Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. Otto-Erich Brodde)



Rolle der Proteinkinase C bei der Wirkung antiarrhythmischer Peptide

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stephan Weng geboren am 04.05.1973 in Magdeburg

Betreuer: Prof. Dr. S. Dhein

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. S. Dhein
- 2. Prof. Dr. P. Presek
- 3. Prof. Dr. F. Markwardt

Promotionsverteidigung am 10.12.2003

Meinen Eltern gewidmet

Herzrhythmusstörungen stellen eine häufige Komplikation infolge von Herz-Kreislauferkrankungen dar, die oft einer medikamentösen Therapie bedürfen. Klassische Antiarrhythmika wirken vorwiegend über Ionenkanäle und werden hinsichtlich ihres proarrhythmischen Risikos nur zur Behandlung akut bestehender Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Antiarrhythmische Peptide (AAP) sind eine neuartige Gruppe von synthetischen Oligopeptiden, die ihre Entwicklung vom natürlich vorkommenden Antiarrhythmischen Peptid (AAP_{nat}) nahmen. Durch prophylaktische Gabe Antiarrhythmischer Peptide konnten ischämie-induzierte Herzrhythmusstörungen (z.B. Herzkammerflimmern) verhindert werden, ohne das ein proarrhythmisches Risiko beobachtet wurde. Dieser Effekt beruht auf einer verbesserten Zellkopplung an den Gap Junctions. Dabei kommt es über die Phosphoinositolkaskade zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), und somit zu einer vermehrten Phosphorylierung der Gap Junctions. Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe der Doppel-Zell-Voltage-Clamp-Technik den leitfähigkeitssteigernden Effekt eines Derivates der Antiarrhythmischen Peptide (das AAP10) zu messen, und durch isoformspezifische Hemmung der Proteinkinase C, und außerdem durch Blockierung des trans-Golgi-Apparates, weitere Erkenntnisse über den Signaltransduktionsweg des AAP10 zu erhalten. Die Messung der junctionalen Leitfähigkeit wurde an isolierten adulten Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren vorgenommen. Dazu wurde jede Zelle eines Zellpaares an einen Patch-Clamp-Verstärker angeschlossen, und an beiden Zellen die Whole-Cell-Konfiguration etabliert. Durch Anlegen einer Spannungsdifferenz zwischen den Zellen kommt es zum Stromfluß über den junctionalen Widerstand, der auf diese Weise gemessen werden konnte und Aufschluß über die junctionale Leitfähigkeit gab. In der Kontrollserie wurde die Wirkung des AAP10 auf die junctionale Leitfähigkeit gemessen. In den nachfolgenden Serien wurde durch intrazelluläre Gabe von HBDDE (blockiert die PKC α und die PKC γ), und CGP54345 (blockiert die PKCα) die PKC isoformspezifisch gehemmt. Außerdem wurde in einer weiteren Versuchsserie durch intrazelluläre Gabe von Monensin der Transport von Gap-Junction-Kanalbausteine (Connexine) vom Golgi-Apparat zur Membran blockiert. In der Kontrollserie konnte eine reversible signifikante Leitfähigkeitssteigerung unter AAP10 festgestellt werden, die durch HBDDE, CGP54345, und durch Monensin signifikant gehemmt wurde. Aus den Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß AAP10 die Leitfähigkeit an den Gap Junctions über die PKCa steigert, und möglicherweise den Einbau von Connexinen in die Membran beschleunigt, und somit eine antiarrhythmische Wirkung am Herz bewirkt.

Weng, Stephan: Rolle der Proteinkinase C bei der Wirkung Antiarrhythmischer Peptide. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2002

Inhaltsverzeichnis		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Material	9
2.1	Kardiomyozytenpaare	9
2.2	Substanzen	9
2.3	Lösungen	11
2.3.1	Lösungen zur Isolierung von Kardiomyozytenpaaren	11
2.3.2	Extrazelluläre Badlösung für Patch-Clamp	12
2.3.3	Intrazelluläre Pipettenlösung für Patch-Clamp	12
2.4	Pharmaka	13
2.5	Aufbau des Patch-Clamp-Meßstandes	13
3.	Methoden	16
3.1	Isolation von Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren	16
3.2	Patch-Clamp-Technik	17
3.2.1	Meßprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers	18
3.2.2	Eichen der Patch-Clamp-Verstärker	23
3.2.3	Kontrolle des Meßfehlers anhand eines Doppelzellmodells	24
3.2.4	Chlorieren der Silberdrähte	28
3.2.5	Herstellung der Patchpipetten	28
3.2.6	Versuchsdurchführung und Meßprotokoll	29
3.3.	Auswertung der Versuchsergebnisse und Statistik	36
4.	Ergebnisse	37
4.1	Darstellung der elektrischen Eigenschaften eines Meerschweinchen-	
	kardiomyozytenpaares mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik	37
4.1.1	Sealwiderstand	37
4.1.2	Natrium-Strom	37
4.1.3	Serienwiderstand	39
4.1.4	Membranwiderstand	40
4.1.5	Membrankapazität	42
4.2	Gap-Junction-Kanal-Strommessung an Meerschweinchen-	
	kardiomyozytenpaaren mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik	42
4.2.1	Kontrollserie	43
4.2.2	HBDDE-Serie	45
4.2.3	CGP54345-Serie	46
4.2.4	Monensin-Serie	48

4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	50
5.	Diskussion	52
6.	Zusammenfassung	67
7.	Literatur	69
8.	Thesen	80

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A ₁	Operationsverstärker
A ₂	Differentialverstärker
AAP10	Antiarrhythmisches Peptid 10
AAP _{nat}	natürliches Antiarrhythmisches Peptid
aPKC	atypical Proteinkinase C
ATP	Adenosintriphosphat
BIM	BisindolyImaleimid
BSA	bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAST	cardiac arrhythmia suppression trial
CCS	controlled current source
C _m	Membrankapazität
CMTX	Charcot-Marie-Tooth-Syndrom
cPKC	conventional Proteinkinase C
Cx	Connexin
DAG	Diazylglyzerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dSEVC	discontinuous single electrode voltage clamp
dSEVC e ⁻	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron
dSEVC e ⁻ EGF	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor
dSEVC e ⁻ EGF ELISA	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s f _{sw}	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s f _{sw} g _j	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency junctionale Leitfähigkeit
dSEVC e^{T} EGF ELISA f_{e} f_{f} FGF f_{m} f_{s} f_{sw} g_{j} I_{m}	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency junctionale Leitfähigkeit Membranstrom
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s f _{sw} g _j I _m	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency junctionale Leitfähigkeit Membranstrom maximaler Strom
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s f _{sw} g _j I _m I _{max} I _{offset}	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency junctionale Leitfähigkeit Membranstrom maximaler Strom
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s f _{sw} g _j I _m I _{max} I _{offset} IP ₃	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency junctionale Leitfähigkeit Membranstrom maximaler Strom Leckstrom
dSEVC e ⁻ EGF ELISA f _e f _f FGF f _m f _s f _{sw} 9j I _m I _{max} I _{offset} IP ₃ LAD	discontinuous single electrode voltage clamp Elektron Epithelwachstumsfaktor enzyme-linked-immunosorbent-assay Grenzfrequenz der Elektrode Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters Fibroblastenwachstumsfaktor Grenzfrequenz der Membran sampling frequency switching frequency switching frequency junctionale Leitfähigkeit Membranstrom maximaler Strom Leckstrom

MAPK	Mitose-assoziierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MW	Molekulargewicht
NI-DAQ	National Instruments data aquision
nPKC	novel Proteinkinase C
OPA	Operationsverstärker
PIP ₂	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
Raf	MAP-Kinase-Aktivator
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
R _f	Rückkopplungswiderstand
R _j	junctionaler Widerstand
R _m	Membranwiderstand
R _{pip}	Pipettenwiderstand
R _s	Serienwiderstand
R _{seal}	Sealwiderstand
S ₁	Schalter
SDS	sodiumdodecylsulfat
SEM	standard error of mean
Ser	Serin
SH	sample and hold amplifier
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
τ	Zeikonstante
U_{Diff}	Spannungsdifferenz
U _f	Spannung am Rückkopplungswiderstand
U _m	Membranpotential
U_{pip}	Pipettenpotential
U _{soll}	Sollspannung, Kommandopotenial
U _{trans}	transjunctionale Spannung

1. Einleitung und Fragestellung

Ein Organ besteht aus einer Ansammlung von Zellen mit gemeinsamer Funktion. Um eine gemeinsame Funktion ausüben zu können, bedarf es einer Abstimmung der Zellen durch interzelluläre Kommunikation. Zellen kommunizieren über verschiedene Mechanismen, wie Botenstoffe, Mediatoren, nervale Impulse, sowie über Gap Junctions. Gap Junctions (= Ansammlung von Gap-Junction-Kanälen) stellen neben Tight Junctions Nexus, (Schlußleistenkomplex der Epithelien mit Verschmelzung der Zellmembranen) und Desmosomen (= Haftplatte, Kontaktzone mit nach intrazellulär auslaufenden Tonofilamenten) eine Art der Zellverbindung dar, welche die ionale und metabolische Kopplung benachbarter Zellen gewährleisten.

Ein Gap-Junction-Kanal besteht aus zwei gegenüberliegenden Connexonen, so daß ein Connexon einer Zelle den Hemikanal bildet. Ein Connexon besteht aus sechs Untereinheiten, den Connexinen. Ein Connexin wird aus einer Polypeptidkette gebildet, und besteht aus 4 transmembranären Domänen, 2 extrazellulären Schleifen, und je einem intrazellulär gelegenen N- und C- Terminus. Die variable Länge des C-Terminus bestimmt im wesentlichen das Molekulargewicht, und demzufolge die Bezeichnung der entsprechenden Connexinform. Zum Beispiel besitzt Connexin 43 (Cx43) ein Molekulargewicht von 43kDa. Insgesamt konnten bis jetzt 15 lsoformen der Connexinisoform bestehend), oder aus heterologen (aus unterschiedlichen Connexinisoformen bestehend) Connexinen gebildet werden kann [Valiunas et al. 2000]. Einige Connexine sind gewebetypisch, andere hingegen werden in mehreren Organen synthetisiert.



Abb. 1:(a)Zeichnung eines Herzmuskelzellverbandes (b)Darstellung eines Gap-Junction-Clusters (Nexus) benachbarter Zellen, (c)Modell eines einzelnen Gap-Junction-Kanals. Der Pfeil liegt im dodecameren Kanal. (d)Modell eines Connexons. Dieser Pfeil weist auf eine Rotationsbewegung hin, die den Kanal öffnet und schließt. Beachte die zunehmende Vergrößerung der Abbildungen von links nach rechts. Abb. b, c und d nach Dhein [1998c]

Connexine werden an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) synthetisiert, posttranslationell modifiziert, und in Gegenwart eines "chaperon-like assisting factors" in die Membran des rER inseriert und gefaltet. Danach werden die Moleküle im Golgi-Apparat zu Hemichannels oligomerisiert [Musil und Goodenough 1993, 1995] und anschließend in die Zellmembran eingebaut. Innerhalb der cholesterinreichen Domäne bewegen sich die Hemikanäle bis sie auf ein gegenüberliegendes Connexon treffen. Die extrazellulären Schleifen sind so geformt, daß sie ineinander passen [Perkins et al. 1997] und somit einen vollständigen Kanal bilden.



Abb.2: Darstellung der Connexinsynthese am rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER), Connexineinbau in die Membran und Connexinabbau durch Lysosomen oder Proteosomen. Der Transport vom rER zum Golgi-Apparat kann durch Brefeldin A, und der Transport vom Golgi-Apparat zur Membran durch Monensin gehemmt werden. [nach Dhein 1998c]

Gap-Junction-Kanäle sind regulierte niederohmige interzelluläre Verbindungen, die öffnen und schließen können. Sie sind permeabel für Ionen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, H⁺, Mg²⁺) und kleinmolekulare Substanzen unter einem Molekulargewicht von 1000kDa, und gewährleisten somit die elektrische und metabolische Kopplung der Zellen. Durch unterschiedliche Phosphorylierung der Gap-Junction-Kanäle können unterschiedliche Leitfähigkeits- und

Offenwahrscheinlichkeitszustände eingenommen werden. Die Phosphorylierung der Gap-Junction-Kanäle übernehmen verschiedene Proteinkinasen, wie PKA, PKC, PKG, und die Tyrosinkinase. In der Regel führt eine vermehrte Phosphorylierung zu einer verminderten Einzelkanalleitfähigkeit bei verlängerter Offenwahrscheinlichkeit, und somit effektiv zu einer erhöhten Gesamtleitfähigkeit des Gap-Junction-Kanals [Kwak et al. 1995a, b, c]. Andererseits können steigende Ionenkonzentrationen (vor allem Na⁺, Ca²⁺, H⁺, Mg²), sinkende ATP-Spiegel, erhöhtes pCO_2 , Acylcarnitine, Arachidonsäure, und lipophile Substanzen, wie Heptanol und Halothan, die Gap-Junction-Kanäle schließen und die Gesamtleitfähigkeit senken [Page 1992, Spray et al. 1985]. Weil Proteinkinasen in der Regel über Membranrezeptoren und second messenger aktiviert werden, gibt es zahlreiche Effekte an Gap Junctions durch Stimulation der α -Adrenorezeptoren, β -Adrenorezeptoren, m-Cholinorezeptoren, FGF-Rezeptoren, und der EGF-Rezeptoren.

Gap Junctions befinden sich in vielen Organen und Geweben. In diesem Abschnitt soll die Funktion der Gap Junctions im Herz näher erläutert werden. Herzmuskelzellen bilden mit ihren Gap Junctions ein funktionelles Synzytium. Gap Junctions liegen vorwiegend an den Zellpolen (Glanzstreifen), so daß der Gewebewiderstand in Längsrichtung geringer ist als in Transversalrichtung (Anisotropie). Das ist eine wichtige Vorraussetzung für die gerichtete Aktionspotentialausbreitung. Ein Schließen der Gap Junctions, wie es bei einer Ischämie mit intrazellulärer Azidose der Fall ist, führt im wesentlichen zu zwei Effekten. Einerseits wird ein ATP-Verlust vom nichtischämischen zum ischämischen Gewebe verhindert. Dadurch kann eine Ausbreitung des Gewebeschadens unterbunden werden. Andererseits konnte experimentell gezeigt werden, daß ein entkoppeltes Areal mit erhöhtem Gewebewiderstand zu einer Störung der Erregungsausbreitung mit nachfolgender Neigung zu Herzrhythmusstörungen führt [Dhein et al. 1999a, Dhein und Hammerath 2000, 2001].

Auch in anderen Geweben übernehmen Gap Junctions wichtige Funktionen. So wird die "upstream-Regulation" der Blutgefäße den Gap Junctions zugeordnet [Christ et al. 1996]. Dabei handelt es sich um eine lokale Vasotonusänderung, die vom Stimulationsort entgegengesetzt der Auswaschrichtung des Blutes auftritt. Ebenso wird die Wachstumskontrolle durch Kontaktinhibition, und die Zelldifferenzierung durch Austausch von Botenstoffen [Loewenstein 1979] den Gap Junctions zugeschrieben. Im Nervensystem besitzen Gap Junctions wichtige Funktionen bei der synaptischen Aktivität [Faber et al. 1993], sowie ernährende Funktionen an den Schwannschen Zellen. Ebenso konnten in der Linse des Auges Gap Junctions nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, daß Gap Junctions in sezernierenden Drüsen während sekretagoger Stimulation entkoppeln [Chanson und Meda 1993, Petersen 1980].

Veränderungen des Baus und der Funktion von Gap Junctions können zu unterschiedlichen Erkrankungen führen. Bei dem X-chromosomal vererbten Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMTX) konnte eine Mutation des Cx32-kodierenden Gens nachgewiesen werden [Bergoffen et al. 1993, Paul 1995]. Es kommt zu einer Diffusionsblockade zwischen Schwannscher Zelle und periaxonalen Zytoplasma, so daß die Schwannsche Zelle degeneriert.

Tumorzellen verlieren durch die Produktion zahlreicher Tumorpromotoren und Onkogene ihre Kommunikationsfähigkeit. Es kommt zum Schließen der Gap-Junction-Kanäle [Klaunig und Ruch 1990], zu einer veränderten Connexin-Expression [Krutovskikh et al. 1994, Mesnil et al. 1993a, Jara et al. 1995], zur Bildung inkompatibler Connexine und zu Veränderungen der Zelladhäsionsmoleküle [Mesnil und Yamasaki 1993b]. Folge ist ein aggressives Wachstum der Tumorzellen.

Bei Entzündungsprozessen konnte eine Veränderung der Connexin-Expression nachgewiesen werden. Zum Beispiel fanden Hillis et al. [1997] bei der interstitiellen Nephritis eine gesteigerte Expression von Cx43 auf inflammatorischen Zellen, geschädigten Tubuluszellen, und auf interstitielle Zellen. Daraus resultiert eine gesteigerte Interaktion der beteiligten Zellen.

Am Herzen gilt, daß Veränderungen der Funktion der kardialen Gap Junctions zu Herzrhythmusstörungen führen, die eine lebensbedrohliche Komplikation darstellen können. Funktionsbeeinträchtigungen der Gap Junctions am Herz können sehr unterschiedliche Ursachen haben.

So liegt der Chagas-Krankheit eine Infektion mit Trypanosoma cruzii zugrunde. Das führt in Herzmuskelzellen zu einer verminderten Connexinexpression mit verminderten Einbau von Gap-Junction-Kanälen in die Membran. Das erklärt die häufig beobachteten Herzrhythmusstörungen dieser Patienten.

In der akuten Phase eines Herzinfarktes kommt es, bedingt durch die Ischämie mit nachfolgender Azidose, ATP-Verbrauch und Ca²⁺-Überladung zum Schließen der Gap Junctions [Dekker et al. 1996, Müller et al. 1997b]. Daraus resultiert eine abnehmende Kopplung bei gleichzeitiger Abnahme der Aktionspotentialdauer, und der Erregungsaus-

breitungsgeschwindigkeit. Demzufolge ist die Aktionspotentialwellenlänge im ischämischen Gewebe vermindert, während in angrenzenden nicht ischämischen Bereichen die Aktionspotentialwellenlänge unverändert sein kann. Es kommt zu lokalen Differenzen der Aktionspotentialwellenlänge (Steigerung der Dispersion), und so zur Auslösung von Reentry-Arrhythmien [Dhein et al. 1999a, Dhein und Hammerath 2000, 2001]. Experimentell konnte dies durch die prophylaktische Gabe eines Antiarrhythmischen Peptides verhindert werden [Dhein 1998c, Müller et al. 1997a,b]. In der Postinfarktperiode kommt es zu einem Umbau des Myokards mit Umverteilung der Gap Junctions und möglicherweise FGF₂-induzierter Abnahme des Connexin 43 [Doble und Kardami 1995]. Durch Inhomogenitäten der dann verlangsamten Erregungsausbreitung können die Veränderungen des elektrischen Netzwerkes als arrhythmogenes Substrat verstanden werden. Das könnte die proarrhythmische Wirkung der Klasse la Antiarrhythmika erklären [Dhein et al. 1993].

Auch bei der chronischen Herzinsuffizienz kommt es zu erheblichen Veränderungen in der Expression und Verteilung von Gap Junctions [Peters et al. 1993, Peters 1995]. Dabei kommt es zu einer Reduktion der Gap-Junction-Fläche in Bezug auf die Zelloberfläche. Es konnte eine verminderte Cx43-Expression bei gleichzeitig gesteigerter Cx40-Expression nachgewiesen werden [Bastide et al. 1993]. Connexinisoformen unterscheiden sich aber in ihren elektrischen Eigenschaften, so daß ein Ungleichgewicht der Cx43- zur Cx40-Expression Veränderungen der Erregungsleitung mit sich zieht.

