sowohl im ZNS-, als auch im Herzen auf mRNA-Ebene exprimiert.

Aus Zebrafisch-cDNA konnten beide bekannten Zebrafisch-Orthologe des K<sub>2P</sub>13.1-Kanals mittels *nested*-PCR kloniert werden. Beide weisen in ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Raumstruktur eine ausgeprägte Homologie zum humanen Ortholog auf. Während zK<sub>2P</sub>13.1a funktionell inaktiv blieb, produzierte die b-Variante kaliumselektive Hintergrundströme, deren biophysikalische Eigenschaften wie die Strom-Spannungsbeziehung und die pH-Regulation denen des humanen K<sub>2P</sub>13.1-Kanals sehr ähnlich sind. Für den Mechanismus hinter der funktionellen Inaktivität wurde in dieser Arbeit eine intrazelluläre Retention von zK<sub>2P</sub>13.1a beschrieben. Eine Heterodimerbildung mit Veränderung der zK<sub>2P</sub>13.1-Ströme konnte ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde die pharmakologische Regulation von zK<sub>2P</sub>13.1b mit der humanen Variante verglichen. Die Effekte der Klasse-I-Antiarrhythmika Mexiletin und Lidocain, des PKC-Aktivators PMA, des Phospholipase C-Inhibitors U73122 und des unspezifischen Kaliumkanalinhibitors Barium waren alle gleichgerichtet und vergleichbar bei beiden Kanälen, allerdings mit signifikant stärkerer Ausprägung beim humanen K<sub>2P</sub>13.1-Kanal in allen Fällen. Einzig die Aktivierung durch Arachidonsäure ist nicht signifikant unterschiedlich. Die Gemeinsamkeiten der elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der beiden K<sub>2P</sub>13.1-Kanäle lassen den Rückschluss zu, dass der Zebrafisch ein zukünftig geeignetes Tiermodell darstellt, allerdings nur unter der Berücksichtigung der herausgearbeiteten, signifikanten Unterschiede.

Zuletzt wurde im für Vorhofflimmer-Studien etablierten Schweinetiermodell das Remodeling des porcinen K<sub>2P</sub>13.1-Kanals untersucht. Hierbei zeigt sich unter 21-tägigem Vorhofflimmern im Vergleich zum gleichbleibenden Sinusrhythmus eine deutliche Abnahme der Expression von pK<sub>2P</sub>13.1 im rechten Vorhof, ohne dass der Effekt jedoch signifikant ist. Insgesamt bestätigt dies jedoch die Daten aus vorangegangenen Studien, die in humanen Gewebeproben auf mRNA-Ebene eine Reduktion des hK<sub>2P</sub>13.1-Kanals unter persistierendem Vorhofflimmern zeigen konnten, sodass das Schweinetiermodell im Bereich des Remodelings von K<sub>2P</sub>13.1 als geeignetes Tiermodell angesehen werden kann.

Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit erstmals eine grundlegende, breit gefächerte Charakterisierung der pharmakologischen Regulation von hK<sub>2P</sub>13.1 in Bezug auf kardial wirksame Substanzen erarbeitet werden, deren Ergebnis zusammen mit den Erkenntnissen über die gesamte K<sub>2P</sub>-Kanalfamilie zu zukünftigen, neuen und zielgerichteten Pharmakotherapien des Vorhofflimmerns führen sollen. Des Weiteren konnten wichtige Erkenntnisse über neue Mechanismen der Signaltransduktionskaskaden und ihren Einfluss auf hK<sub>2P</sub>13.1 als Beispiel für die gesamte K<sub>2P</sub>-Kanalfamilie gezeigt werden. Abschließend konnte der Zebrafisch, sowie

das Schwein mit Einschränkungen als mögliche Tiermodelle für elektrophysiologische und Remodeling-Studien mit Bezug auf K<sub>2P</sub>13.1 bestätigt werden.