

Nadja Janina Joß

Dr. med.

Die Regulation des kardialen I_{K1} -Stromes durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. E. Zitron

Die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ist eine Serin/Threonin-Kinase, die Zielproteine in Kardiomyozyten im Zuge einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration phosphoryliert. Sie reguliert die Calciumhomöostase in den Kardiomyozyten und hat Einfluss auf die elektromechanische Kopplung, auf Transkriptionsfaktoren und Ionenkanäle und steht damit im Mittelpunkt eines feinabgestimmten Feedback-Regulationssystems in den Kardiomyozyten. In den letzten Jahren ist sie in den Blickpunkt der Aufmerksamkeit gerückt, da sie die Entwicklung von strukturellen Herzerkrankungen, wie Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz, fördert. Außerdem gilt sie als proarrhythmisches Signalmolekül und wirkt bei der Signaltransduktion der Apoptose mit. Bei strukturellen Herzerkrankungen sind die Aktivität und Expression der CaMKII erhöht.

Auf der anderen Seite zeigt sich bei strukturellen Herzerkrankungen eine Erniedrigung repolarisierender Kaliumströme, was eine Ursache für die Verlängerung des Aktionspotentials bei Herzinsuffizienz darstellt. Dies kann zu Nachdepolarisationen und Arrhythmien führen, was die Gefahr eines plötzlichen Herztodes mit sich bringt.

In dieser Dissertation sollten die proarrhythmischen Eigenschaften der CaMKII näher untersucht werden, indem der Einfluss der CaMKII auf den kardialen I_{K1} -Strom experimentell untersucht wurde. Der I_{K1} -Strom wird von den einwärtsgerichteten Kaliumionenkanälen Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3 getragen, er wirkt bei der Repolarisation der Herzmuskelzelle mit und stabilisiert das Ruhemembranpotential.

In einem Oozytenexpressionssystem von *Xenopus laevis* wurden die einwärtsgerichteten Kaliumionenkanäle Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3 als Homotetramere, Heterotetramere und Konkatemere durch Injektion von mRNA auf der Oberfläche der Oozyten exprimiert und der resultierende Strom mit dem Doppelektroden-Voltage clamp-Verfahren gemessen. Nach Inkubation der Oozyten in einer Lösung mit den selektiven CaMKII-Inhibitoren KN93 und KN62 zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme des Stromes beim Kir2.2-Homotetramer und bei den Heterotetrameren und Konkatemeren, an deren Bildung die Kir2.2-Untereinheit beteiligt war. Bei Kir2.1 und Kir2.3 zeigte sich keine signifikante Änderung des Stromes. Daher scheint die CaMKII einen hemmenden Effekt auf die Kir2.2-Untereinheit zu haben, der durch die Hemmung der CaMKII durch KN93 und KN62 aufgehoben wird, wodurch es zu einer Stromzunahme kommt. Die Negativkontrolle KN92 verursachte keine signifikante Zunahme oder Abnahme des Kir2-Stromes.

Weiterhin wurde selektiv der Einfluss der CaMKII auf die Kir2.2-Ionenkanaluntereinheit untersucht. Dazu wurde in Oozyten von *Xenopus laevis* eine Überexpression der CaMKII δ C induziert und gleichzeitig Kir2.2 injiziert. Dann wurde der absolute Strom gemessen und gegen eine Kontrolle mit Kir2.2 alleine verglichen. Dabei zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme des Stromes bei Überexpression der CaMKII δ C im Vergleich zur Kontrolle. Die CaMKII δ C wurde gewählt, da sie neben der CaMKII δ B die vorherrschende Isoform in den Kardiomyozyten ist. Auch bei diesem Experiment bestätigte sich der inhibierende Einfluss der CaMKII auf den I $_{K1}$ -Strom und insbesondere auf den Kir2.2-Ionenkanal.

Um diese Ergebnisse auf Kardiomyozyten von Säugetieren übertragen zu können, wurden Experimente an ventrikulären Kardiomyozyten von Wildtypmäusen und CaMKII γ/δ -Doppel-Knockout-Mäusen durchgeführt. Der I $_{K1}$ -Strom wurde über die Whole cell-Patch clamp-Technik erhoben, die anderen Ströme der Kardiomyozyte wurden durch selektive Inhibitoren gehemmt oder durch das Messprotokoll isoliert.

Bei Aktivierung der CaMKII in Kardiomyozyten von Wildtypmäusen zeigte sich wie schon bei der Überexpression der CaMKII δ C in den Oozyten von *Xenopus laevis* eine signifikante Abnahme des I $_{K1}$ -Stromes. Bei gleichzeitiger Aktivierung der CaMKII und Hemmung der CaMKII zeigte sich auch eine Verringerung des I $_{K1}$ -Stromes, die allerdings nicht so ausgeprägt war wie bei reiner Aktivierung der CaMKII. Mit diesem Experiment konnte daher auch der hemmende Einfluss der CaMKII auf den I $_{K1}$ -Strom von Säugetierkardiomyozyten bestätigt werden.

Die Kardiomyozyten von CaMKII γ/δ -Doppel-Knockout-Mäusen zeigten beim Einwaschen von Forskolin keine signifikante Zu- oder Abnahme des I $_{K1}$ -Stromes. Dadurch konnte bewiesen werden, dass Forskolin keinen direkten Effekt auf Kir2.x-Ionenkanäle hat und die Abnahme des I $_{K1}$ -Stromes bei den Wildtyp-Mauskardiomyozyten von einer Aktivierung der CaMKII durch Forskolin herrührt. Weiterhin kann man daraus schließen, dass die CaMKII γ und die CaMKII δ mitverantwortlich für die Regulation des I $_{K1}$ -Stromes in Kardiomyozyten sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die CaMKII eine hemmende Wirkung auf den Kir2.2-Ionenkanal und damit den I $_{K1}$ -Strom hat, welche durch Inhibition der CaMKII aufgehoben werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation tragen damit zum Verständnis des arrhythmogenen Potentials der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II bei. Die CaMKII gilt als pharmakologisches Zielmolekül der Zukunft, da man der Überexpression und der erhöhten Aktivität bei strukturellen Herzerkrankungen mit einer selektiven Inhibition entgegenreten könnte, die sich auch positiv auf die Entstehung von schweren Arrhythmien mit dem plötzlichen Herztod als Folge auswirken könnte. Daher könnten die Ergebnisse dieser Dissertation einen Beitrag zur Entwicklung neuer Pharmaka leisten.