Herzrhythmusstörungen stellen kein eigenes Krankheitsbild dar, sondern sind Symptom einer organischen Herzerkrankung (koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkt), einer systemischen kardiovaskulären Erkrankung (arterielle Hypertonie), oder einer extrakardialen Erkrankung (Intoxikationen, Elektrolytstörungen, Endokrinopathien). Oft werden Arrhythmien durch zelluläre Entkopplung ausgelöst oder unterhalten. Andererseits führen Arrhythmien selber zu Veränderungen des Verteilungsmusters der Connexine, wodurch die bekannte Chronifizierung bestehender Arrhythmien begründet sein könnte [Elvan et al. 1997, van der Velden et al. 1996, Dhein et al.1998d, Polontchouk et al. 2001]. Herzrhythmusstörungen werden eingeteilt in Störungen der Reizbildung und Störungen der Erregungsleitung. Störungen der Reizbildung haben ihre Ursache in einer veränderten Automatie der Impulsbildung [Imanishi und Surawicz 1976], oder in einer getriggerten Aktivität [Wit et al. 1972]. Erregungsleitungsstörungen können in linearen geschlossenen Leitungsbahnen oder im räumlichen Gesamtzellverband vorkommen [Lüderitz 1998]. Dabei spielt die Reentry-Tachyarrhythmie eine besondere Rolle der Reizleitungsstörung. Reizbildung und Reizleitung erfolgen nach einem klar definierten räumlichen und zeitlichen Muster, daß durch die beteiligten Strukturen (Ionenkanäle, Gap Junctions) vorgegeben ist. Normalerweise wird die Wiedererregung eines Myokardareals durch die gleiche Erregungswelle wegen der langen Refraktärzeit und der Anisotropie wirkungsvoll verhindert. Im Fall einer verzögerten lokalen Erregungsausbreitung (z.B. ischämisches Infarktareal mit langer Erregungsleitungszeit) können angrenzende normal leitende Areale (unidirektionale Erregungsleitung) ihre Erregbarkeit wiedererlangt haben, so daß diese durch die langsam leitende Erregung wiedererregt werden kann. Bereits 1906 formulierte Meyer ein Kreismodell indem er feststellte, daß zwei Vorraussetzungen zur Initiierung und Unterhaltung von kreisenden Erregungen erfüllt sein müssen:

- 1. die Leitungszeit muß länger sein als die Refraktärzeit, an einem beliebigen Ort im Leitungsweg
- 2. unidirektionale Erregungsausbreitung

In der Therapie von Herzrhythmusstörungen wird zwischen der Akuttherapie und der Langzeittherapie unterschieden. Das Ziel der Akuttherapie ist die Beseitigung akut bestehender Herzrhythmusstörungen, durch vorwiegend medikamentöse Behandlung mit Antiarrhythmika, selten durch elektrische Verfahren. Antiarrhythmika werden nach Vaughan-Williams wie folgt eingeteilt:

Klasse	Wirkungen
la	Blockade des Na ⁺ -Kanals mit Verlängerung des Aktionspotentials
lb	Blockade des Na ⁺ -Kanals mit Verkürzung des Aktionspotentials
lc	Blockade des Na ⁺ -Kanals ohne Einfluß auf das Aktionspotential
II	β-Rezeptoren-Antagonist
III	Blockade repolarisierender K ⁺ -Kanäle mit Verlängerung des Aktionspotentials
IV	Ca ²⁺ -Kanal-Blocker

Tab. 1: Antiarrhythmika nach der Einteilung von Vaughan-Williams

Großer Nachteil dieser Substanzen ist ihr proarrhythmisches Risiko [Dhein et al. 1993] mit erhöhter Mortalitätsrate in der Postinfarktperiode, welches durch die CAST-Studie 1989 [Echt et al. 1991] belegt wurde (proarrhythmisches Risiko der Klassen: Ic>la>lb>III>II und IV). Konsequenz der CAST-Studie ist, daß Antiarrhythmika, besonders die der Klasse I, mit größter Vorsicht angewendet werden, und eine antiarrhythmische Prophylaxe mit diesen Substanzen in den meisten Fällen nicht indiziert ist. Die Langzeittherapie bedient sich nicht-medikamentöser Verfahren, um durch Katheterablation, oder Implantation von Herzschrittmachern, Kardiovertern und /oder Defibrillatoren, ein Wiederauftreten von Rhythmusstörungen zu verhindern.

Hier stellt sich die Frage nach einer wirkungsvollen antiarrhythmischen Prophylaxe, da Herzrhythmusstörungen eine häufige Komplikation von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems darstellen. Seit der CAST-Studie werden klassische Antiarrhythmika nicht mehr zur Prophylaxe eingesetzt, so daß zur Zeit ein wirkungsvoller Schutz vor Herzrhythmusstörungen fehlt. Aus diesem Grund galt es, nach Substanzen mit neuen Wirkungsmustern, ohne proarrhythmisches Risiko, zu suchen.

1980 konnte erstmalig ein atriales bovines Hexapeptid isoliert werden, daß die Rhythmizität in embryonalen Zellklastern verbesserte, und demzufolge als (natürliches) Antiarrhythmisches Peptid (AAPnat) bezeichnet wurde [Aonuma et al. 1980a,b]. Ausgehend vom AAPnat wurde ein effektiver wirkendes Derivat (AAP10) synthetisiert [Dhein et al. 1994, Dhein und Tudyka 1995a]. Experimentell konnte unter AAP10 in nanomolaren Konzentrationen eine Reduktion der Dispersion, eine verminderte Kopplungszeit, aber keine Veränderungen am Aktionspotential nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, daß AAP10 die Kopplung der Zellen über Gap Junctions verbessert, aber keine Wirkung an Ionenkanälen besitzt [Dhein et al. 1994, Dhein und Tudyka 1995a]. In einem weiteren Versuch konnte dem AAP10 eine prophylaktische Wirkung vor ischämiebedingten Herzrhythmusstörungen nachgewiesen werden. Eine arrhythmogene Wirkung, wie bei den klassischen Antiarrhythmika (besonders Klasse I), wurde nicht gefunden [Dhein et al. 1994]. Durch Doppelzell-Voltage-Clamp-Versuche konnte unter AAP10 eine Verbesserung der Leitfähigkeit an Gap Junctions gezeigt werden [Müller et al. 1997a,b, Schaefer et al. 1999]. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stand der Mechanismus der AAP10-Wirkung im Mittelpunkt des Interesses. Es wurde durch AAP10 eine verstärkte Phosphorylierung der Gap Junctions [Dhein et al. 1999b], unter Beteiligung der Proteinkinase C [Dhein et al. 1999b, Schaefer et al. 1999] als Überträger der Phosphatgruppen, gefunden. Der Proteinkinase C gehören insgesamt 12 Isoenzyme an (conventional PKC: $\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$, novel PKC: $\delta_{,\epsilon,\eta,\theta,\mu}$, atypical PKC: $\lambda_{,\tau,\zeta}$ [Nishizuka 1988, Asaoke et al. 1992, Hofmann 1997, Jalili et al. 1999, Way et al. 2000], von denen 7 Isoenzyme im Myokard gefunden wurden $(PKC\alpha, \beta_1, \beta_2, \epsilon, \zeta)$ [Mochly-Rosen et al. 1990, Inoguchi et al. 1992], PKC δ [Rybin und Steinberg 1994]. Beachtenswert dabei ist, daß die PKCy direkt an den Glanzstreifen lokalisiert wurde [Rouet-Benzineb et al. 1996]. Eine isoformspezifische Übertragung der AAP10-Wirkung war bisher nicht bekannt, aber wegen der räumlichen Nähe der PKCy zu

den Glanzstreifen, und somit zu den Gap Junctions, wurde eine Beteiligung dieser PKC-Isoform vermutet. In diesem Zusammenhang ergaben sich die Fragestellungen der hier vorgestellten Arbeit:

- Wenn AAP10 die Kopplung der Zellen über Gap Junctions verbessert [Dhein et al. 1994, Müller et al. 1997 a,b, Schaefer et al. 1999], kann eine Leitfähigkeitssteigerung in gekoppelten Kardiomyozyten unter AAP10 in Doppelzell-Voltage-Clamp-Experimenten bestätigt werden?
- 2. Wenn die Proteinkinase C am Signalweg des AAP10 beteiligt ist [Dhein et al. 1999b, Schaefer et al. 1999], welche Isoformen der PKC können beteiligt sein?
- 3. Wenn AAP10 zu einer Phosphorylierung der Gap Junctions in der Zellmembran führt [Dhein et al. 1999b], können auch die Connexine im Golgi-Apparat durch AAP10 phosphoryliert werden, und so zu einem vermehrten Einbau von Gap-Junction-Kanäle in die Membran führen?

2. Material

2.1 Kardiomyozytenpaare

Es wurden Herzmuskelzellpaare von männlichen erwachsenen Meerschweinchen, Stamm: "Bunte" (Firma Hundepohl, Hasbergen, Germany) mit einem Körpergewicht zwischen 250 – 350g verwendet.

2.2 Substanzen

Im Rahmen der Doktorarbeit fanden folgende Substanzen Verwendung:

Adenosintriphosphat, Magnesiumsalz (Mg-ATP) Adenosintriphosphat, di-Natriumsalz (Na₂-ATP) Antiarrhythmisches Peptid 10 (AAP10) (NH₂-Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-COOH) Bariumchlorid $(BaCl_2 * 2H_2O)$ **Bovine Serum Albumin** (BSA) Cäsiumchlorid (CsCl) Cäsiumhydroxid $(CsOH * H_2O)$ Calciumchlorid (CaCl₂) CGP 54345 Dimethylsulfoxid (DMSO, 99,5%) 3,6-Dioxaoctanethylendinitrilotetraessigsäure (EGTA, =Titriplex 4) Ethanol (C₂H₅OH, 99,6%)

MG = 507,2(Sigma, Deisenhofen) MG = 551,1(Sigma, Deisenhofen) MG = 575,6(Eigensynthese) MG = 244.3(Sigma, Deisenhofen) (Sigma, Deisenhofen) MG = 168,36(Merck, Darmstadt) MG = 167,9(Sigma, Deisenhofen) MG = 147,02(Merck, Darmstadt) MG = 317,2(Novartis, Basel) MG = 78,13(Merck, Darmstadt) MG = 380,35(Merck, Darmstadt) MG = 46,07(Roth, Karlsruhe)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) D(+) Glucose-Monohydrat ($C_6H_{12}O_6 * H_2O$) L-Glutaminsäure, Kaliumsalz ($C_5H_8NO_4K$) Guanosintriphosphat, di-Natriumsalz (Na₂-GTP) Heparin-Natrium

2,2',3,3',4,4'-Hexahydroxy-1,1'-biphenyl1-6,6'-dimethanoldimethylether (HBDDE) (N-[2-Hydroxyethyl]piperazinyl-N'-[2-ethansulfonsäure]) (HEPES) Kaliumchlorid (KCL) Kollagenase (Typ CLS II) Magnesiumchlorid (MgCl₂) Methanol (CH₃OH, 99,9%)

Natriumchlorid (NaCl) Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) Natriumhydroxid (NaOH) Salzsäure (HCL, 37%) Sauerstoff für medizinische Zwecke (O₂, 100%) MG = 292,2(Sigma, Deisenhofen) MG = 198,17 (Merck, Darmstadt) MG = 185,2(Sigma, Deisenhofen) MG = 603, 18(Fluka, Buchs) 169.000 I.E./g (Serva, Heidelberg) MG = 338,3(Biomol, Hamburg) MG = 260,28(Merck, Darmstadt) MG = 74,56(Merck, Darmstadt) 331 U/mg (Biochrom, Berlin) MG = 203,3(Merck, Darmstadt) MG = 32,04(Fluka, Buchs) MG = 692,9(Sigma, Deisenhofen) MG = 58,44(Merck, Darmstadt) MG =137,99 (Merck, Darmstadt) MG = 40,0(Merck, Darmstadt) MG = 36,46Merck, Darmstadt)

(Messer Griesheim GmbH Frankfurt am Main)

10

2.3 Lösungen

Die zur Durchführung der Experimente hergestellten Lösungen hatten folgende Zusammensetzungen:

2.3.1 Lösungen zur Isolierung von Kardiomyozytenpaaren

Tyrodelösung mit Calcium (pH 7,4)

135mM NaCl	7,889g/l
4mM KCL	298mg/l
2mM CaCl ₂	294mg/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
0,33mM NaH ₂ PO4	46mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l
	röchantlich n

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Tyrodelösung ohne Calcium (pH 7,4)

135mM NaCl	7,889g/l
4mM KCI	298mg/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
0,33mM NaH ₂ PO ₄	46mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Kaliumglutamatlösung (pH 7,4)

120mM K-Glutamat	22,232g/l
20mM NaCl	1,169g/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Kollagenaselösung

70ml Kaliumglutamatlösung wurden mit :

70mg BSA (1mg/ml)

6000 IU Kollagenase (18mg von 331 U/mg Kollagenase) 25 μ M CaCl₂ (17,5 μ I vom 100mM CaCl₂-Stamm) versetzt.

Die Lösung wurde vor jedem Versuch neu angesetzt.

Heparin-Natrium-Lösung

147,92mg der Substanz wurden in 25ml 0,9% NaCl-Lösung gelöst. Dies entsprach einer Konzentration von 1000 I.E./ml. Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

CaCl₂-Stamm 100mM

Es wurden 147mg CaCl₂ in 10ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.2 Extrazelluläre Badlösung für Patch-Clamp (pH 7,4)

135mM NaCl	7,889g/l
4mM KCL	298mg/l
2mM CaCl ₂	294mg/l
1mM MgCl ₂	203mg/l
0,33mM NaH ₂ PO ₄	46mg/l
10mM HEPES	2,603g/l
10mM Glucose	1,982g/l
1mM BaCl ₂	244mg/l

Die Lösung wurde wöchentlich neu angesetzt und bei 4°C aufbewahrt.

2.3.3 Intrazelluläre Pipettenlösung für Patch-Clamp (pH 7,2)

125mM CsCl	21,045g/l
8mM NaCl	468mg/l
1mM CaCl ₂	147mg/l
10mM EGTA	3,804g/l
10mM HEPES	2,603g/l
2mM Na ₂ ATP	1,102g/l
3mM MgATP	1,522g/l
0,1 mM Na₂GTP	60mg/l

Die Pipettenlösung wurde bei –21°C aufbewahrt.

2.4 Pharmaka

In Abhängigkeit des Versuchsprotokolls wurde der Pipettenlösung der entsprechende Inhibitor folgendermaßen zugesetzt:

HBDDE	Endkonzentration: 50µM
	blockiert isoformspezifisch die PKC $lpha$ (IC $_{50}$: 43 μ M) und
	die PKC γ (IC ₅₀ : 50 μ M) [Kashiwada et al. 1994]
	Stammlösung: 1mM (1mg in 2,9ml Aqua dest. gelöst)
	Mischungsverhältnis mit der Pipettenlösung: 1:20
CGP 54345	Endkonzentration: 10µM
	blockiert isoformspezifisch die PKC α (IC ₅₀ : 5,8 μ M) [Zimmermann et al. 1994,
	Hofmann 1997]
	Stammlösung 10mM (10mg in 3,1ml DMSO gelöst)
	Mischungsverhältnis mit der Pipettenlösung: 1:1000
Monensin	Endkonzentration: 2µM
	blockiert die Transportvesikel des trans-Golgi-Apparates und verhindert somit
	den Einbau von Proteinen in die Zellmembran [Puranam et al. 1993]
	Stammlösung: 1mM (1mg in 1,4ml DMSO gelöst)
	Mischungsverhältnis mit der Pipettenlösung: 1:500

2.5 Aufbau des Patch-Clamp-Meßstandes

Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, daß der Patch-Clamp-Meßstand aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt war. Zwei Elektroden sind für die Bestimmung des Membranpotentials notwendig. Die Badelektrode verband die Badlösung mit dem Erdleiter und definierte somit das Potential des Bades als das Potential Null. Die Elektrode am Pipettenhalter verband die Pipettenlösung mit dem hochempfindlichen Vorverstärker ("headstage"), und stellte somit den elektrischen Kontakt zur Zellmembran her. Der Vorverstärkerausgang war mit dem "headstage input" des Hauptverstärkers (SEC-05L, NPI electonics GmbH, Tamm, Germany) verbunden. Es ist zu beachten, daß je Zelle des zu messenden Zellpaares mit einer eigene Elektrode, Vorverstärker und Hauptverstärker verbunden war, und somit diese Komponenten doppelt vorhanden waren. Ein Computer war über eine NI-DAQ Schnittstelle (enthält den AD/DA-Wandler und ein Zeitgeber) (Lab-PC+, National Instruments, Austin, USA) mittels einer "Breakout Box" (INT 10, NPI electronics

GmbH, Tamm, Germany) mit dem Meßsetup verbunden. Der Computer arbeitete mit zwei speziellen Patch-Clamp-Programmen und erfüllte somit mehrere Aufgaben:

- 1. Speicherung der digitalisierten Meßwerte auf Festplatte
- Sicherung der digitalisierten Meßwerte auf Zipdiskette (Z100P2, Iomega, Dublin, Irland)
- 3. Auswertung der Meßwerte mit Hilfe der Patch-Clamp-Software (Egg Works Reader 302, NPI electronics GmbH, Tamm, Germany)
- 4. Erzeugung programmierter Spannungspulse (Stimulationsgerät) mit Hilfe der Patch-Clamp-Software (Egg Works 302, NPI electronics GmbH, Tamm, Germany)
- 5. Triggerquelle für Speicheroszilloskope

Zur Visualisierung der Signale standen insgesamt drei Oszilloskope zur Verfügung: zwei Speicheroszilloskope (TDS 210, Tektronix, Beaverton, USA) für Spannungs- und Strommessung beider Zellen, und ein konventionelles Oszilloskop (OS-9020G Goldstar, Korea) für die Darstellung der Elektrodenpotentiale.

Die Perfusion des Bades erfolgte mittels einer Peristaltikpumpe (VP, Ismatec, Zürich, Schweiz), die den Zufluß, und den an der gegenüberliegenden Seite gelegenen Abfluß, regelte. Die Temperatur des Perfusats konnte durch ein temperierbares Wasserbad am Thermostat (MT/2, Lauda, Königshofen, Germany) auf einen gewünschten Wert voreingestellt werden.

Die Benutzung einer hochauflösenden Optik und die Steuerung der Pipetten durch Mikromanipulatoren waren Vorraussetzung für ein exaktes Plazieren der Pipette auf der Zellmembran. Dafür wurde ein inverses Lichtmikroskop (maximal 400fache Vergrößerung) (Axiovert, Zeis, Jena, Germany) mit einer Phasenkontrasteinrichtung verwendet.

Mikromanipulatoren ermöglichten die Steuerung der Pipette in drei Richtungen des Raumes. Die Horizontale und die Tiefe wurden manuell, mit mechanisch arbeitenden Mikromanipulatoren eingestellt. Die vertikale Ebene wurde für das "Andocken" der Pipette an die Zellmembran, mit ferngesteuerten, elektrisch arbeitenden Mikromanipulatoren mit Stellmotor (Mini 25, Luigs+Neumann, Ratingen, Germany) angefahren.

Wegen des sehr erschütterungsempfindlichen Kontaktes zwischen Zellmembran und Pipette (Seal), wurde der Mikroskoptisch mit seinen Aufbauten auf einer gummipuffergelagerten massiven Betonplatte montiert.

Die hochempfindlichen elektronischen Komponenten (headstages) sind gegenüber externen elektrischen Störsignalen sehr empfindlich (rauschen und brummen). Aus diesem Grund umgab ein Faradayscher Käfig den Mikroskoptisch. Alle elektronischen Teile waren geerdet.



Abb. 3: Aufbau des Patch-Clamp-Standes zur Messung von Gap-Junction-Strömen

(1) Faraday-Käfig, (2) Ständer, (3) Gummipuffer, (4) massive Betonplatte, (5) Kolbenspritze, (6) Luftdruckleitung, (7) Mikromanipulator, (8) Pipettenhalter mit Elektrode, (9) Vorverstärker, (10) Kondusor mit Phasenkontrasteinrichtung, (11) Organbad, (12) inverses Mikroskop, (13) Mikroskoptisch, (14) Rollerpumpe, (15) Auffanggefäß, (16) temperierbares Wasserbad, (17) Steuereinheit für Mikromanipulator

Verstärkeranschlüße: E=Elektrodenpotential, U_A =Potential output, U_E =Vc command input, I_A =current output, I_E =current stimulus input, H=Headstage input, S=Switching frequency

1=die Zelle 1 betreffend, 2=die Zelle 2 betreffend

3. Methoden

3.1 Isolation von Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren

Das verwendete Isolationsprotokoll wurde erstmalig durch die Arbeitsgruppe Powell et al. [1980] beschrieben, und anschließend von Metzger und Weingart [1985] modifiziert.

Zuerst erfolgte die Heparinisierung des Meerschweinchens (1000 IU/kg Körpergewicht), um der Bildung von Koronarthromben vorzubeugen. Fünfzehn Minuten danach wurde das Meerschweinchen durch Genickschlag getötet, und durch Eröffnung der Karotiden entblutet. Nach der anschließenden Thorakotomie konnte das Herz freipräpariert und dargestellt werden. Die Aorta ascendens wurde aufgesucht, inzidiert, kanüliert, und sofort perfundiert (Tyrodelösung mit Calcium, 10 Minuten, 6°C). Danach konnte das Herz aus der Brusthöhle entnommen, und an eine Langendorff-Apparatur überführt werden. Es erwies sich als günstig, das restliche Perikard zu entfernen.

Bei der Perfusion war zu beachten, daß keine Luftblasen in die Herzkranzgefäße gelangten, denn eine Luftembolie hätte das Lumen der Kapillaren verschlossen, und die Oxygenierung des Herzmuskels verschlechtert. Außerdem mußte die Zeit zwischen Genickschlag und Perfusion so kurz wie möglich gehalten werden (ca. 1min), da sofort nach Tötung des Tieres die Zeit der Ischämie beginnt, die durch einen Verbrauch energiereicher Substanzen (ATP, GTP), sowie intrazellulärer Steigerung der H⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen gekennzeichnet ist.

Danach folgte eine zweiminütige Perfusion mit einer Calcium-freien Tyrodelösung bei 37°C, die anschließend durch eine Kaliumglutamatlösung (2 Minuten, 37°C), ersetzt wurde. Zuletzt erfolgte die Gabe der Kollagenaselösung (37°C) für eine Zeit zwischen 15 bis 30 Minuten, die nach den ersten 35ml rezirkulierend gegeben wurde. Alle Perfusionslösungen wurden während ihrer Gabe mit 100% Sauerstoff begast.

Aus dem zunehmenden Verdau der Kollagenaselösung resultierte eine gesteigerte Perfusionsrate, die auf 5 bis 10 Tropfen pro Minute gedrosselt wurde. Nach ca. fünfundzwanzigminütiger Kollagenaseperfusion stellte sich das Herz leicht glasig und transparent dar. Dann konnte das Herz von der Langendorff-Apparatur abgenommen, und in eine mit Kollagenaselösung gefüllte Petrischale überführt werden. Nach erfolgter Trennung der Vorhöfe von den Ventrikeln konnten die Ventrikel mit zwei Skalpelle zerkleinert werden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 100% Sauerstoff begast, vorsichtig gerührt (Nachverdau), und durch einen Nylonfilter (250 µm Porengröße) filtriert. Das Filtrat wurde in zwei Falconröhrchen aufgenommen, bei 400rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 20ml Kaliumglutamatlösung resuspendiert und erneut bei 400rpm zentrifugiert. Dadurch konnte die Aktivität der Kollagenase gestoppt werden.

Das Zellpellet in Röhrchen A wurde erneut in Kaliumglutamatlösung resuspendiert und später als Zellreserve genutzt. Das Zellpellet in Röhrchen B wurde in 20ml calciumfreier Tyrodelösung resuspendiert. Anschließend erfolgte die schrittweise Anpassung der Calciumkonzentration an physiologische Verhältnisse (Endkonzentration 2mmol/I). Die Zellsuspension enthielt einen hohen Anteil an Zellpaaren, die für Patch-Clamp-Experimente benutzt wurden.

3.2 Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik stellt ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren dar. Ende der dreißiger Jahre entwickelten Cole und Curtis das Verfahren der Spannungsklemme. Bei dieser Technik wurden zwei Elektroden für eine Zelle verwendet. Eine Elektrode diente der Spannungsklemme, die andere der Spannungsaufzeichnung. Mit diesem Verfahren konnten Cole und Curtis eine Membranleitfähigkeitsänderung einer Nervenzelle bei Erregung nachweisen und damit Bernsteins Hypothese (1912) bestätigen. Das Problem bestand darin, daß die Elektroden in die Zelle eingestochen wurden. Deshalb traten zwischen Pipette und Zellmembran hohe Leckströme auf. Das verursachte ein hohes Hintergrundrauschen, welches 100 mal größer war als der Strom durch einen einzelnen Kanal. Außerdem tolerierten die Zellen diese Methode schlecht und kollabierten oft.

1970 beschlossen Neher und Sakmann die winzigen Einzelkanalströme (\approx 1pA) aus dem Hintergrundrauschen herauszulösen. Dazu mußten sie einen kleinen Abschnitt der Zellmembran vom Rest elektrisch isolieren, indem sie eine Glaskapillare über einen kleinen Membranfleck stülpten. Somit wurde die grundlegende Idee der Patch-Clamp-Technik geschaffen. Neher und Sakmann reduzierten weiter das Hintergrundrauschen, indem sie eine sehr dichte Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette schufen. 1976 entwickelten sie ein Verfahren um Muskelzellen enzymatisch von ihren bindegewebigen Anteilen zu befreien. Dadurch erreichten sie Abdichtwiderstände zwischen 10 bis 50M Ω . Das Hintergrundrauschen verringerte sich, aber Kanäle mit niedriger Leitfähigkeit wurden noch nicht sichtbar. Vier Jahre später (1980) fanden Neher und Sakmann heraus, daß saubere unbenutzte Pipetten den Sealwiderstand nochmals deutlich erhöhten. Dadurch waren Abdichtwiderstände bis 100 G Ω (Gigaseal) möglich. Das Hintergrundrauschen wurde weitestgehend eliminiert und Einzelkanalströme mit einer guten Auflösung wurden sichtbar. Nun wurden Patch-Clamp-Verstärker entwickelt, die hinsichtlich ihrer Bandbreite und ihres elektrischen Rauschverhaltens verbessert wurden. 1981 gelang es der Arbeitsgruppe Spray et al. [1981] eine Methode zur Voltage-Clamp-Messung von Zellpaaren auszuarbeiten. Die Patch-Clamp-Technik etablierte sich zu einer häufig verwendeten Meßmethode der Elektrophysiologie. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden alle Versuche mittels einer modifizierten Patch-Clamp-Technik, der sogenannten Switch-Clamp-Technik, durchgeführt. Das Meßprinzip beider Verfahren wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

3.2.1 Meßprinzip des Patch-Clamp-Verstärkers

In diesem Kapitel soll zunächst das Arbeitsprinzip eines konventionellen Patch-Clamp-Verstärkers beschrieben werden, um dann vergleichend die Vorteile der Arbeitsweise eines diskontinuierlichen Patch-Clamp-Verstärkers (dSEVC-amplifier = discontinuous singleelectrode-voltage-clamp-amplifier), darzulegen.

Die Hauptaufgabe eines Patch-Clamp-Verstärkers ist es, das Membranpotential (U_m) der Zelle auf das vom Experimentator vorgegebene Potential (Usoll) zu klemmen, und den dafür notwendigen Strom zu messen. Der Patch-Clamp-Verstärker arbeitet nach dem Grundprinzip der negativen Rückkopplung. Das Membranpotential wird gemessen und mit der eingestellten Sollspannung verglichen. Differenzen aktivieren einen Regler, der den Kompensationsstrom solange fließen läßt, bis die Differenz zwischen Sollspannung und Pipettenpotential Differenzen können ausgeglichen ist. entstehen, wenn die Kommandospannung durch den Experimentator verändert wird, oder wenn sich die Leitfähigkeit der Zellmembran (gi) ändert. Im letzten Fall ist der Kompensationsstrom genauso groß wie der Strom durch die Zellmembran, diesem aber entgegengesetzt. Dieser gemessene Kompensationsstrom ist direkt proportional zur Leitfähigkeit der Membran. Demzufolge läßt sich die Leitfähigkeit der Membran berechnen. Sie ist Ausdruck des Zustandes aller auf der Membran befindlichen Kanäle und Transporter. Spannungsmessung und Strominjektion erfolgt mit nur einer Pipette. Das ist möglich durch den Aufbau eines Schaltkreises, der als Strom-Spannungswandler bezeichnet wird. Er befindet sich direkt hinter der Pipette im Vorverstärker (headstage), und stellt das Herzstück eines jeden Patch-Clamp-Verstärkers dar. Ein vereinfachtes Schaltbild eines konventionellen Patch-Clamp-Verstärkers ist in der Abbildung 4 dargestellt.



Abb. 4: Vereinfachtes Schaltbild eines konventionellen Patch-Clamp-Verstärkers, nach Numberger und Draguhn [1996]. (OPA) Operationsverstärker, (R_f) Rückkopplungswiderstand, (U_{soll}) Sollspannung, (U_{pip}) Pipettenpotential (U_{aus}) Ausgangsspannung, proportional zum Strom

Die wichtigsten Elemente eines Vorverstärkers sind:

- 1. der Operationsverstärker (OPA)
- 2. der Rückkopplungswiderstand (R_f)

Am (-)Eingang des OPA liegt das Pipettenpotential (U_{pip}) , am (+)Eingang die Kommandospannung = Sollspannung (U_{soll}) , an. Nimmt man den Fall an, daß zwischen Pipettenspannung und Sollspannung eine Differenz besteht, so entsteht am Ausgang des OPA eine Spannung, die der Differenz der Eingangsspannungen proportional und extrem verstärkt ist. Es kommt zu einer Potentialdifferenz zwischen Punkt 2 und Punkt 1 (siehe Abb. 4). Deswegen fließt über den Rückkopplungswiderstand (R_f) ein Strom. Dabei entsteht am Rückkopplungswiderstand eine Spannung die, entsprechend des Ohmschen Gesetzes (U_f = R_f *I), proportional zum durchfließenden Strom ist. Diese Spannung wird dem Hauptverstärker zugeführt, und kann nach erfolgter Kalibrierung am Oszilloskop als Stromkurve sichtbar gemacht werden. Daraus erklärt sich der Name "Strom-Spannungswandler".

Der Strom, der durch den Rückkopplungswiderstand (R_f) fließt, kann nur in die Pipette fließen, da der Eingangswiderstand des OPA sehr hoch ist (ca. $10^{12}\Omega$). Der Strom ändert das Membranpotential und wird solange fließen, bis das Pipettenpotential gleich der Sollspannung ist. In diesem Fall entsteht keine Spannung am Ausgang des OPA, folglich besteht keine Potentialdifferenz zwischen Punkt 1 und Punkt 2, weswegen kein Strom fließt.

Die soeben beschriebene Darstellung der Spannungskontrolle über die Zelle ist eine starke Vereinfachung und berücksichtigt nicht die Besonderheiten der Ganzzellkonfiguration, wodurch sich Probleme bei der Messung ergeben. Wie bereits beschrieben, liefert der (-)Eingang des OPA die Spannung der Elektrodenspitze (U_{pip}) , aber nicht das Membranpotential der Zelle (U_m) . Die Ursache ist in der Abbildung 5 erkennbar.



Abb. 5: Ersatzschaltbild der Whole-Cell-Konfiguration (Ganzzellableitung), nach Numberger und Draguhn [1996]. Membranfragmente werden in den Öffnungsbereich der Pipette gesaugt und erhöhen so den Serienwiderstand (R_s). (R_m) Membranwiderstand, (Cm) Membrankapazität

Während der Ausbildung zur Ganzzellkonfiguration entsteht ein zusätzlicher Widerstand, der zwischen Silberdraht und Zellsoma liegt. Der sogenannte Serienwiderstand (R_s) entspricht nur im theoretisch idealen Fall dem Pipettenwiderstand (R_{pip}). Der Pipettenwiderstand wird vor jeder Messung ermittelt und über einen speziellen Schaltkreis (bridge balance) kompensiert. Beim Öffnen der Zelle lagern sich Membranfragmente und zum Teil auch Zellorganellen in den Mündungsbereich der Pipette an, so daß oft eine Verdopplung des reinen Pipettenwiderstandes (R_{pip}) erreicht wird, der im Verlauf eines Experimentes noch deutlich zunehmen kann. Dieser zusätzliche Widerstand ist nicht exakt zu bestimmen und kann deswegen nicht korrekt kompensiert werden. Das hat für die Spannungskontrolle der Zelle gravierende Folgen:

1. Je größer der Serienwiderstand ist, desto langsamer wird die gewünschte Kommandospannung an der Zelle aufgebaut.

2. Je größer der Serienwiderstand ist, desto langsamer wird eine Leitfähigkeitsänderung der Membran ausgeglichen.

3. Je größer der Serienwiderstand ist, desto mehr weicht das Membranpotential von der Kommandospannung ab, weil die Kommandospannung am gesamten Widerstand (Serienwiderstand und Membranwiderstand) abfällt. Sie bilden einen Spannungsteiler. Nur im idealen Fall, wenn $R_m >> R_s$, liegt das Kommandopotential annähernd an der Membran an. In einem extremen Fall, wenn $R_m = R_s$, wird nur die Hälfte der Kommandospannung an der Membran aufgebaut. Die andere Hälfte fällt am

Serienwiderstand ab. Dadurch kann die Messung des Kompensationsstromes stark verfälscht sein und zu erheblichen Meßfehlern führen.

Die Lösung des Problems besteht darin, das Membranpotential (U_m) nur dann zu messen, wenn über den Serienwiderstand kein Strom fließt ($R_s=0$). Ein solches Prinzip liegt dem diskontinuierlich arbeitenden single-electrode-voltage-clamp-amplifier (dSEVC-amplifier) zugrunde, indem er zyklisch zwischen Strominjektion und Spannungsmessung (kein Stromfluß) mit einer hohen Frequenz ($f_{sw} = 35$ kHz) hin und her wechselt. Nun soll die Funktionsweise eines dSEVC-Verstärkers mit Hilfe eines vereinfachten Schaltbildes in der Abbildung 6a, und einem Schema der Arbeitsweise in der Abbildung 6b erläutert werden.



Abb. 6: (a):Ersatzschaltbild eines discontinuous single-electrode-voltage-clamp-amplifier (dSEVC-Verstärker), nach Polder [1996]: (A1) Operationsverstärker, (SH1/2) Sammel-und Speichereinheit, (A2) Differentialverstärker, (CCS) kontrollierte Stromquelle, (S1) Schalter zwischen record und inject, (timing) Zeiteinheit, (Vcom) Kommandopotential, (Vel) Elektrodenpotential, (SwF) Switching-Frequenz
(b): Arbeitsprinzip eines dSEVC-Verstärkers nach Polder [1996]: (a)zeitabhängiger Rechteckpuls der Zeiteinheit, (b) Strom am Ausgang der kontrollierten Stromquelle CCS, (c) gemessene Spannung am Operationsverstärker A1, (d) Membranpotential, (e) Spannung an der Sammel- und Speichereinheit-1-, (f) Strom an der Sammel- und Speichereinheit-2-

Die Elektrode ist mit dem Zellsoma leitend verbunden (Ganzzellableitung). Der Zyklus beginnt am Ende eines stromfreien Intervalls. An diesem Punkt wird das Membranpotential durch einen Operationsverstärker (A₁) aufgenommen und im "sample and hold amplifier" (SH₁) zwischengespeichert. Der Schalter (S₁) wechselt in den Modus "Strominjektion" und

verbindet den Ausgang des Differentialverstärkers (A₂) mit dem Eingang der spannungskontrollierten Stromquelle (CCS). Jetzt liegt das Membranpotential am (-)Eingang des Differentialverstärkers (A₂) an. Am (+)Eingang liegt die Kommandospannung (U_{soll}) an. Der Differentialverstärker (A₂) vergleicht das Membranpotential mit der Kommandospannung und berechnet die Differenz. Die Differenz liegt nun am Ausgang des Differentialverstärkers (A₂) an und steuert die spannungskontrollierte Stromquelle (CCS). Diese liefert einen Strom, der in seiner Größe proportional zur gebildeten Differenz (U_m-U_{soll}) ist. Der Strom fließt in die Pipette und verursacht am Serienwiderstand einen steilen Spannungsanstieg. Danach fließt der Strom in die Zelle und gleicht langsam das Membranpotential an die Kommandospannung an. Die Größe der Amplitude der Strominjektion wird durch den "sample and hold amplifier" (SH₂) aufgenommen und gespeichert. Danach kann das Signal am "current output" abgelesen werden. Anschließend wechselt der Schalter (S₁) in den Modus "Potentialmessung", so daß die Verbindung zur spannungskontrollierten Stromquelle (CCS) unterbrochen ist. Ein neuer Zyklus beginnt, indem erneut das Membranpotential am Ende eines stromfreien Intervalls gemessen wird.

Das Potential am Operationsverstärker (A_1) ist nicht nur das Membranpotential allein, sondern es addiert sich das Elektrodenpotential (U_{Pip}) dazu. Zwischen beiden Potentialen besteht ein wesentlicher Unterschied, welchen man sich für die exakte Spannungsmessung (U_m) zunutze macht. Das Elektrodenpotential fällt nach jeder Strominjektion extrem schnell ab (1-3µs, Müller et al. 1999), wenn die Elektrodenkapazität zuvor exakt kompensiert wurde. Im Verhältnis dazu fällt das Membranpotential sehr langsam ab. Wenn das Elektrodenpotential komplett gefallen ist (R_s=0), also am Ende des stromfreien Intervalls, wird das Membranpotential durch den Operationsverstärker (A₁) aufgenommen, in SH_1 zwischengespeichert, und kann am "potential output" ausgelesen werden. Voraussetzung für eine fehlerfreie Spannungsmessung ist die genaue Kompensation der Elektrodenkapazität. Nur so wird ein schnellstmöglicher Abfall der Elektrodenspannung ermöglicht. Dabei muß darauf geachtet werden, daß der Zeitraum zwischen Strominjektion und Spannungsmessung lang genug ist, damit die Elektrodenspannung komplett abfallen kann. Der Zeitraum darf aber auch nicht zu lang gewählt werden, damit ein zu starkes abweichen des Membranpotentials (Richtung Ruhemembranpotential) von der Kommandospannung verhindert wird.

Anhand der Kapazitätskompensation der Elektrode, die mit sehr kurzen Reaktionszeiten auf Stromimpulse reagiert, wurde die obere Grenzfrequenz der Elektrode ermittelt (τ = 2-3µs, f_e = 80-160kHz). Aus dieser Erkenntnis wurde eine Formel entwickelt (Müller et al. 1999), die

23

eine Relation zwischen der Elektrodenzeitkonstante (f_e), der switching frequency (f_{sw}), der sampling frequency (f_s), der oberen Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters (f_f) und der Zeitkonstante der Membran (f_m) angibt:

$f_e > 3f_{sw}, f_{sw} > 2f_s, f_s > 2f_f > f_m$

Ziel dieser Formel ist es, das ursprüngliche bioelektrische Signal so wenig wie möglich zu verändern, um die volle Aussagekraft zu erhalten. In der folgenden Tabelle sind die optimal berechneten Werte, den tatsächlich eingestellten Werten gegenüber gestellt:

	optimal, berechnet	am dSEVC eingestellt
switching frequency (f _{sw})	30 – 50 kHz	35 kHz
sampling rate (f_s)	5 – 10 kHz	5 kHz
Filterfrequenz (f _f)	1 – 2 kHz	2 kHz

Tab. 2: Darstellung der optimal berechneten Werte und der am dSEVC-Verstärker eingestellten Werte der switching frequency, sampling rate, und der Filterfrequenz

3.2.2 Eichen der Patch-Clamp-Verstärker

Bevor man mit den Messungen beginnen kann, muß der "headstage-bias-current" kontrolliert und gegebenenfalls beseitigt werden. Das ist ein Leckstrom der materialbedingt und temperaturabhängig am Vorverstärker auftritt [Horowitz und Hill. 1993]. Dieser Strom wird an die Zelle weitergegeben und verändert somit das Membranpotential, so daß eine Differenz zwischen Membranpotential und Sollspannung entsteht. Falsche Meßergebnissen wären die Folge.

Dazu wurde der Verstärker in "bridge mode" gestellt und der Verstärkereingang geschlossen ("oscillation shutoff", LED: rot), um ankommende Signale aus der "current-stimulus-unit" zu vermeiden. Der Elektrodenverstärkereingang wurde über einen kleinen elektrischen Widerstand (10-100k Ω) geerdet. Danach wurde das Voltmeter mit dem Offsetpotentiometer auf 0mV gesetzt. Nun wurde der Widerstand durch einen größeren Widerstand (1G Ω) ersetzt. Das abzulesende Potential am Voltmeter ist nach dem Ohmschen Gesetz proportional zum "headstage bias current". Das "headstage-bias-current"-Potentiometer wurde so eingestellt, daß Voltmeter und Amperemeter kein Potential mehr anzeigten. Die Eichung des Meßstandes wurde regelmäßig kontrolliert, besonders wenn die Raumtemperatur stark schwankte.

3.2.3 Kontrolle des Meßfehlers anhand eines Doppelzellmodells

Die Bestimmung des Meßfehlers der junctionalen Strommessung beider Verstärker wurde anhand eines Doppelzellmodells (NPI electronics GmbH, Tamm, Germany) durchgeführt. Das Doppelzellmodell besteht aus dem Zellmodell1 (entspricht der Zelle1 mit R_{m1} und C_{m1}), und dem Zellmodell2 (entspricht der Zelle2 mit R_{m2} und C_{m2}), die durch den junctionalen Widerstand (R_j) gekoppelt sind. Somit simuliert der elektronische Schaltplan des Doppelzellmodells (Abb. 7) beiden Verstärkern (Verstärker1 für Zellmodell1 und Verstärker2 für Zellmodell2) ein gekoppeltes Zellpaar im Whole-Cell-Modus mit folgenden Parametern:

- 1. Membranwiderstand ($R_{m1,2}$) = 100M Ω
- 2. junctionaler Widerstand (R_j)= 10M Ω
- 3. Membrankapazität ($C_{m1,2}$)= 100pF



Abb. 7: Ersatzschaltplan des Doppelzellmodells, nach Müller et al. [1999]. Die Pfeile zeigen die Richtung des Stromflusses (I). (V) Spannung, (R_s) Serienwiderstand, (R_m) Membranwiderstand, (R_i) junctionaler Widerstand, (C_m) Membrankapazität

Die Meßwerte wurden mit den vorgegebenen Parametern des Doppelzellmodels verglichen, und der resultierende Meßfehler des junctionalen Widerstandes bestimmt. Dazu wurde das Doppelzellmodell mit den Vorverstärkern verbunden und geerdet. An beiden Verstärkern wurde die "bridge balance" und die Kapazitätskompensation justiert. Weiterhin wurde der Wert der Verstärkung (Gain = 1) und der Tiefpaßfilter (2kHz) eingestellt.

Zur Bestimmung des Membranwiderstandes (R_m) wurde an beiden Zellmodellen ein 30ms langer Spannungssprung von -40 auf -50 mV (Spannungsdifferenz $U_{Diff} = 10$ mV) angelegt

(Abb. 8a), und der fließende Strom über dem Membranwiderstand gemessen (Abb. 8b). Der Membranwiderstand konnte dann nach dem Ohmschen Gesetz ($R_m=U_{Diff}/I_m$) berechnet werden. In einer Kontrollmessung zur Bestimmung des Membranwiderstandes konnte für das Zellmodell1 ein Strom von 99pA, und für das Zellmodell2 ein Strom von 102pA bestimmt werden. Somit betrug der Membranwiderstand für das Zellmodell1 $R_{m1}=101M\Omega$, und für das Zellmodell2 $R_{m2}=98M\Omega$. Bei einem vorgegebenen Sollwert von 100M Ω lag der Fehler unter 5%.



Abb. 8: Originalregistrierung am Zellmodell1, von dem angelegten Spannungspuls
 -40/-50mV (a) und der resultierenden Stromantwort (b) zur Berechnung des Membranwiderstandes (R_{m1}). Der Haltestrom des Haltepotentials (-40mV) betrug – 366pA, und für die Klemmspannung (-50mV) konnten –465pA ermittelt werden. Aus der Stromdifferenz von 99pA konnte der Membranwiderstand berechnet werden. (R_{m1}=101MΩ, vorgegeben 100MΩ)

Anschließend wurde die Membrankapazität (C_m) nach der Formel C_m=I_{max}* τ/U_{Diff} für beide Zellmodelle bestimmt. Der maximal fließende Strom (I_{max}) stellt die Amplitude des kapazitiven Ladestromes dar. Die Zeitkonstante (i) wurde graphisch ermittelt (Abb. 9) und gibt die Zeit an, in der die maximale Stromamplitude (I_{max}) auf 1/e abgefallen ist. Die Spannung (U_{Diff}) ergab sich aus der angelegten Spannungsdifferenz des Pulses –40/-50mV und betrug somit 10mV. In einer Kontrollmessung zur Bestimmung der Membrankapazität konnte, nach Einsetzen der Werte in die Formel, eine Membrankapazität für das Zellmodell1 (C_{m1}) von 103,2pF und für das Zellmodell2 (C_{m2}) von 105,4pF ermittelt werden. Bei einem vorgegebenen Wert von 100pF betrug der Fehler \leq 5%.



Abb. 9: Gespreizter Ausschnitt des kapazitiven Ladestromes der Abb. 8b zur Berechnung der Membrankapazität des Zellmodells1 (C_{m1}). Die Zeitkonstante (ι) wurde graphisch ermittelt und betrug 0,47ms. Die Kapazität des Zellmodells1 betrug 103,2pF. (vorgegeben 100pF)

Die anschließenden Messungen sollten den Fehler der Messung des Gap-Junction-Widerstandes (R_j) ermitteln. Dazu wurde an beiden Zellmodellen ein Haltepotential von -40mV angelegt. An Zellmodell2 wurde der Puls zur Bestimmung des Gap-Junction-Stromes aktiviert (-50mV bis +50mV in 10mV Schritten für 200ms (Abb. 10a), und das Potential an Zellmodell1 auf –40mV konstant gehalten (Abb. 10b). Die Spannungsdifferenzen über dem Gap-Junction-Widerstand führten zu einem Stromfluß, der gemessen wurde (Abb. 10c). Aus den Stromwerten und den dazugehörigen transjunctionalen Spannungen (U_{transj}) wurde eine Strom/Spannungskurve erstellt, deren Steigung die transjunctionale Leitfähigkeit (g_j) und somit den Widerstand (R_i), berechnete (Abb.10d).





Es wurden insgesamt sieben Kontrollmessungen zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. Die gemessenen Kontrollwerte mit ihren Meßfehlern sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt:

Versuch Nr.	Gap-Junction-Widerstand in $M\Omega$	Fehler in %
1	10,59	5,9
2	10,59	5,9
3	10,61	6,1
4	10,51	5,1
5	10,87	8,7
6	10,97	9,7
7	9,45	5,5

Tab. 3: Kontrollmessungen des Gap-Junction–Widerstandes mit ihren Meßfehlern.

27

Der Mittelwert der Gap-Junction-Widerstände aller Kontrollmessungen (n=7) ergab einen Wert von $10,51M\Omega$ und entsprach somit einen Fehler von 5,1%. Der Fehler liegt sehr viel günstiger als der Fehler mit konventioneller Patch-Clamp-Technik bei der Messung von Gap-Junction-Strömen. (bis zu 100% Fehler [Weingart 1986], 70% Fehler [van Rijen et al. 1998])

3.2.4 Chlorieren der Silberdrähte

Potentialdifferenzen zwischen den Elektroden (zwei Pipettenelektroden, eine Badelektrode) sollen immer Null betragen, wenn sie in Chloridlösung derselben Konzentration getaucht werden. Das wird erreicht durch die Benutzung von gleichmäßig chlorierten Silberdrähten (Elektroden). Weisen die Elektroden Defekte der Chloridschicht auf, kommt es zu Potentialdifferenzen zwischen den Elektroden, die sich auf das Membranpotential aufaddieren können.

Dazu wurde die Oberfläche der Elektroden mit feinen Sandpapier abgeschliffen, in Alkohol gereinigt und getrocknet. Anschließend wurde der Silberdraht an die Anode einer 4,5V Batterie angeschlossen. Anode mit Silberdraht und Kathode der Batterie wurden nun in eine 3% KCI-Lösung getaucht. Durch Abzug von Elektronen verschiebt sich das Reaktionsgleich-gewicht auf die rechte Seite. Am Silberdraht der Anode bildet sich eine Silberchloridschicht.

$Ag + Cl^{-} \leftrightarrow AgCl + e^{-}$

Gleichmäßig chlorierte Elektroden besaßen einen matt-grauen Überzug. Alle Elektroden wurden einmal pro Monat neu chloriert.

3.2.5 Herstellung der Patchpipetten

Patchpipetten sind durch ihre Wandstärke und ihren spezifischen elektrischen Widerstand charakterisiert. Der Widerstand ist abhängig von der Pipettenspitzenöffnung und der Form der Flanken [Numberger und Draguhn 1996]. Diese Parameter müssen beachtet werden, wenn Pipetten mit speziellen Eigenschaften für ihre Anwendungsgebiete hergestellt werden sollen. Für die Ganzzellableitung ist es erforderlich, Pipetten mit einem elektrischen Widerstand zwischen 2-5M Ω und guten Sealeigenschaften herzustellen.

Deshalb wurden mittelharte Borsilikatglasrohlinge mit Filament (GB150F-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Germany) zur Herstellung der Pipetten verwendet. Sie haben ihren Schmelzpunkt bei 700-800°C. Der Rohling wurde in ein vorgewärmtes

Pipettenziehgerät (Puller PIP 5, Heka, Lambrecht, Germany) eingespannt, und durch zwei Ziehschritte in zwei Pipetten geteilt. Die Temperatur der Heizspirale läßt sich durch die Größe der Stromzufuhr regeln. Der erste Schritt erfolgte bei 1400°C und zog den Rohling bis auf 1cm aus, so daß sich der Teil des Rohlings innerhalb der Heizspirale verjüngte. Danach wurde der Rohling neu eingespannt, so daß die verjüngte Stelle direkt innerhalb der Heizspirale saß. Der zweite Schritt ist verantwortlich für die Form, und bestimmt somit die Eigenschaften der Pipette. In Abhängigkeit der Raumtemperatur wurde eine Temperatur der Heizspirale zwischen 700-800°C eingestellt. Bei dieser Temperatur zog sich die verjüngte Stelle des Rohlings soweit aus, bis sie riß. Man erhielt zwei gleichwertige Pipetten.

Vor jedem Experiment wurden die Pipetten neu gezogen. Anschließend wurden die Pipetten in einer geschlossenen Box gelagert, damit sie nicht von Staub und Schmutz verunreinigt werden konnten.

3.2.6 Versuchsdurchführung und Meßprotokoll

Vorbereitung

Alle Messungen wurden an frisch isolierten Kardiomyozytenpaaren (Kap. 3.1) vorgenommen. Dazu mußten ca. 6 Tropfen der fertigen Zellsuspension in die Meßkammer überführt werden. Anschließend wurden die Zellen mit Tyrodelösung + Calcium superfundiert (5min bei 2ml/min). Die Meßkammer enthielt gerade soviel Flüssigkeit, daß Zellen und Elektroden mit Lösung bedeckt waren (ca. 2ml). Durch ein Überfüllen der Meßkammer würde es zu einem größeren Kontakt zwischen Pipette und Badlösung kommen, so daß eine Zunahme der Streukapazitäten die Folge wäre. Nach ca. 5 bis 10 Minuten setzten sich die Zellen am Boden der Meßkammer ab.

Die neu gezogenen Pipetten (Kap. 3.2.5) wurden mit Pipettenlösung gefüllt. Dabei hatte der Silberdraht so wenig wie möglich Kontakt zur Pipettenflüssigkeit, damit die Gesamtkapazität der Pipette möglichst gering gehalten wurde. Luftblasen mußten durch beklopfen der Pipette entfernt werden, da sie den Pipettenwiderstand extrem erhöhten. Danach wurde die Pipette in den Pipettenhalter eingesetzt, und mittels einer Kolbenspritze ein leichter Überdruck auf die Pipettenflüssigkeit gegeben, so daß ständig etwas Pipettenlösung aus der Pipettenöffnung ausströmte. So konnte ein Zusetzen der Pipettenöffnung mit Dreck und Proteinen beim Eintauchen der Pipette in das Bad verhindert werden. Beide Pipetten wurden in das Bad gebracht und durch Mikromanipulatoren dicht über die Zellen positioniert.
Verstärker abgleichen

Messungen an Zellpaaren müssen mit einer hohen Genauigkeit durchgeführt werden, weil die gemessenen Ströme sehr gering sind. Die Meßapparatur reagiert sehr empfindlich auf Störquellen, wodurch fehlerhafte Meßergebnisse resultieren können. Darum müssen mögliche Fehlerquellen erkannt, und durch das Abgleichen der Verstärker beseitigt werden. Dazu gehört:

- 1. Korrektur des Offsetpotentials
- 2. Kontrolle des Pipettenwiderstandes
- 3. Kompensation des Pipettenwiderstandes
- 4. Kapazitätskompensation

Offsetpotentiale sind Spannungen die an Übergängen innerhalb der Meßkette Silberdraht – Pipettenlösung – Badlösung - Erde entstehen. Dafür können im wesentlichen zwei Ursachen verantwortlich sein. Zum einen sind es Polarisierungen zwischen der Silber-Silberchloridelektrodenschicht, zum anderen sind es Übergangspotentiale zwischen Badlösung und Pipettenlösung. Offsetpotentiale haben die Eigenschaft sich auf das Potential der Zelle zu addieren, und führen somit zu einer fehlerhaften Spannungskontrolle der Zellmembran. Bei der Justierung des Offset definiert man den Nullpunkt als das Potential, an dem zwischen Pipette und Bad kein Strom fließt. Dazu wurde der Verstärker in "bridge mode" geschaltet. Das Offsetpotentiometer wurde so eingestellt, daß am Voltmeter des Verstärkers 0mV angezeigt wurde.

Anschließend wurde der Pipettenwiderstand (R_{Pip}) bestimmt. Für Ganzzellableitungen soll er zwischen 2 bis 5M Ω betragen, und wird entscheidend durch den Ziehvorgang bestimmt (Kap. 3.2.5). Dafür wurde der Verstärker in die entsprechende Betriebsart geschaltet. Der Verstärker legt eine definierte Spannung über die Pipette an und mißt den durchfließenden Strom. Nach dem Ohmschen Gesetz wird der Pipettenwiderstand durch den Verstärker berechnet, und konnte am Display abgelesen werden. Lag der Wert nicht im zulässigen Bereich (2 – 5M Ω) wurde die Pipette ausgetauscht.

Danach wurde der Pipettenwiderstand kompensiert. Ohne Kompensation würde bei jeder Strominjektion ein Teil der Sollspannung schon am Pipettenwiderstand abfallen, und sich dadurch eine zu geringe Spannung an der Membran aufbauen. Der Spannungsverlust wird kompensiert, indem zur Kommandospannung eine Spannung dazu addiert wird, die proportional zum gerade eingespeisten Strom ist. Das Umladen der Zellmembran wird beschleunigt. Dazu wurde der Verstärker in den "bridge mode" geschaltet. Softwaregesteuert wurde ein repetitiver Strom (1nA; 30ms) in das Bad appliziert. Die dadurch entstandene Spannung an der Pipette wurde durch das "bridge-balance"-Potentiometer auf 0mV korrigiert. Somit nahm der Pipettenwiderstand keinen Einfluß mehr auf die nachfolgenden Messungen.

Zum Schluß wurde die Kapazität der Stromleiter kompensiert. Bei jeder Änderung der Kommandospannung kommt es, hervorgerufen durch die Kapazität, zunächst zu einem Umladeprozeß der Stromleiter. Bei rechteckigen Sprüngen der Kommandospannung kommt es zu exponentiell ansteigenden und abfallenden Strömen. Der Verstärker kann bei der Injektion der hohen kapazitiven Ströme in die Sättigung getrieben werden. Dazu wurde der Verstärker in den "current-clamp"-Modus geschaltet. Es wurde ein Strom von 150nA Größe bei einer "switching frequency" von 1kHz aktiviert. Der applizierte Strom ist ein Rechtecksignal und soll am Oszilloskop des Elektrodenpotentials ein rechteckiges Potential hervorrufen. In diesem Fall wird die Kapazität durch die elektronische Schaltung kompensiert. Dafür bietet der Verstärker zwei Kompensationsmechanismen an. Die grobe Einstellung erfolgte am "headstage", und nimmt eine Anpassung der Zeitkonstantenbandbreite an die verwendete Pipette vor. Die Feinjustierung der Kapazitätskompensation erfolgte am Verstärker. Diese Methode beruht auf einer konventionellen Feedback-Kompensation. Danach wurde die "switching frequency" auf 35kHz eingestellt. Die Kapazitätskompensation wurde nochmals kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Nur bei korrekter Kompensation der Kapazität mißt der Verstärker am Ende eines stromfreien Intervalls das wahre Membranpotential. Das Potential, daß durch die vorangegangene Strominjektion entstanden war, ist zu diesem Zeitpunkt abgeklungen. Durch eine fehlerhafte Kompensation würde sich das strominjektions-induzierte Potential nicht schnell genug abbauen, und sich zum Zeitpunkt der Potentialmessung auf das Membranpotential dazu addieren. Die gewünschte Kommandospannung würde nicht an der Membran anliegen. Nach Abgleichung der Verstärker konnten die Pipetten in Kontakt zur Zellmembran gebracht werden.

Herstellung der Cell-Attached-Konfiguration

Die Cell-Attached-Konfiguration bezeichnet eine Meßanordnung, bei der zwischen Zellmembran und Pipette ein sehr dichter Kontakt entsteht, so daß der elektrische Widerstand mehrere Gigaohm beträgt. Die Membran unter der Zelle bleibt intakt, wird aber durch Unterdruck in den Öffnungsbereich der Pipette gesaugt. Ist der Abdichtwiderstand zu gering (<1G Ω) entstehen Leckströme (I_{offset}). Sie verursachen erhöhte Meßwerte und ein zunehmendes elektrisches Hintergrundrauschen. Deshalb soll der Sealwiderstand über 1G Ω betragen. Dazu wurde der Verstärker in den Voltage-Clamp-Modus geschaltet. Softwaregesteuert wurde ein repetitiver Puls (10mV, 20ms) aktiviert. Am Potentiometer

"gain" wurde der optimale Verstärkungsfaktor gewählt. Mit Hilfe der elektrisch fernsteuerbaren Mikromanipulatoren wurde der letzte Schritt der Annäherung der Pipette an die Zellmembran durchgeführt, indem die Pipetten langsam durch ein Fingerrad gesteuert, senkrecht auf die Zellen herabgelassen wurden. Dieser Schritt mußte sehr langsam und vorsichtig erfolgen, da die Zellmembran sehr empfindlich auf mechanische Reize reagiert. Die Entfernung der Pipettenspitze von der Zellmembran konnte durch zwei charakteristische Phänomene bestimmt werden. Zum einen mußte das Stromsignal beobachtet werden. Je enger der Kontakt zwischen Pipette und Membran war, desto kleiner wurde das Stromsignal. Wenn das Stromsignal auf 2/3 des ursprünglichen Wertes abgefallen war, durfte die Pipette nicht weiter abgesenkt werden. Zum anderen mußte die Oberfläche der Membran beobachtet werden. Wenn die Pipette sehr dicht an der Membran war, konnte ein leichtes Auseinanderweichen der Querstreifung, und ein charakteristischer Lichtreflex beobachtet werden. Diese Phänomene entstanden, wenn der Strahl der Pipettenlösung, durch den Überdruck, die Zellmembran eindellte. Das waren sichere Zeichen den Überdruck zu entlasten, und eventuell einen sehr geringen Unterdruck an die Pipette durch vorsichtiges saugen anzulegen. Die Membran stülpte sich dann in den Öffnungsbereich der Pipette und bildete einen festen Seal aus, daß durch ein oszillierendes Stromsignal am Oszilloskop angezeigt wurde. Nachdem der "gain" zurückgenommen wurde, konnte man das charakteristische Stromsignal der Cell-Attached-Konfiguration erkennen. Die zwei kapazitiven Artefakte zeigten den Umladeprozeß der Zellmembran innerhalb der Pipettenöffnung an. Der Offsetstrom zwischen den beiden kapazitiven Artefakten gab Aufschluß wie groß der Strom war, der seitlich am Seal vorbei in das Bad floß (Leckstrom). Aus ihm ließ sich der Sealwiderstand bestimmen. Der Unterdruck wurde nun abgelassen, um die Membran mechanisch zu schonen, und ein Aktivieren von mechanosensitiven Kanälen zu verhindern.

Herstellung der Whole-Cell-Konfiguration

Die Whole-Cell-Konfiguration ist dadurch charakterisiert, daß die Membran unter der Pipette aufgebrochen ist. Dadurch wird eine Spannungskontrolle über die gesamte Zellmembran möglich. Nach kurzer Zeit tauscht sich das Zytoplasma mit der Pipettenlösung aus. Wegen dem viel größeren Volumen der Pipettenlösung im Verhältnis zum Volumen des Zytoplasmas werden klar definierte, aber auch artifizielle Verhältnisse des intrazellulären Milieus geschaffen. Dabei ist das Einwaschen von Wirkstoffen wie HBDDE, CGP54345 und Monensin möglich. Außerdem ist von Bedeutung, daß energiereiche Substanzen wie ATP und GTP ausgewaschen werden. Sie sind für die Funktion der Kanäle unerläßlich, und können bei zu niedriger intrazellulärer Konzentration für einen verstärkten "run down" der Kanäle verantwortlich sein [Sugiura et al. 1990, Verrecchia et al. 1999]. Deshalb wurde ATP und GTP der Pipettenlösung substituiert.

Um die Whole-Cell-Konfiguration zu etablieren, wurde am Verstärker der Puls -80/-40mV aktiviert (Voltage-Clamp-Modus). Dabei wurde ein sich wiederholender Spannungssprung von –80mV auf –40mV an die Membran innerhalb der Pipette angelegt. Durch pulsierendes Anlegen eines Unterdrucks (saugen und entlasten) wurde die Membran unter der Pipettenöffnung durchbrochen. Das Stromsignal änderte sich dabei schlagartig. Die kapazitiven Ladeströme und der Offsetstrom nahmen stark zu. An das Zellpaar wurde ein negatives Haltepotential von -40mV angelegt, um die Na⁺-Kanäle zu inaktivieren. Danach wurde die Tyrodelösung durch extrazelluläre Badlösung (enthält 1mM Bariumchlorid, Perfusion 5min bei 2ml/min) ausgetauscht. Barium hat die Eigenschaft K⁺-Kanäle zu blockieren, und erhöht somit den Membranwiderstand. Dadurch verbesserte sich die Spannungskontrolle der Zelle, das elektrische Rauschen wurde vermindert, und der Seal konnte sich stabilisieren. Danach wurde der Puls -80/-40mV nochmals angelegt. Der Verstärker legt den Spannungssprung nun an die gesamte Zellmembran an, so daß ein deutlicher Na⁺-Einstrom durch Öffnen der Na⁺-Kanäle am Oszilloskop sichtbar wurde. Der Na⁺-Einstrom ist Resultat der Spannungskontrolle über die gesamte Zellmembran, und zeigte somit die Etablierung der Whole-Cell-Konfiguration an. Dann wurde der Puls -40/-50mV aktiviert, um die Na⁺-Kanäle elektrisch zu inaktivieren, so daß die passiven elektrischen Eigenschaften der Zelle sichtbar wurden. Die kapazitiven Ladeströme zeigten nun den Umladeprozeß der gesamten Zellmembran, weswegen sie deutlich zunahmen. Daraus ließ sich die Zellkapazität und die Größe der Zellmembran berechnen. Aus der Größe des Peaks konnte der Serienwiderstand berechnet werden, da in dieser Phase der Membranwiderstand kurz geschaltet war. Aus dem Offsetstrom wurde der Membranwiderstand berechnet. Der Quotient aus Serienwiderstand und Membranwiderstand erlaubte eine Einschätzung der Güte der Whole-Cell-Konfiguration [Numberger und Draguhn 1996]. Deswegen wurden diese Kontrollmessungen jeder Gap-Junction-Messung vorangestellt.

Zu Beginn eines Experimentes mußte der maximal mögliche Verstärkungsfaktor (gain) eingestellt werden. Das wurde erreicht, indem der "gain" so gewählt wurde, daß das Signal gerade nicht oszillierte. Ein weiteres Problem stellte die Zunahme der Kapazitäten dar. Dadurch rundeten sich die Ecken des rechteckigen Spannungssignals deutlich ab. Dem wurde durch Zuschalten des Proportional-Integral-Controllers ("integrator time constant") und der "rise time" entgegengewirkt, die eine sehr exakte Spannungskontrolle ermöglichten (steady state – Fehler < 1%, [Polder 1996]). Anschließend wurde das Filter auf 2kHz eingestellt. Das gewährleistete ein optimales Herauslösen des bioelektrischen Signals vom

Hintergrundrauschen ohne es wesentlich zu verändern. Das System war nun zur Messung des Gap-Junction-Stromes bereit.

Gap-Junction-Strommessung

Das Zellpaar befand sich in der "double-whole-cell-patch-clamp"-Konfiguration (Abb. 11). Beide Verstärker generierten am Zellpaar ein Haltepotential von –40mV, um die Na⁺-Kanäle der Zellmembran zu inaktivieren. Für die Gap-Junction-Strommessung wurde die Zelle 2 des Zellpaares ausgehend vom Haltepotential (-40mV) auf Werte zwischen –130 bis 50mV in 10mV-Schritten für 200ms geklemmt. An der Zelle 1 des Zellpaares lag weiterhin das Haltepotential von –40mV an der Membran an. Das führte zu einer transjunctionalen Spannungsdifferenz von –90 bis 90mV zwischen Zelle 1 und Zelle 2. Abhängig von der Spannungsdifferenz floß ein Strom, der zwei unterschiedliche Wege nahm. Der Strom kann einerseits über den Membranwiderstand zum Erdleiter fließen, oder andererseits über den Gap-Junction-Widerstand in die gekoppelte Zelle strömen. Aus der Messung der Ströme ließ sich die Gap-Junction-Leitfähigkeit berechnen.



Abb.: 11: Ersatzschaltbild der "double-whole-cell-patch-clamp"-Konfiguration, nach Kolb [1992].
(V_p1,2) Pipettenpotential, (V1,2) Membranpotential, (I1,2) Strom durch die Pipette, (I_m1,2) Strom durch die Zellmembran, (I_j) Strom durch den Gj- Widerstand, (R_s1,2) Serienwiderstand, (R_m1,2) Membranwiderstand, (C_m1,2) Membrankapazität, (R_j) GapJunction-Widerstand

Nach dem Ohmschen Gesetz gilt:

R=U/I in $[\Omega]$ Ohm

Der elektrische Widerstand ist das Verhältnis der angelegten Spannung zum fließenden Strom. Nach Umformen der Gleichung kommt man zum Gesetz der elektrischen Leitfähigkeit:

Man versteht darunter den Kehrwert des Widerstandes.

Der Strom der Zelle 1 (I_1) kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$I_1 = V_1 / R_{m1} + (V_1 - V_2) / R_j$$

Der erste Summand der Formel berechnet den Stromfluß über die Zellmembran. Der zweite Summand berechnet den Strom über die Gap Junctions. Entsprechend dazu ist der Strom in Zelle 2:

$$I_2 = V_2 / R_{m2} + (V_2 - V_1) / R_j$$

Befindet sich Zelle 2 auf ein gleichbleibendes Haltepotential, so daß $V_2=V_h$, gelten für I_1 und I_2 folgende vereinfachende Gleichungen:

$$I_1 = V_1 / R_{m1} + V_1 / R_j$$

 $I_2 = V_1 / R_j$

Aus der letzten Gleichung ist ersichtlich, das I₂ eine direkte Messung des Stromflusses durch die Gap-Junction-Kanäle darstellt, die eine Berechnung des Gap-Junction-Widerstandes und der Gap-Junction-Leitfähigkeit ermöglichten.

An einem Zellpaar wurden innerhalb eines Versuches 6 Gap-Junction-Strommessungen in einem Abstand von jeweils 10 Minuten durchgeführt. Daraus resultierte eine Versuchsdauer von insgesamt 50 Minuten, die in 4 verschiedene Meßphasen eingeteilt wurde (Tab. 3). Da während der ersten 20 Minuten vermehrt Schwankungen des Sealwiderstandes auftraten, bedurfte es einer Stabilisierungsphase (0. bis 20. Minute), in der sich der Seal weiter festigte. Am Anfang, zum Zeitpunkt t=0min, wurde die Initialleitfähigkeit bestimmt. In der anschließenden Kontrollphase (20. bis 30. Minute) erfolgte die Bestimmung des "run down" der Gap-Junction-Kanäle. Dazu wurde die Differenz der Leitfähigkeiten der Gap-Junction-Strommessungen der 20. und 30. Minute gebildet. Danach folgte eine 9-minütige Perfusion des Bades mit modifizierter Tyrodelösung +1mM BaCl₂ + 50nmol/I AAP10 bei 2ml/min Perfusionsgeschwindigkeit. Laut Numberger und Draguhn [1996] muß das fünf- bis zehnfache des Kammervolumens eingewaschen werden, um die gewünschte Konzentration des Perfusats im Bad zu erhalten. In der Meßkammer befanden sich 2ml Lösung, so daß die Perfusionsmenge von 18ml das neunfache der Badlösung darstellte. Schließlich wurde nach Einwaschen des AAP10 (40. Minute) der Effekt des Antiarrhythmischen Peptides bei einer Konzentration von 50 nM durch die Differenz der Leitfähigkeiten der 30. und 40. Minute bestimmt. Anschließend wurde AAP10 ausgewaschen (9 Minuten bei 2ml/min, mit modifizierter Tyrodelösung + 1mM BaCl₂), so daß die Gap-Junction-Strommessung am Ende der Auswaschphase (50.Minute) ohne AAP10 erfolgte. Der Auswascheffekt wurde durch Bildung der Differenz der Leitfähigkeiten der 40. und 50. Minute ermittelt.

Zeit	Meßphase	Ziel
0-20min	Stabilisierungsphase	Stabilisierung des Seals
20-30min	Kontrollphase	Messung des "run down"
30-40min	AAP10-Phase	Messung des AAP10-Effektes
40-50min	Auswaschphase	Messung des Auswascheffektes

Tab. 3: Meßprotokoll der Gap-Junction-Messungen

3.3 Auswertung der Versuchsergebnisse und Statistik

Die Meßpunkte lagen digitalisiert als Wertepaare von Strom und Spannung vor. Es wurden die Stromwerte für jede Messung und jeden Spannungssprung durch Mittelwertbildung der einzelnen Strommeßpunkte innerhalb des "steady state" ermittelt. Der "steady state" ist gekennzeichnet durch den linearen Verlauf der Geraden der Strom-Spannungsbeziehung, und befindet sich am Ende der Stromspur (die letzten 50ms der 200ms langen Stromspur). Aus jedem Meßzyklus erhielt man 19 Stromwerte die in einem Diagramm gegen die dazugehörigen transjunctionalen Spannungen abgetragen wurden. Durch lineare Regression wurde die Steigung der Geraden ermittelt, die den junctionalen Leitfähigkeitswert (g_j) angab. Die Leitfähigkeitswerte einer Versuchsgruppe wurden durch Bildung des Mittelwertes und den dazugehörigen Standardfehler des Mittelwertes aus den einzelnen Leitfähigkeiten der Versuche gebildet. Mit Hilfe der Varianzanalyse für wiederholte Messungen und des post hoc Wilcoxon-Testes wurden die einzelnen Meßphasen innerhalb einer Versuchsgruppe, und die Versuchsgruppen innerhalb der AAP10-Phase, auf signifikante Unterschiede untersucht.

4. Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Versuchsergebnisse aufgeführt werden. Zuerst werden die elektrischen Eigenschaften eines Meerschweinchenkardiomyozytenpaares dargestellt. Danach wird eine Übersicht über die Gap-Junction-Strommessungen der einzelnen Meßreihen gegeben, die im Anschluß daran noch einmal zusammengefaßt dargestellt werden.

4.1 Darstellung der elektrischen Eigenschaften eines Meerschweinchenkardiomyozytenpaares mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik

Im Methodenteil konnte mittels eines Zellmodells die Genauigkeit der Messungen durch die verwendeten diskontinuierlichen Voltage-Clamp-Verstärker (dSEVC-Verstärker) gezeigt werden. Um exakte Meßergebnisse auch an Kardiomyozyten zu erhalten, mußten alle Zellpaare, die zur Gap-Junction-Strommessung herangezogen wurden, folgenden Einschlußkriterien genügen:

- 1. Sealwiderstand (R_{seal}) >1G Ω
- 2. Serienwiderstand (R_s) 5-50M Ω
- 3. Membranwiderstand (R_m) 100-1000M Ω
- 4. Membrankapazität (Cm) 50-220pF

Innerhalb dieser Einschlußkriterien konnte, durch die Arbeit von Müller et al. [1999], die hohe Präzision der Gap-Junction-Strommessung mittels diskontinuierliche Voltage-Clamp-Verstärker (dSEVC-Verstärker) nachgewiesen werden (Fehler der Gap-Junction-Strommessung ≤5,1%). Alle Zellpaare wurden vor jeder Gap-Junction-Strommessung dahingehend geprüft, ob die Einschlußkriterien erfüllt waren. Lag ein Zellpaar außerhalb des Normbereichs, wurde die Messung abgebrochen und der Versuch nicht gewertet.

4.1.1 Sealwiderstand

Nach Erreichen der Cell-Attached-Konfiguration (Kap. 3.2.6) wurde der Puls –80/-40mV aktiviert (Abb. 12a), und die resultierende Stromantwort registriert (Abb. 12b), um den Sealwiderstand nach dem Ohmschen Gesetz zu berechnen. Die Differenz der mittleren Stromwerte aller Versuche vor und während des Spannungssprungs ergab einen Wert von 14,71 \pm 1,78pA. Somit betrug der mittlere Sealwiderstand aller Versuche 3,29 \pm 0,27G Ω .



Abb. 12:

Originaldarstellung eines Spannungspulses von –80mV auf –40mV (a), sowie die resultierende Stromantwort in der Cell-Attached-Konfiguration, kurz vor dem "break in" (b) an Meerschweinchenkardiomyozyten. Die kapazitiven Spitzenströme stellen die Umladung der Membran innerhalb des Mündungsbereiches der Pipette dar. Die Differenz der Strommittelwerte, vor und nach Umladung der Membran, betrug 17,4pA. Bei einem Spannungssprung von 40mV errechnet sich nach dem Ohmschen Gesetz ein Sealwiderstand von 2,3 GΩ. Die untere Stromkurve (c) wurde kurz nach dem "break in" in der Whole-Cell-Konfiguration aufgezeichnet. Die stark negative Amplitude zeigt den Natrium-Einstrom (-5541pA) nach Öffnung der Na-Kanäle bei ca. –60mV. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der beiden Stromkurven (b) und (c).

4.1.2 Natrium-Strom

Der Natrium-Strom wird nur in der Whole-Cell-Konfiguration (Kap. 3.2.6) sichtbar, nachdem die Membran innerhalb des Patches durchbrochen wurde. Dadurch erhält man eine Spannungskontrolle über die gesamte Zellmembran. Natrium-Kanäle haben die Eigenschaft, spannungsabhängig bei ca. –60mV, zu öffnen. Das Öffnen der Natrium-Kanäle ist ein Beweis, daß der Patch-Clamp-Verstärker die Kontrolle über das Membranpotential hat, und die Zellmembran durchbrochen wurde. Für alle Versuche konnte ein mittlerer Natrium-Einstrom von 3791 \pm 422pA bestimmt werden. Abb. 12c zeigt eine Darstellung des Natrium-Einstromes kurz nachdem die Zellmembran durchbrochen wurde.

4.1.3 Serienwiderstand

Im Methodenteil wurde dargestellt, daß der Serienwiderstand erheblichen Einfluß auf die Genauigkeit der Meßergebnisse nehmen kann, wenn konventionelle Gap-Junction-Verstärker zur Anwendung kamen. Diskontinuierliche Patch-Clamp-Verstärker (dSEVC-Verstärker) dagegen sind unabhängig vom Serienwiderstand, was Müller et al. [1999], in ihrer Arbeit für einen Bereich zwischen 5-50MΩ, nachweisen konnten.

Um den Serienwiderstand zu messen, wurde in der Whole-Cell-Konfiguration ein Spannungspuls von –40 auf -50mV an die Zellmembran angelegt (Abb. 15a). Im Gegensatz zum Spannungspuls –80/-40mV sind in diesem Fall die Na⁺-Kanäle inaktiviert, so daß die passiven elektrischen Eigenschaften der Membran sichtbar wurden. Die Spannungsdifferenz von 10mV führte zunächst zu einem Umladeprozeß der Zellmembran, die als kapazitive Stromspitzen in der Abb. 15b zu sehen sind. Der kapazitive Widerstand ist während des Umladeprozesses sehr gering, so daß ein großer kapazitiver Spitzenstrom (I_{max}) fließt, der ein Maß für den Serienwiderstand darstellt. Somit kann der Serienwiderstand nach der Formel $R_s=U_0/I_{max}$ berechnet werden [Numberger und Draguhn 1996].

Die gemittelten Serienwiderstände aller Messungen zeigten eine kontinuierlich lineare, zeitabhängige Zunahme des Widerstandswertes von $0,124 \pm 0,021 M\Omega/min$ für Zelle 1, und $0,052 \pm 0,021 M\Omega/min$ für Zelle 2 (Tab. 4, Abb. 13).

	0min	10min	20min	30min	40min	50min
Rs_1 in $M\Omega$	11,5 ±0,8	12,7 ± 1,1	13,1 ± 0,9	$14,7 \pm 1,1$	15,5 ± 1,2	17,7 ± 1,2
Rs_2 in $M\Omega$	12,8 ±1,0	12,8 + 1,0	$14,7\pm1,1$	$14,8\pm1,1$	$15,3\pm1,1$	15,4 + 1,1

Tab. 4:Mittelwerte und Standardfehler der Serienwiderstände für Zelle 1 (Rs1) und Zelle 2
(Rs2) in Abhängigkeit der Zeit.



Abb. 13: Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Serienwiderstände für Zelle 1 (Rs₁) und Zelle 2 (Rs₂) in Abhängigkeit der Zeit.

4.1.4 Membranwiderstand

Der Membranwiderstand stellt den Ohmschen Widerstand der Zellmembran dar. Der Membranwiderstand wurde aus der selben Abbildung, aus der schon der Serienwiderstand bestimmt wurde, ermittelt (Abb. 15b). In diesem Fall wurde die Stromdifferenz vor und nach der kapazitiven Stromspitze gebildet. Nachdem der Umladeprozeß der Zellmembran abgeschlossen ist, wird der kapazitive Widerstand sehr groß, und der Strom fließt nun durch den Membranwiderstand in das Bad. Zu diesem Zeitpunkt konnte der Membranwiderstand nach der Formel $R_m=U_0/I_{offset}$ berechnet werden. Der Membranwiderstand war am Anfang der Messungen (t = 0min) etwas geringer ausgefallen. Ab der 10. bis 50. Minute konnte ein näherungsweise konstanter Verlauf des Membranwiderstandes registriert werden (Tab. 5, Abb. 14).

	0min	10min	20min	30min	40min	50min
Rm_1 in $M\Omega$	457 ± 65	587 ± 92	528 ± 69	573 ± 87	535 ± 56	561 ±63
Rm_2 in $M\Omega$	504 ± 78	560 ± 85	573 ±86	569 ±92	553 ±91	554 ± 85

Tab. 5:Mittelwerte und Standardfehler der Membranwiderstände für Zelle 1 (Rm1) und Zelle 2
(Rm2) in Abhängigkeit der Zeit



Abb. 14: Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der Membranwiderstände für Zelle 1 (Rm₁) und Zelle 2 (Rm₂).





Originalregistrierung an Meerschweinchenkardiomyozyten von dem angelegten Spannungspuls –40/-50mV (a) und der resultierenden Stromantwort (b) zur Berechnung des Serienwiderstandes und des Membranwiderstandes. Die Stromspitzen stellen den kapazitiven Ladestrom (I_{max} = 1013pA) dar. Er ist ein Maß für den Serienwiderstand, der nach der Formel R_s=U/I_{max} auf 9,9MΩ berechnet wurde. Der Offsetstrom (I_{offset} = 46pA) stellt die Stromdifferenz in der Whole-Cell-Konfiguration zwischen den Strömen vor und während des Spannungspulses dar, und ist ein Maß für den Membranwiderstand (R_m), der nach der Formel R_m=U/I_{offset} 217MΩ betrug.

4.1.5 Membrankapazität

Die Membrankapazität ist ein Maß für die Größe der Zellmembran. Sie sollte im Bereich zwischen 50-220pF liegen, weil Zellen mit einem zu großen Zellvolumen eine schlechte Spannungskontrolle aufweisen können.

Auch die Berechnung der Membrankapazität erfolgte aus einem gespreizten Ausschnitt der Stromkurve der Abb. 15b. Zunächst mußte graphisch die Zeitkonstante (τ) ermittelt werden. Sie stellt die Zeit dar, in dem der maximale kapazitive Strom (I_{max}) auf 1/e abgefallen ist. Die Membrankapazität konnte dann nach der Formel $C_m = I_{max} \star \tau/U_0$ berechnet werden. Für alle Versuche konnte eine mittlere Membrankapazität von 150 ± 22pF ermittelt werden.



Abb. 16: Gespreizter Ausschnitt des kapazitiven Ladestromes der Abb. 15b zur Berechnung der Membrankapazität mit Hilfe der Formel C_m=I_{max}*τ/U, für I_{max}=1203pA, und U=10mV. Die Zeitkonstante (τ) wurde graphisch ermittelt und betrug 1,44ms, woraus sich eine Membrankapazität von 173pF ergab.

4.2 Gap-Junction-Kanal-Strommessung an Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik

Vorangegangene Arbeiten zur Untersuchung der Gap-Junction-Kanal-Leitfähigkeit unter Wirkung des AAP10 hatten gezeigt, daß AAP10 die Leitfähigkeit der Gap-Junctions erhöhte [Müller et al. 1997a,b, Schaefer et al. 1999]. Außerdem konnte, durch zusätzliche Gabe des Proteinkinase-C-Inhibitors BIM I (0,2µM) in die Pipettenlösung, eine verminderte Leitfähigkeit der Gap-Junctions nachgewiesen werden [Schaefer 2000, Schaefer et al. 1999]. Daraus schlußfolgerten Dhein et al. [1999b], daß die Wirkung des AAP10 vermutlich über die Proteinkinase C vermittelt wurde. Diese Arbeit sollte die Frage klären, welche Subtypen der Proteinkinase C bei der Vermittlung der Wirkung des AAP10 eine Rolle spielen können.

Deshalb galt das Hauptaugenmerk der Messung des Gap-Junction-Stromes an elektrisch gekoppelten Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren.

Dazu wurde nach erreichen der Whole-Cell-Konfiguration eine transjunctionale Spannungstreppe von –90mV bis +90mV in 10mV-Schritten zwischen das Zellpaar angelegt, und der daraus resultierende, transjunctionale Stromfluß gemessen.

4.2.1 Kontrollserie

Die mittlere initiale Leitfähigkeit (t=0 Min.) der Kontrollserie betrug 56,5±14,1nS. Während der Kontrollphase (20.-30. Min.) zeigte die Kontrollserie den typischen "run down" der Gap-Junction-Leitfähigkeit (-406±219pS/min), der durch Zugabe des AAP10 (50nM) (30.-40.Min.) antagonisiert werden konnte, und zu einer signifikanten Zunahme der Leitfähigkeit auf +282±193pS/min führte. Nach Auswaschen des AAP10 (40.-50. Min.) kehrten sich die Verhältnisse wieder um, und ein signifikanter Rückgang der Leitfähigkeit konnte beobachtet werden (-1177±481pS/min).



Abb. 17: Darstellung der Gap-Junction-Leitfähigkeitsänderung in pS/min der Kontrollserie (n=6 Versuche) während der einzelnen Meßphasen. In der Kontrollphase war eine Abnahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit zu beobachten, die nach Einwaschen des AAP10 antagonisiert werden konnte, und zu einer signifikanten Zunahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit führte. Nach Auswaschen des AAP10 wurde eine, im Vergleich zur AAP10-Phase, signifikante Abnahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit registriert.





4.2.2 HBDDE-Serie

Um isoformspezifisch die PKCα und die PKCγ zu hemmen, wurde HBDDE (50µM) der Pipettenlösung zugesetzt. Die mittlere initiale Leitfähigkeit (t=0 Min.) der HBDDE-Serie betrug 53,2±6,4nS. Die Kontrollphase (20.-30. Min.) der HBDDE-Serie zeigte einen "run down" der Gap-Junction-Leitfähigkeit von -700±171pS/min. Durch Einwaschen des AAP10 (50nM) (30.-40. Min) konnte ein leichter, nicht signifikanter Rückgang des "run down" verzeichnet werden, der weiterhin im negativen Bereich lag (-258±205pS/min). Der in der

44

Kontrollserie gesehene Effekt des AAP10, nämlich eine Umkehr des "run down" und eine Zunahme der Leitfähigkeit, war somit weitgehend gehemmt.



Abb. 19: Darstellung der Gap-Junction-Leitfähigkeitsänderung in pS/min der HBDDE-Serie (n=6 Versuche) während der einzelnen Meßphasen. Im Vergleich zur Kontrollserie wurde der AAP10-Effekt weitgehend gehemmt.





$$\begin{split} R_{pip1} = & 6M\Omega; \quad R_{pip2} = & 5M\Omega; \quad R_{s1} = & 21M\Omega; \quad R_{s2} = & 23M\Omega; \quad R_{m1} = & 990M\Omega; \quad R_{m2} = & 644M\Omega; \\ & C_{m1} = & 160pF; \quad C_{m2} = & 187pF \end{split}$$

4.2.3 CGP54345-Serie

In dieser Versuchsserie wurde CGP54345 (10μM) eingesetzt, um isoformspezifisch die PKCα zu hemmen. Die mittlere initiale Leitfähigkeit (t=0 Min.) der CGP54345-Serie betrug 54,7±10,2nS. Der "run down" der Gap-Junction-Leitfähigkeit der Kontrollphase (20.-30. Min.) lag zwischen dem der Kontrollserie und der HBDDE-Serie bei -587±211pS/min. Durch Einwaschen des AAP10 (50nM) (30.-40. Min.) konnte auch in dieser Versuchsserie keine signifikante Leitfähigkeitssteigerung registriert werden. Lediglich ein leichter Rückgang des

"run down" wurde gemessen (-351±204pS/min). Es zeigte sich also im Vergleich zu der Kontrollserie eine signifikante Aufhebung des AAP10-Effektes durch CGP54345.



Abb. 21:Darstellung der Gap-Junction-Leitfähigkeitsänderung in pS/min der CGP54345-Serie
(n=6 Versuche) während der einzelnen Meßphasen. Der AAP10-Effekt konnte im
Vergleich zur Kontrollserie signifikant aufgehoben werden.





Originalregistrierung von Gap-Junction-Strömen (c) der CGP54345-Serie (10μM) an Meerschweinchenkardiomyozyten. Die Stromaufzeichnung erfolgte in Zelle 1 (c) nach transjunctionalen Spannungssprüngen von –90 bis +90mV in Zelle 2 (a) ausgehend von einem Haltepotential von –40mV in Zelle 1 (b) und 2 (a). Auch in diesem Beispiel war ein kontinuierlicher "run down" der Gap-Junction-Leitfähigkeit zu sehen.

$$\begin{split} R_{pip1}{=}4M\Omega; \ R_{pip2}{=}4M\Omega; \ R_{s1} \ {=}17M\Omega; \ R_{s2}{=}16M\Omega; \ R_{m1}{=}668M\Omega; \ R_{m2}{=}682M\Omega; \\ C_{m1}{=}72pF; \ C_{m2}{=}210pF \end{split}$$

4.2.4 Monensin-Serie

Monensin ist eine Substanz die im Vergleich zu HBDDE und CGP54345 nicht an der Proteinkinase C wirkt. Der Wirkmechanismus des Monensin beruht auf einer Blockierung der Transportvesikel auf ihrem Weg vom Golgi-Apparat zur Zellmembran. Dadurch wird ein Einbau von Proteinen (z.B. Connexinen), die zuvor im Golgi-Apparat synthetisiert wurden, verhindert (siehe Abb.2). Dazu wurde der Pipettenlösung Monensin in der Konzentration 2µM zugesetzt. Die Initialleitfähigkeit (t=0 Min.) fiel im Vergleich zu den anderen Serien geringer aus und betrug 37,1±8,0nS. Der "run down" der Kontrollphase (30.-40. Min.) verlief

in der AAP10-Phase (30.-40. Min.) auf etwa gleich hohen Niveau (Kontrollphase - 487±52pS/min, AAP10 (50nM) -455±105pS/min). Nach Auswaschen des AAP10 konnte ein Rückgang des "run down" beobachtet werden (-93±171pS/min). Es wurde also der in der Kontrollserie gesehene Effekt des AAP10 auch durch Monensin aufgehoben.



Abb. 23: Darstellung der Gap-Junction-Leitfähigkeitsänderung in pS/min der Monensin-Serie (n=3 Versuche) während der einzelnen Meßphasen. Während der Kontrollphase und der AAP10-Phase war der "run down" der Gap-Junction-Leitfähigkeit auf etwa gleich hohem Niveau, und senkte sich während der nachfolgenden Auswaschphase.





$$\begin{split} R_{pip1}{=}5M\Omega; \quad R_{pip2}{=}5M\Omega; \quad R_{s1} =& 21M\Omega; \quad R_{s2}{=}23M\Omega; \quad R_{m1}{=}567M\Omega; \quad R_{m2}{=}803M\Omega; \\ C_{m1}{=}126pF; \quad C_{m2}{=}154pF \end{split}$$

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Tabelle 6 enthält eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Gap-Junction-Leitfähigkeitsänderung aus den verschiedenen Versuchsserien mit den dazugehörenden Meßphasen. Analog dazu veranschaulicht die Abbildung 25 vergleichend die Versuchsergebnisse. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Meßreihe wurden durch einen Stern (*), und signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollserie innerhalb der AAP10-Phase, durch eine Raute (#) gekennzeichnet. Nur in der Kontrollserie konnte während der AAP10-Phase ein signifikanter Anstieg der Leitfähigkeit von +282±193pS/min verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu wurde unter HBDDE (-258±205pS/min), unter CGP54345 (-351±204pS/min) und unter Monensin (-455±105pS/min) eine Abnahme der Leitfähigkeiten beobachtet.

	Kontrollphase	AAP10 (50nM)	Auswaschphase
Kontrollserie	-406 ± 219	+282 ± 193 *	-1177 ± 481
HBDDE (50µM)	-700 ± 171	-258 ± 205 #	-452 ± 76
CGP54345 (10µM)	-587 ± 211	-351 ± 204 #	-602 ± 146
Monensin (2µM)	-487 ± 52	-455 ±105 #	- 94 ± 171 *

Tab. 6: Änderungen der Gap-Junction-Kanal-Leitfähigkeit während der Kontrollphase, AAP10-Phase, und der Auswaschphase in pS/min. Signifikante Änderungen (p≤0,05) der Meßwerte innerhalb der einzelnen Versuchsserien wurden durch einen Stern (*), und signifikante Unterschiede der HBDDE-, CGP54345-, Monensin-Serie gegenüber der Kontrollserie innerhalb der AAP10-Phase, durch eine Raute (#) gekennzeichnet.



Abb. 25: Dargestellt ist die Leitfähigkeitsänderung in pS/min der einzelnen Meßreihen während der einzelnen Meßphasen. Nur in der Kontrollserie konnte nach AAP10-Gabe eine Zunahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit registriert werden. Signifikante Änderungen (p≤0,05) innerhalb einer Meßreihe wurden durch einen Stern (*), und signifikante Unterschiede der HBDDE-, CGP54345-, Monensin-Serie gegenüber der Kontrollserie innerhalb der AAP10-Phase, durch eine Raute (#) gekennzeichnet.

5. Diskussion

Wesentliches Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die signifikante Leitfähigkeitszunahme zwischen den gekoppelten Meerschweinchenkardiomyozyten unter Wirkung des Antiarrhythmischen Peptides (AAP10), die durch den Einsatz der selektiven PKC-Inhibitoren (HBDDE - PKC α , γ und CGP54345 – PKC α) und unter Monensin (Inhibitor des trans-Golgi-Apparates), aufgehoben wurde. Bevor die Ergebnisse im einzelnen diskutiert werden, soll zunächst auf die verwendete Methodik eingegangen werden.

Der Serienwiderstand (R_s) stellt für konventionelle Patch-Clamp-Verstärker ein Problem dar, weil er zu einer Spannungsabweichung an der Zellmembran führt. Dadurch wird die transjunctionale Spannungsdifferenz beeinflußt, welche zu erheblichen Fehlern bei der Gap-Junction-Leitfähigkeitsmessung führen kann (100% Fehler [Weingart 1986], 70% Fehler [Van Rijen et al. 1998]). Um den Fehler zu minimieren, wurden aufwendige mathematische Korrekturformeln entwickelt [Wilders und Jongsma 1992]. Die Genauigkeit der Korrekturformeln hängt von der Genauigkeit der Messung des Serienwiderstandes ab [Van Rijen et al. 1998]. Der Serienwiderstand kann aber nur dann exakt bestimmt werden, wenn dieser sehr viel kleiner ist als der Membranwiderstand. Erschwerend für die exakte Bestimmung des Serienwiderstandes kommt hinzu, daß es während eines Versuches, in Abhängigkeit der Zeit, zu einer Zunahme des Serienwiderstandes kommt (siehe eigene Daten in Kap. 4.1.3 und Müller et al. [1999]). Eine Verbesserung der Serienwiderstandsproblematik konnte erreicht werden durch die Entwicklung einer anderen Verstärkertechnologie, der sogenannten Switch-Clamp-Technik. Dieser diskontinuierliche Verstärkertyp (dSEVC-Verstärker = discontinuous single-electrode-voltage-clamp-amlifier) wechselt mit einer hohen Frequenz zwischen Strominjektion und Spannungsmessung hin und her, so daß während der Spannungsmessung kein Strom über den Serienwiderstand fließt, weshalb nach dem Ohmschen Gesetz der Serienwiderstand eliminiert wird [Polder 1996].

Zellmodellmessungen mit dSEVC-Verstärkern konnten beweisen, daß die Fehler von Gap-Junction-Widerstandsmessungen immer $\leq 5,1\%$ lagen, und im wesentlichen unabhängig vom Serienwiderstand (5-50M Ω), Membranwiderstand (100-1000M Ω), Membrankapazität (50-220pF) und von der junctionalen Leitfähigkeit (1-100nS) waren [Müller et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Genauigkeit der Messungen des junctionalen Widerstandes (R_j) anhand eines Doppellzellmodells überprüft (Kap. 3.2.3). Dabei wurde ein mittlerer Fehler der R_j-Messung von 5,1% (n=7) ermittelt. Vorrausgegangene Messungen zur Bestimmung der Meßungenauigkeit des junctionalen Widerstandes mittels diskontinuierlicher Patch-Clamp-Verstärker ergaben einen Fehler von < 5% [Müller et al. 1999]. Somit liegt der Meßfehler der verwendeten Patch-Clamp-Verstärker in dieser Arbeit nur geringfügig höher als der Meßfehler der Arbeitsgruppe Müller et al. [1999], aber sehr viel günstiger als der Fehler konventioneller Patch-Clamp-Verstärker (100% Fehler [Weingart 1986], 70% Fehler [Van Rijen et al. 1998]), und kann demzufolge als akzeptabel eingeschätzt werden. Weil diskontinuierliche Patch-Clamp-Verstärker die Serienwiderstandsproblematik umgehen, und deshalb einen sehr viel geringeren Fehler als konventionelle Patch-Clamp-Verstärker besitzen, stellen diskontinuierliche Patch-Clamp-Verstärker die Serienwiderstandsproblematik umgehen, und Moment geeignetste System zur Messung von Gap-Junction-Strömen dar.

Alle Gap-Junction-Strommessungen wurden an isolierten Meerschweinchenkardiomyozyten durchgeführt. Diese Spezies wurde im wesentlichen aus zwei Gründen gewählt. Zum einen sind Meerschweinchenkardiomyozyten, elektrophysiologisch gesehen, den Kardiomyozyten des Menschen sehr ähnlich. Zum Beispiel besitzen Rattenkardiomyozyten ein sehr kurzes Aktionspotential und zeigen deshalb elektrophysiologisch mehr Unterschiede zu den Kardiomyozyten des Menschen. Zum anderen gab es Vorbefunde aus Arbeiten von Müller et al. [1997a,b] und Schaefer et al. [1999], die ebenfalls Meerschweinchenkardiomyozyten zur Messung der Gap-Junction-Leitfähigkeit unter AAP10 verwendeten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschienen Herzmuskelzellen vom Meerschweinchen als das geeignetste Modell zur Gap-Junction-Strommessung.

Das Isolierungsprotokoll mit dem die Herzmuskelzellen aus ihrem Verband gelöst werden, hat entscheidenden Einfluß auf die Gesamtleitfähigkeit des Zellpaares [Sugiura et al. 1990]. Frühere Untersuchungen der Leitfähigkeit an gekoppelten Meerschweinchenkardiomyozyten hatten sehr unterschiedliche Initialleitfähigkeiten ergeben:

Experimentator und Jahr	Leitionen der Pipettenlsg.	Initialleitfähigkeit in nS
[Kameyama 1983]	Cs-Aspartat	476 - 714
[Weingart 1986]	Cs ⁺ /Cl ⁻	204
[Noma und Tsuboi 1987]	Cs-Aspartat	90 - 3900
[Müller et al. 1997a,b]	Cs ⁺ /Cl ⁻	160 ± 25
[Daleau 1998]	K ⁺ /Cl ⁻	71
[Schaefer et al. 1999]	Cs ⁺ /Cl ⁻	35 ± 5
eigene Arbeit	Cs ⁺ /Cl ⁻	56 ± 14

Tab. 7: Initialleitfähigkeiten an gekoppelten Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren.

In dieser Arbeit wurde in der Kontrollgruppe eine Initialleitfähigkeit von 56 \pm 14nS mit Cs⁺/Cl⁻ als Leitionen gefunden. Für die sehr unterschiedlichen Initialleitfähigkeiten zwischen den einzelnen Experimentatoren sind zwei Ursachen vorstellbar. Einerseits kann eine unterschiedliche Zusammensetzung der Pipettenlösung zu Unterschieden der Ionen- und Stoffkonzentrationen des Cytosols führen (wegen der Whole-Cell-Konfiguration, Kap 3.2.6) und somit Differenzen der Leitfähigkeit verursachen (Na⁺, Ca²⁺, H⁺, Mg²⁺, ATP [Dhein, 1998c]). Andererseits können dafür Unterschiede des Isolierungsprotokolls verantwortlich sein, da Grad der Dissoziation (Größe der Kontaktfläche des Zellpaares) und Lage der Zellen eines Zellpaares zueinander (an den Glanzstreifen (Zellpole) mehr Gap-Junction-Kanäle als an der lateralen Membran), sehr unterschiedlich ausfallen können. Daleau [1998] beobachte hauptsächlich lateral gekoppelte Zellen. Daraus könnte eine niedrigere Leitfähigkeit resultieren als im Vergleich zu longitudinal gekoppelten Zellen. Das Isolierungsprotokoll dieser Arbeit wurde erstmalig beschrieben von Powell et al. [1980] und modifiziert von Metzger und Weingart [1985]. Es lieferte ebenfalls hauptsächlich lateral gekoppelte Zellen. Wichtiges Merkmal dieses Protokolls war, daß anstatt Trypsin (eine Protease), Kollagenase benutzt wurde, da Trypsin die Separation der Zellen begünstigt und extrazelluläre Domains der Kanäle zerstört [Dhein 1998c].

Die verwendeten Substanzen wurden in Abhängigkeit ihres Wirkortes auf zwei unterschiedlichen Wegen gegeben. Zum einen wurden über Einwaschen der Substanzen in die Badlösung eine extrazelluläre Wirkung erzielt. Zum anderen wurden in der Whole-Cell-Konfiguration, durch Diffusionsausgleich zwischen Pipette und Cytosol, Wirkstoffe intrazellulär verabreicht. Der Verdünnungseffekt des Cytosols auf die Wirkstoffkonzentration der Pipettenlösung war, nach Numberger und Draguhn [1996], vernachlässigbar gering, da die Pipettenlösung ein sehr viel größeres Volumen aufweist als das Volumen des Cytosols.

Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, daß AAP10 über einen G-Proteingekoppelten Rezeptor an der Außenseite der Zellmembran wirkt [Schaefer, 2000]. Es konnte ein ca. 200kDa schweres Membranprotein, mittels Affinitätschromatographie und SDS-Page, als möglicher Teil eines Membranrezeptors detektiert werden [Dhein et al. 1999b]. Später wurde diese These mittels einer Radioligandenbindungsstudie bestätigt, indem eine Bindung von radioaktiven ¹⁴C-AAP10 an den Membranrezeptor nachgewiesen wurde [Dhein et al. 2001a, c]. Aus diesem Grund wurde AAP10 in die Badlösung eingewaschen, und konnte so extrazellulär am Membranrezeptor wirken. Die PKC-Inhibitoren (HBDDE, CGP54345) und Monensin wurden der Pipettenlösung zugegeben, da ihre Wirkziele intrazellulär liegen:

Substanz	Wirkort	Quelle
HBDDE	katalytische oder regulatorische Untereinheit	[Kashiwada et al. 1994]
	der PKC α und PKC γ	
CGP54345	katalytische Untereinheit der PKC α	[Zimmermann et al. 1994]
		[Hofmann 1997]
Monensin	trans-Golgi-Apparat	[Puranam et al. 1993]

Tab. 8: Wirkorte der verwendeten Substanzen HBDDE, CGP54345, und Monensin

Im Folgenden soll nun der Begriff des Rundown näher erläutert werden. Unter dem Begriff des Rundown versteht man eine, unter Whole-Cell-Bedingungen auftretende, reversible Leitfähigkeitsabnahme an den Gap-Junctions mit der Zeit, hauptsächlich verursacht durch einen Mangel an ATP. Die physiologische intrazelluläre ATP-Konzentration beträgt 3,0-7,5mM [Allen et al. 1985]. Dementsprechend wurde der Pipettenlösung ATP substituiert (2mM Na₂ATP, 3mM MgATP). Möglicherweise sinkt durch Auswasch- Verdünnungs- und Verbrauchseffekte [Weingart und Maurer 1988] und durch Verringerung der Leistung der Atmungskette [Vera et al. 1996], die zytosolische ATP-Konzentration mit der Zeit. Durch Anwendung einer Pipettenperfusionstechnik, die eine konstante ATP-Konzentration und einen schnellen Austausch verschiedener Pipettenlösungen mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen ermöglichte, konnte eine Abhängigkeit des Rundown von der ATP-Konzentration der Pipettenlösung dargestellt werden. Dabei konnte kein Rundown in Gegenwart von ATP (5mM) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte ein starker Rundown verzeichnet werden, wenn die Pipettenlösung kein ATP enthielt. Dieser Effekt konnte durch Reperfusion einer ATP-haltigen Pipettenlösung teilweise antagonisiert werden [Verrecchia et al. 1999]. ATP-Mangel führt zu verschiedenen physiologischen Mechanismen, die letztendlich die Gap-Junction-Leitfähigkeit senken. Verrecchia et al. [1999] kamen zu dem Ergebnis, daß ein Mangel an ATP die Aktivität der Proteinphosphatasen steigert, bei gleichzeitiger Abnahme der Proteinkinaseaktivität, woraus eine Verminderung der Phosphorylierung von Phosphoproteinen (z.B. Connexin43) resultiert. Damit wiedersprachen sie der Auffassung von Sugiura et al. [1990], der einen direkten Effekt des ATP an einem Ligand-Rezeptor des Gap-Junction-Kanal-Protein postulierte. Ein anderer wichtiger Aspekt ist, daß ein intrazellulärer ATP-Mangel zu einer Inaktivierung der ATP-abhängigen Na⁺-K⁺-ATPase und Ca²⁺-ATPase führt. Folglich steigt die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und führt ebenfalls zu einer Entkopplung der Zellen [Noma und Tsuboi 1987]. Andererseits konnte gezeigt werden, daß eine reversible Entkopplung an Meerschweinchenkardiomyozyten durch lipophile Substanzen (Derivate der Sexualsteroidhormone), ohne Beeinflussung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels, möglich ist [Verrecchia und Herve 1997]. In der Literatur fanden sich unterschiedliche Werte für den Rundown an Meerschweinchenkardiomyozyten bei identischen ATP-Konzentrationen der Pipettenlösung (5mM) ohne Pipettenperfusionstechnik: (-343 \pm 208pS/min [Schaefer et al. 1999]; -2500 \pm 2000pS/min [Müller et al. 1997a,b]). In der vorliegenden Arbeit lag der Rundown der Kontrollserie bei –406 \pm 219pS/min.

In diesem Abschnitt soll die Frage diskutiert werden, welchen Effekt AAP10 auf den Rundown in Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen hat. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, daß AAP10 den Rundown der Gap-Junction-Leitfähigkeit umkehren konnte, und zu einer Zunahme der Leitfähigkeit führte ([Müller et al. 1997a,b]: Kontrollphase = $-2,5 \pm 2,0$ min versus AAP10-Phase = $+1,0 \pm 0,7$ nS/min und [Schaefer et al. 1999]: Kontrollphase = -160 ± 30 pS/min versus AAP10-Phase = $+290 \pm 220$ pS/min). In der Kontrollphase dieser Arbeit konnte ebenfalls der AAP10-Effekt nachgewiesen werden. Nach Messung des Rundown (-406 ± 219ps/min) konnte durch extrazelluläre Gabe von AAP10 (50nM) der Rundown umgekehrt werden, und führte zu einer signifikanten Zunahme der Leitfähigkeit (+282 ± 193pS/min). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der AAP10-Effekt innerhalb der Auswaschphase (10min) reversibel war, und zu einem signifikanten Fortschreiten des Rundown führte (-1177 \pm 481pS/min).

Vorangegangene Versuche haben deutlich gemacht, daß der AAP10-Effekt auf einer vermehrten Phosphorylierung des Connexin 43 via G-Protein gekoppelten Membranrezeptor und PKC-Aktivierung beruht [Dhein et al. 1999b, 2001a,b]. Dafür besitzt Cx43 am C-Terminus zwei intrazellulär gelegene Phosphorylierungsziele, die Serinreste Ser368 und Ser372 [Saez et al. 1997]. Die Phosphorylierung ändert die Konformation des Cx43 und vermittelt somit verschiedene Effekte am Gap-Junction-Kanal. Bei Stimulation aller PKC-Isoformen mit Phorbolestern beobachteten Kwak und Jongsma [1992, 1996] eine verminderte Einzelkanalleitfähigkeit (Verschiebung von 41pS- zu vermehrt 20pS-events) und einen verminderten "dye transfer" des Farbstoffs 6-Carboxyfluorescein an Rattenherzmuskelzellen. Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu stehen mit einer erhöhten Gesamtleitfähigkeit bei vermehrter Cx43-Phosphorylierung [Spray und Burt 1990]. Die Leitfähigkeit eines Kanals wird aber nicht nur durch die Einzelkanalleitfähigkeit bestimmt, sondern auch durch die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals [Dhein 1998c]. Kwak et al. [1995c] konnten eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit nach verstärkter Cx43-Phosphorylierung beobachten, die somit bei gleichzeitig verminderter Einzelkanalleitfähigkeit zu einer effektiv erhöhten Gesamtleitfähigkeit führte. Aus der Beobachtung des verminderten "dye transfers" versus erhöhte Gesamtleitfähigkeit, schlußfolgerten Kwak et al. [1995c], daß Herzmuskelzellen unter unspezifischer PKC-Stimulation selektiv die elektrische und metabolische Kopplung regulieren können.

Aus vorhergehenden Untersuchungen war bekannt, daß AAP10 über die Proteinkinase C (PKC) wirkt [Dhein et al. 1997,1999b, Schaefer 2000]. Aufgrund der Hemmbarkeit des AAP10-Effektes durch Bisindolylmaleimid I (blockiert die PKC α , β I, β II, γ , δ , ε [Toullec et al. 1991]) läßt sich weiterhin eine Abhängigkeit von einer oder mehrerer der klassischen PKC-Isoformen annehmen [Schaefer et al. 1999]. Außerdem konnte die PKCγ direkt neben den Glanzstreifen lokalisiert werden [Rouet-Benzineb et al. 1996], so daß eine enge räumliche Beziehung zwischen dem Cx43 und der PKCy nachgewiesen werden konnte. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß die PKCy eine Rolle bei der Vermittlung des AAP10-Effektes spielen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit HBDDE (50µM) und CGP54345 (10µM) eingesetzt. Diese beiden Stoffe wurden gewählt, da sie sehr spezifisch einzelne Isoformen der PKC hemmen können (HBDDE: PKCα IC₅₀=43μM, PKCγ IC₅₀=50µM, andere PKC-Isoformen IC₅₀>218µM [Kashiwada et al. 1994] und CGP54345: PKCα IC₅₀=5,8µM, andere PKC-Isoformen IC₅₀>100µM [Zimmermann et al. 1994]). Würde der AAP10-Effekt allein über die PKCy moduliert werden, so müßte HBDDE, in der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 50µM, den AAP10-Effekt wirkungsvoll unterdrücken, CGP54345 (10µM) dagegen kein Effekt zeigen. Aus den Ergebnissen (Tab. 6 und Abb. 25) wurde deutlich, daß HBDDE sowie CGP54345 den AAP10-Effekt signifikant hemmen konnten, so daß keine Zunahme der Leitfähigkeit während der AAP10-Phase registriert werden konnte (AAP10-Phase: Kontrollserie = +282 ± 193pS/min, HBDDE-Serie = -258 ± 205pS/min; CGP54345-Serie = -351 \pm 204pS/min). Dies läßt den Schluß zu, daß der AAP10-Effekt im wesentlichen über die PKCa transduziert wird.

Tendenziell fällt bei der HBDDE- und bei der CGP54345-Serie auf, daß die AAP10-Phase, im Vergleich zur Kontrollphase und der Auswaschphase, die Meßphase mit dem geringsten Rundown war (Abb. 19 und Abb. 21), und demzufolge eine gewisse nicht signifikante Restaktivität des AAP10 vermuten läßt. Eine Ursache könnte sein, daß die PKCα nicht vollständig gehemmt wurde, da die Wirkkonzentrationen für HBDDE nur geringfügig, und für CGP54345 um den Faktor 2, über der jeweiligen IC₅₀ lagen (siehe vorhergehenden Abschnitt). Außerdem kann vermutet werden, daß noch andere PKC-Isoformen, welche durch HBDDE und CGP54345 nicht gehemmt wurden, eine Rolle bei der Signaltransduktion des AAP10 spielen könnten, und eine Restaktivität verursachten. Dagegen spricht aber, daß Dhein et al. [2001] eine Aktivierung der PKC unter AAP10 (50nM) mittels ELISA zeigen konnten, die vollständig durch CGP54345 supprimiert wurde. Ebenfalls ist denkbar, daß AAP10 zu einer vermehrten Phosphorylierung des Cx43 im Golgi-Apparat führen könnte, und somit zusätzlich Gap-Junction-Kanäle in die Membran eingebaut wurden, womit sich eine Restaktivität des AAP10 erklären ließe.

Die Phosphorylierung der Vorstufen des Connexin 43 führt zu einem vermehrten Einbau, bei gleichzeitig verminderten Abbau von Gap-Junction-Kanälen [Laird et al. 1995]. Daraus folgt eine zahlenmäßige Zunahme der Gap-Junction-Kanäle, und folglich eine verbesserte Kopplung der Zellen. Für AAP10 konnte eine vermehrte Phosphorylierung an den Gap Junctions nachgewiesen werden [Dhein et al. 1999b], die kurzfristig innerhalb von 10 Minuten zu einer Zunahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit führte (siehe Abb. 17 und 18, sowie [Müller et al. 1997b]. Ebenso konnte eine längerfristige Zunahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit, über den gesamten Zeitraum von 30 Minuten, unter AAP10 nachgewiesen werden [Schaefer et al. 1999]. Dafür sind zwei verschiedene Ursachen denkbar. Zum einen könnte die längerfristige Wirkung durch eine zunehmende Phosphorylierung der Gap Junctions zustande gekommen sein. Dem wiederspricht die Überlegung: Wenn alle Gap-Junction-Kanäle phosphoryliert sind, so müßte mit der Zeit ein Stagnieren der Leitfähigkeitszunahme zu beobachten sein. Wahrscheinlicher ist demzufolge ein AAP10induzierter, zusätzlicher Einbau von Kanälen in die Membran, durch Phosphorylierung der Connexine im Golgi-Apparat, da durch diesen Mechanismus die Gesamtkapazität der phosphorylierungsfähigen Kanäle in der Membran erhöht wird. Erste biochemische Erkenntnisse über einen solchen Mechanismus liegen bereits vor [Dhein und Polontchouk 2001, unveröffentlichte Beobachtung, persönliche Mitteilung]. Um weitere Erkenntnisse über diesen Mechanismus zu erhalten, wurde Monensin (2µM) der Pipettenlösung zugegeben. Monensin inhibiert den Connexin-Transfer vom Golgi-Apparat zur Membran [Puranam et al. 1993]. Wenn Monensin keine Wirkung auf die AAP10-induzierte Zunahme der Leitfähigkeit haben würde, so würde das einen Hinweis darauf geben, daß AAP10 nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung der Connexine im Golgi-Apparat führt. Die Ergebnisse der Monensin-Serie zeigten aber keinen AAP10 Effekt, also inhibierte Monensin die AAP10bedingte Zunahme der Leitfähigkeit (Abb. 23). Der Rundown der Kontrollphase (-487 ± 52pS/min) veränderte sich nur unbedeutend in der anschließenden AAP10-Phase (-455 \pm 105pS/min), war aber signifikant erniedrigt gegenüber der AAP10-Phase der Kontrollserie (+282 ± 193pS/min). Des weiteren war in der Monensin-Serie eine geringere Initialleitfähigkeit (37,1 ± 8,0nS) im Vergleich zu den anderen Meßserien auffällig. (Kontrollserie: 56,5 ± 14,1nS, HBDDE-Serie: 53,2 ± 6,4nS, CGP54345-Serie: 54,7 ± 10,2nS). Dieser Effekt könnte auf einen geringeren Einbau von Connexinen hinweisen, aber auch durch einen zusätzlichen Einbau von Na⁺-Kanälen in die Membran mitbeeinflußt sein, da Monensin außerdem als Na⁺-Ionophor wirkt [Inabayashi et al. 1995, Hoya und Venosa 1992).

Wahrscheinlich sind die Ergebnisse der Monensin-Serie auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen. Durch die Wirkung des Monensins als Na⁺-Ionophor kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Na⁺-Konzentration, die einen komplexen Kompensationsmechanismus der Herzmuskelzelle nach sich zieht. Durch den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher kommt es sekundär zu einer regulatorisch erhöhten Ca²⁺-Konzentration, die wiederum zu einer erhöhten H⁺-Konzentration führt (Ca²⁺-ATPase). Eine Erhöhung der Ionenkonzentrationen von Na⁺, Ca²⁺ oder H⁺ führt zum Schließen der Gap Junctions und folglich zu einer verminderten Leitfähigkeit [Dhein 1998c]. Das könnte eine verminderte Initial- und Gesamtleitfähigkeit erklären, aber nicht den fehlenden AAP10 Effekt, da gerade die Wirkung des AAP10 im ischämischen Milieu (erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Na⁺, Ca²⁺, und H⁺) besonders effektiv ist [Dhein et al. 1996]. Der fehlende AAP10-Effekt könnte durch einen funktionellen Antagonismus zwischen monensin-bedingter trans-Golgi-Blockade mit Abnahme der Anzahl der Gap Junctions, und dem leitfähigkeitssteigernden AAP10-Effekt zustande gekommen sein.

Im weiteren Verlauf der Diskussion soll die Entdeckung und Entwicklung antiarrhythmischer Peptide dargestellt werden, und dabei die Ergebnisse im Zusammenhang betrachtet werden. 1980 isolierten Aonuma et al. [1980a] ein atriales bovines Hexapeptid, das die Rythmizität in embryonalen Zellklastern verbesserte. Somit konnte dem Peptid eine antiarrhythmische Wirkung nachgewiesen werden, weshalb es als (natürliches) antiarrhythmisches Peptid (AAPnat) bezeichnet wurde [Aonuma et al. 1980a,b]. Untersuchungen zur Wirkung des AAPnat auf Herzmuskelflimmern neonataler Rattenherzen zeigten, daß AAPnat die rhythmische Herzerregung wiederherstellen konnte. Außerdem konnte die Aminosäuresequenz von AAPnat ermittelt werden (H₂N-Gly-Pro-4Hyp-Gly-Ala-Gly-COOH) [Aonuma et al. 1982]. Weitergehende Untersuchungen konnten den protektiven Schutz des AAPnat auf medikamenteninduzierte Herzrhythmusstörungen nachweisen [Aonuma et al. 1983, Kohama et al. 1987]. In einer weiteren Studie von Kohama et al. [1985] konnten die spezifischen Gewebekonzentrationen gemessen werden (Herzmuskelgewebe 203pmol/g), die sich bei Herzmuskelflimmern erhöhten [Kohama et al. 1986].

Bis zu diesem Zeitpunkt gab es keine Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus, so daß nachfolgende Untersuchungen hautsächlich dieser Fragestellung nachgingen. Die Arbeitsgruppe Argentieri et al. [1989] vermuteten erstmals, daß der AAPnat-Effekt mehr

Resultat passiver Membraneigenschaften als aktiver lonenströme war, da sie keine Veränderungen der Depolarisationsgeschwindigkeit, der Aktionspotentialamplitude, der Aktionspotentialdauer und der Aktionspotentialform fanden. Neue Erkenntnisse konnten durch die Untersuchungen an einem neu synthetisierten, effektiver wirkenden Derivat des Antiarrhythmischen Peptids (das AAP10, Aminosäuresequenz: H₂N-Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-CONH₂) gefunden werden [Dhein et al. 1994, Dhein und Tudyka 1995a]. Durch eine Mappingstudie konnte dem AAP10 eine Reduktion der Dispersion und der Aktionspotentialdauer nachgewiesen werden, so daß lokale Differenzen geglättet wurden. Die mittlere Aktionspotentialdauer blieb dabei unbeeinflußt. Es wurden keine Veränderungen weiterer kardialer Parameter, wie linker Ventrikeldruck, Koronardurchblutung, QRS-Zeit und PQ-Zeit, gefunden. In einem weiteren Versuch wurde nach Vorbehandlung des Herzens mit AAP10 und anschließender Koronarokklusion des LAD-Stammes eine signifikante Reduktion der Ischämie-induzierten Veränderung des Aktionspotentialmusters beobachtet, so daß die Wahrscheinlichkeit eines Herzmuskelflimmerns (besonders Typ Ib, d.h. ca. 20 – 40 Minuten nach Ischämiebeginn) reduziert wurde [Dhein et al. 1994, 1995b, 1996]. Außerdem untersuchten Dhein et al. [1994] die Wirkung des AAP10 auf das Aktionspotential. Sie fanden keine Veränderung der Aktionspotentialdauer, der Aktionspotentialform, der Aktionspotentialamplitude, maximalen Aufstrichgeschwindigkeit der und des Ruhemembranpotentials, aber eine erhöhte Leitungsgeschwindigkeit. Wegen der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit konnte eine unveränderten Beteiligung von Natriumkanälen ausgeschlossen werden. Die erhöhte Leitungsgeschwindigkeit brachte jedoch erste Hinweise auf eine Wirkung des AAP10 an den Gap-Junction-Kanälen. Um diesen Ansatz zu prüfen, folgten Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen an isolierten adulten Meerschweinchenkardiomyozyten. Dabei fanden Müller et al. [1997a,b] in der Kontrollphase einen Rundown der Gap-Junction-Leitfähigkeit (-2,5 ± 2,0nS/min), der nach extrazellulärer AAP10-Gabe (50nM) aufgehoben werden konnte, und zu einer Zunahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit führte (+1,0 ± 0,7nS/min). Das Ergebnis wurde durch Schaefer et al. [1999] (Kontrollphase = -160 \pm 30pS/min, AAP10-Phase = +290 \pm 220pS/min), und durch die Ergebnisse dieser Arbeit (Kontrollphase = -406 \pm 219pS/min, AAP10-Phase = +282 \pm 193pS/min) bestätigt. Daraus konnte geschlußfolgert werden, daß AAP10 die zelluläre Kopplung an Gap-Junctions verbessert [Dhein et al. 1994, 1995b, 1996, 1998a, 1999b, 2001a,b, Müller et al. 1997a,b, Schaefer et al. 1999].

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen stand die Frage im Mittelpunkt, über welchen Mechanismus der AAP10-Effekt an den Gap-Junctions vermittelt wird. Um eine AAP10 abhängige Phosphorylierung der Gap-Junction-Kanäle zu prüfen, wurden Cx43 transfizierte

Hela-Zellen mit ³²P-orthophosphate, und anschließend mit AAP10 inkubiert. Danach wurde Cx43 wieder isoliert und autoradiographisch konnte eine vermehrte Phosphorylierung des Cx43 festgestellt werden [Dhein et al. 1999b]. Vorausgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe Kwak et al. [1995a,b,c, 1996] hatten gezeigt, daß die Proteinkinase C an der Phosphorylierung der Gap-Junction-Kanäle beteiligt ist. Das würde bedeuten, daß der AAP10-Effekt der Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen (Erhöhung der Gap-Junction-Leitfähigkeit) und der ³²P-orthophosphate-Studie (vermehrte Phosphorylierung des Kanals) durch einen Inhibitor der Proteinkinase C gehemmt werden müßte. Tatsächlich entsprachen die Ergebnisse der ³²P-orthophosphate-Inkubationsstudie und die Ergebnisse der Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I, hemmt die PKC-Isoformen PKC α , β I, β II, γ , δ , ϵ [Toullec et al. 1991]) den Befunden von Kwak et al. Die ³²P-orthophosphate-Inkubationsstudie zeigte unter BIM I eine deutlich verminderte Phosphorylierung des Cx43 (ratio phosphoryliert : unphosphoryliert 1,41:1) gegenüber der Kontrollserie mit AAP10 (ratio 4,65:1) [Dhein et al. 1999b]. Bei den Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen inhibierte BIM I signifikant die AAP10 induzierte Leitfähigkeitszunahme, so daß eine sinkende Leitfähigkeit resultierte (-130 \pm 50pS/min) [Schaefer et al. 1999, Schaefer 2000]. Dadurch konnte eine Beteiligung der PKC an der Signaltransduktion des AAP10 nachgewiesen werden. Ungeklärt blieb, welche Isoformen der PKC eine Rolle spielten.

Die PKC stellt in der Zelle eine wichtige Komponente der Signalübermittlung dar, um auf externe Signale (hormonelle und neuronale Stimuli) zu reagieren [Nishizuka 1988]. Das geschieht durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten von Zielproteinen, die dadurch verschiedene Funktionen ausführen können. Die PKC-Isoformen werden anhand von Unterschieden in ihrer Struktur, und der benötigten Substrate in drei Gruppen eingeteilt [Nishizuka 1988, Asaoke et al. 1992, Hofmann 1997, Jalili et al. 1999, Way et al. 2000]:

Gruppen	Isoformen	Abhängigkeiten der Aktivierung
conventional PKC (cPKC)	$\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$	-Ca²+-Abhängig
		aktiviert durch PS und DAG
novel PKC (nPKC)	δ,ε,η,θ,μ	Ca ²⁺ -Unabhängig
		reguliert durch PS und DAG
atypical PKC (aPKC)	λ,τ,ζ	Ca ²⁺ -Unabhängig
		benötigt kein DAG, aber reguliert durch PS

Tab. 9: Darstellung der Einteilung der PKC-Isoformen und deren Aktivierungsabhängigkeiten. (PS = Phosphatidylserin, DAG = Diazylglyzerin)

Die Aktivierung der PKC-Isoformen erfolgt über die Phosphoinositolkaskade. Durch die Bindung eines Hormons an einem G-Protein gekoppelten Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Daraufhin wird ein G-Protein aktiviert, welches seinerseits die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die aktivierte PLC hydrolysiert Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) zu Diazylglyzerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). Die Freisetzung von IP₃ und deren Bindung an den IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen oder sarkoplasmatischen Retikulums setzt Ca²⁺ aus den Speichern in das Cytosol frei. Eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺- Konzentration führt zur Translokation der zytosolischen inaktiven PKC zur Plasmamembran, wo sie durch DAG aktiviert wird. Die aktivierte PKC phosphoryliert dann die entsprechenden Zielproteine (siehe Abb. 26).

Alle PKC-Isoformen bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, mit einer aminoterminalen regulatorischen Region, und einer carboxyterminalen katalytischen Region [Stergiopoulos et al. 1999]. Bei der Gruppe der cPKC besteht die regulatorische Region aus den Domänen C₁ (Bindungsstelle für Phorbolester und DAG) mit zwei cysteinreichen Zinkfingern, und C₂ (Bindungsstelle für Ca²⁺ und Phospholipidsäuren). Die katalytische Region enthält die Domänen C₃ (Bindungsstelle für ATP) und C₄ (Bindungsstelle für das Substrat, welches von der PKC phosphoryliert wird). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Gruppen der nPKC und der aPKC durch ein Vorhandensein einer C2-like-Domäne anstelle einer C2-Region. Diese Domäne bindet kein Ca2+, könnte aber Funktionen bei der Translokation der PKC, oder bei Proteininteraktionen besitzen [Way et al. 2000]. Außerdem besitzt die Gruppe der aPKC nur einen cysteinreichen Zinkfinger.

Die PKC-lsoformen sind in vielen Geweben vorhanden. Einige PKC-lsoformen sind jedoch relativ spezifisch für eine Gewebeart (z.B. PKCy - Zentralnervensystem, PKCe -Skelettmuskulatur, PKCβ - Inselzellen des Pankreas, Monozyten, Retina, Zentralnervensystem). Im Myokard konnten bisher 7 Isoenzyme nachgewiesen werden (PKC $\alpha,\beta_1,\beta_2,\epsilon,\zeta$) [Mochly-Rosen et al. 1990, Inoguchi et al. 1992], PKCS [Rybin und Steinberg 1994] und die PKCy [Rouet-Benzineb et al. 1996]. Die inaktiven Formen liegen im Cytosol und wandern erst nach Aktivierung (Ca²⁺-Bindung) zur Membran (Translokation). Dabei beobachteten Rouet-Benzineb et al. [1996], daß die PKCy vermehrt an den Glanzstreifen lokalisiert war, und somit eine räumliche Nähe zwischen der PKCy und dem Cx43 bestand, weswegen eine Beteiligung der PKCy an der AAP10-Modulation vermutet wurde. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde innerhalb dieser Arbeit HBDDE (Inhibitor der PKC α,γ [Kashiwada et al. 1994]) und CGP54345 (Inhibitor der PKCα [Zimmermann et al. 1994]) in Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen eingesetzt. Unter beiden PKC-Inhibitoren ließ sich der AAP10-Effekt vollständig hemmen (siehe Tab. 6 und Abb. 25). Weil CGP54345 (blockiert die PKCα IC₅₀=5,8μM) erst in Konzentrationen >100µM andere Isoformen inhibiert, und in dieser Studie CGP54345 in einer Konzentration von 10 µM verwendet wurde, sprechen die Befunde dafür, daß die PKC α and er Signaltransduktion des AAP10 beteiligt ist. Eine Beteiligung der PKC γ , wie sie nach der Beobachtung der PKCy an den Glanzstreifen [Rouet-Benzineb et al. 1996] vermutet wurde, kann durch diese Ergebnisse weder bestätigt noch vollständig ausgeschlossen werden. Ebenfalls bleibt offen, ob noch weitere kardiale PKC-lsoformen ($\beta_1,\beta_2,\epsilon,\delta,\zeta$) eine Rolle bei der AAP10-Wirkung spielen könnten. Für die PKCE zum Beispiel konnten Doble et al. [2000] eine phosphorylierende Funktion am Connexin 43 nachweisen. Diese führt aber im Gegensatz zur AAP10-Wirkung zur Blockade von Gap Junctions. Somit sprechen die derzeitigen Befunde für eine Wirkung des AAP10 über die PKCa.

Es wurde bereits dargestellt, daß AAP10 nicht direkt am Gap-Junction-Kanal, sondern über die PKC zu einer Zunahme der Phosphorylierung des Cx43, und somit zu einer Zunahme der Leitfähigkeit, führt. Somit stellte sich die Frage, wie ein extrazelluläres Peptid die intrazellulär gelegene PKC aktivieren könnte. In der Regel wird die Proteinkinase C durch das Phosphoinositolsystem (Diazylglyzerin – Phosphatidylinositolbiphosphat – Phospholipase C – G-Protein gekoppelter Membranrezeptor) aktiviert [Schmidt und Thews 1997]. Das setzt einen membranständigen Rezeptor voraus, der seine Konformation bei "Andocken" des AAP10 ändert, um die Signalkaskade über das Phosphoinositolsystem in Gang zu setzen. Dhein et al. [1999b, 2001a] konnten ein ca. 200kDa schweres Membranprotein als Teil eines möglichen Rezeptor für AAP10 nachweisen, und fanden somit

den extrazellulären Wirkort der antiarrhythmischen Peptide. Radioligandenbindungsstudien mit ¹⁴C-AAP10 zeigten ebenfalls eine Bindung des AAP10 an ein Membranprotein (k_D \approx 1,0nM) [Dhein et al. 2001a]. Ebenso zeigte sich eine Blockierbarkeit mit GDP β S (Schaefer 2000, Dhein et al. 2001c), so daß angenommen wurde, daß der AAP10-Rezeptor zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört.

Somit ist der molekulare Wirkmechanismus zu weiten Teilen geklärt. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Isoformspezifität der AAP10-Signaltransduktion eindeutig zu klären. Dazu werden noch weitere isoformspezifische PKC-Inhibitoren benötigt, die auch speziell in Patch-Clamp-Untersuchungen verwendet werden können. Des weiteren werden noch weitere Befunde benötigt um eindeutig aussagen zu können ob AAP10 durch eine vermehrte Phosphorylierung des Cx43 im Golgi-Apparat zu einem weiteren Einbau von Kanälen in die Membran führen kann, und somit längerfristig auf einen zweiten Weg die Leitfähigkeit erhöht. Das Ziel der Forschung mit antiarrhythmischen Peptiden ist die vollständige Aufklärung des Wirkmechanismus, von der Bindung des AAP10 an den Rezeptor, bis zur Wirkung am Gap-Junction-Kanal.

Abschließend soll versucht werden, eine mögliche medizinische Bedeutung der Antiarrhythmischen Peptide für neue therapeutische Ansätze zu skizzieren. Gap Junctions sind für die direkte Kommunikation der Zellen untereinander verantwortlich, so daß gekoppelte Zellen ein funktionelles Synzytium bilden. Veränderungen der Kopplung der Zellen spielen eine große Rolle bei Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Chagas-Krankheit), des Nervensystems (Morbus Parkinson), bei der Onkogenese, bei Entzündungsreaktionen und bei genetischen Erkrankungen (Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMTX)) [Dhein 1998b]. Eindeutige therapeutische Einsatzgebiete des Antiarrhythmischen Peptides können zur Zeit noch nicht angegeben werden, aber die bisherigen Befunde lassen erkennen, daß diese Substanz im allgemeinen bei regulatorisch verminderter Kopplung der Zellen eingesetzt werden könnte.

Herzrhythmusstörungen können ihre Ursache in einer veränderten Reizgeneration oder in einer veränderten Fortleitung des Aktionspotentials haben. Im Fall einer veränderten Reizgeneration wäre der pharmakologische Nutzen des AAP fragwürdig, da Störungen der Reizgeneration durch eine Veränderung des Aktionspotentials, des Ruhemembranpotentials, oder durch eine veränderte Anstiegssteilheit der diastolischen Depolarisation verursacht werden [Lüderitz 1998], und dadurch ionenkanalabhängig ist. Veränderungen der Fortleitung des Aktionspotentials beruhen auf einer verminderten zellulären Kopplung, mit abnehmender Kopplungsgeschwindigkeit und zunehmender Dispersion. Das Auftreten von Reentry-Arrhythmien wird begünstigt. In der akuten Phase des Herzinfarktes (15 bis 20 Minuten nach Beginn der Ischämie) kommt es zum Schließen der Gap-Junction-Kanäle des ischämischen Herzmuskelbereiches. Das hat im wesentlichen zwei pathophysiologische Auswirkungen. Einerseits wird umliegendes, nicht ischämisches Gewebe durch Abschottung geschützt. Andererseits führt ein entkoppeltes, übersäuertes Infarktareal zu Veränderungen der Erregungsausbreitung, und somit steigt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Arrhythmien [Dhein et al. 1999a, Dhein und Hammerath 2000]. Prophylaktischer Einsatz des Antiarrhythmischen Peptides bei Ischämie-induzierten Kammerflimmern [Dhein et al. 1994, 1996] und bei Strophantin-induzierten Arrhythmien [Aonuma et al. 1980b] (auf Entkopplung basierende Arrhythmien [De Mello, 1976]), zeigten experimentell einen rhythmisierenden Effekt. Dadurch ist vorstellbar, daß die Wirkung Antiarrhythmischer Peptide einen neuen prophylaktischen Ansatz der entkopplungsbedingten Arrhythmien darstellen. Noch ist ungeklärt, ob antiarrhythmische Peptide einen Vorteil gegenüber klassischen Antiarrhythmika bei der Behandlung manifester Arrhythmien (wie z.B. Vorhofflimmern) besitzen, da in diesem Fall schon eine Umverteilung der Connexine, entsprechend der Erregungsrichtung, stattgefunden hat [Polontchouk et al. 2001]. Ebenfalls fragwürdig ist, ob antiarrhythmische Peptide bei strukturellen Veränderungen des Myokards (z.B. Myokardfibrose) einen positiven Effekt auf die Erregungsausbreitung am Herz erzielen können, da einerseits antiarrhythmische Peptide eine Leitfähigkeitssteigerung nur an funktionierenden, morphologisch intakten Gap-Junction-Kanälen erzielen. Andererseits wäre aber bei geringgradigen morphologischen Veränderungen ein positiver Effekt durch einen zusätzlichen Einbau von Kanälen in die Membran, durch eine AAP-induzierte Phosphorylierung der Connexine im Golgi-Apparat, denkbar.

In Analogie zu den pathophysiologischen Funktionen des Schließens der Gap-Junction-Kanäle in einem ischämischen Herzinfarktareal ist nicht nur der günstige prophylaktische Effekt des AAP10 auf entkopplungsbegingte Arrhythmien zu betrachten. Mögliche ungünstige Effekte könnten durch das gezielte Öffnen der Gap-Junction-Kanäle, durch Abzug von ATP aus umliegenden nichtischämischen Gewebe, und deren Verbrauch im ischämischen Gewebe, entstehen. Dadurch könnten größere Herzmuskelareale vom Zelltod betroffen sein, die somit die Gefahr von Komplikationen erhöhen. Andererseits könnten aber auch antioxidative und somit protektive Substanzen (z.B. Glutathion) in das ischämische Gebiet gelangen. Dieser Aspekt muß in künftigen Arbeiten untersucht werden.
Es sind noch weitere Einsatzgebiete für antiarrhythmische Peptide außerhalb der Kardiologie vorstellbar. Zum Beispiel bei der Behandlung von Tumorerkrankungen könnten antiarrhythmische Peptide zur Anwendung kommen. Bereits 1966 erkannten Loewenstein und Kanno [1966], daß die Kommunikationsfähigkeit zwischen Tumorzellen und anderen Zellen verloren geht. Ursachen sind Tumorpromotoren und Onkogene, die ein Schließen der Gap-Junction-Kanäle [Klaunig und Ruch 1990], Veränderungen in der Connexin-Expression [Krutovskikh et al. 1994, Mesnil et al. 1993a, Oyamada et al. 1995], Bildung inkompatibler Connexine und Veränderungen der Zelladhäsionsmoleküle [Mesnil und Yamasaki 1993b] hervorrufen können. Ein unkontrolliertes aggressives Wachstum ist die Folge. Antiarrhythmische Peptide könnten die interzelluläre Kommunikation der Tumorzellen durch gezielte Öffnung der Gap Junctions verbessern. Damit wäre eine verbesserte Wachstumskontrolle der Tumorzellen zu erwarten.

Auch in der Behandlung neurologischer Erkrankungen, die auf einer gestörten Zellkopplung beruhen ist der Einsatz antiarrhythmischer Peptide vorstellbar.

Antiarrhythmische Peptide könnten durch ihren Peptidcharakter problematisch bei der alltäglichen medizinischen Anwendung sein. Peptide sind instabil und haben den Nachteil an Glas- und Kunststoffoberflächen zu haften, so daß Fehler in der Dosierung resultieren könnten. Somit stellen Antiarrhythmische Peptide möglicherweise einen ersten Schritt zu einer Substanzklasse mit völlig neuen Wirkprofil dar, auf deren Grundlage noch Verbesserungen hinsichtlich der chemisch-physikalischen Eigenschaften möglich sind.

Die Befunde zeigen die große Bedeutung des Gebietes der zellulären Kommunikation über Gap-Junction-Kanäle, und deren pharmakologische Beeinflussung. Dieses noch recht junge und wenig erforschte Gebiet wird möglicherweise noch weitere Einsichten in pathophysiologische Abläufe ermöglichen, und neue therapeutisch-pharmakologische Ansatzpunkte eröffnen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit, konnte an isolierten adulten Meerschweinchenkardiomyozyten mittels Doppel-Zell-Voltage-Clamp-Technik eine reversible, signifikante Leitfähigkeitszunahme an den Gap Junctions, unter dem Antiarrhythmischen Peptid 10 (AAP10, 50nM), festgestellt werden. Der Effekt beruht im wesentlichen auf einer Proteinkinase C-abhängigen verstärkten Phosphorylierung der Gap Junctions. Der Proteinkinase C (PKC) gehören 12 Isoformen an. Durch Einsatz isoformspezifischer PKC-Inhibitoren, wie HBDDE (blockiert die PKC α und die PKC γ) und CGP54345 (blockiert die PKC α), konnte ein signifikanter Rückgang der unter AAP10 gesehenen Leitfähigkeitszunahme registriert werden. Außerdem konnte ebenfalls durch Monensin (blockiert den Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran) der AAP10-Effekt signifikant gehemmt werden. Weil CGP54345 isoformspezifisch selektiv die PKC α hemmt, kann geschlußfolgert werden, daß die PKC α am Signaltransduktionsweg des AAP10 involviert ist. Ob noch weitere PKC-Isoformen beteiligt sind, kann durch diese Arbeit weder bestätigt, noch vollständig ausgeschlossen werden. Die signifikante Hemmung des AAP10-Effektes unter Monensin steht im Einklang mit der These, daß auch die Connexine im Golgi-Apparat durch AAP10 vermehrt phosphoryliert werden, und es so zu einem verstärkten Connexineinbau in die Membran kommt.

Die Abbildung 26 gibt eine zusammenfassende Darstellung der vermuteten Wirkungsweise antiarrhythmischer Peptide.



Abb. 26: Vermutete Wirkungsweise antiarrhythmischer Peptide (AAP) über die Proteinkinase Cα (PKCα), modifiziert nach Abbildungen von Jalili et al. [1999] und Dhein [1998c]. Die Bindung des AAP führt zu einer Konformationsänderung des AAP-Rezeptors. Daraufhin wird ein G-Proteins aktiviert, welches seinerseits die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die aktivierte PLC hydrolysiert Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) zu Diazylglyzerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). Die Freisetzung von IP₃ und deren Bindung an den IP₃-Rezeptor des Sarkoplasmatischen Retikulums setzt Ca²⁺ aus den sarkoplasmatischen Speichern in das Cytosol frei. Eine erhöhte intrazelluläre Ca2+- Konzentration führt zur Translokation der zytosolischen inaktiven PKCa zur Plasmamembran, wo sie durch DAG aktiviert wird. Die aktivierte PKCa phosphoryliert dann Zielproteine wie Connexone in der Membran, Connexine (z.B. Cx43) im Golgi-Apparat, und Zielproteine im Kern. Durch vermehrte Phosphorylierung der Connexone kommt es zu einer erhöhten Gesamtleitfähigkeit der Gap-Junction-Kanäle. Das konnte durch eine Blockierung der PKC α , durch HBDDE (blockiert PKC α , γ) und CGP54345 (blockiert PKCa) inhibiert werden. Durch Monensin konnte der Einbau von Connexinen in die Membran gestoppt werden.

7. Literatur

1) Allen DG, Morris PG, Orchard CH, Pirolo JS: A nuclear magnetic resonance study of metabolism in the ferret heart during hypoxia and inhibition of glycolysis. J Physiol 361 (1985) 185-204 2) Aonuma S, Kohama Y, Akai K, Iwasaki S: Studies on heart. 20. Further effects of bovine protein (BVP) and antiarrhythmic peptide (AAP) on myocardial cells in culture. Chem Pharm Bull 28 (1980b) 3340-3346 3) Aonuma S, KohamaY, Akai K, Komiyama Y, Nakajima S, Wakabayashi M, Makino T: Studies on heart. 19. Isolation of an atrial peptide that improves the rhythmicity of cultured myocardial cell clusters. Chem Pharm Bull 28 (1980a) 3332-3339 4) Aonuma S, Kohama Y, Makino T, Fujisawa Y: Studies on heart. 21. Amino acid sequence of antiarrhythmic peptide (AAP) isolated from atria. J Pharmacobiodyn 5 (1982) 40-48 Aonuma S, KohamaY, Makino T, Hattori K: Studies on heart. 22. Inhibitory 5) effect of an atrial peptide (AAP) on drug-induced arrhythmia. Yakugaku Zasshi 103 (1983) 662-666 6) Argentieri T, Cantor E, Wiggins JR: Antiarrhythmic peptide has no direct cardiac actions. Experientia 45 (1989) 737-738 7) Asaoke Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y: Protein kinase c, calcium and phospholipid degradation. Trends Biochem Sci 17 (1992) 414-417 8) Bastide B, Neyses L, Ganten D, Paul M, Willecke K, Traub O: Gap Junction protein connexin 40 is preferentially expressed in vascular endothelium and conductive bundles of rat myocardium and is incraesed under hypertensive conditions. Circ Res 73 (1993) 1138-1149

9)	Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Oronzi-Scott M, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH: Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth diseaese. Science 262 (1993) 2039-2042
10)	Chanson M, Meda P: Rat pancreatic acinar cell coupling: comparison of extent and modulation in vitro and in vivo. In: Hall JE, Zampighi GA, Davis RM (Hrsg.): Gap Junctions. Elsevier, Amsterdam,1993, 199-205
11)	Christ GJ, Spray DC, El-Schaban M, Moore LK, Brink BR: Gap junctions in vascular tissues. Circ Res 79 (1996) 631-646
12)	Daleau P: Effects of antiarrhythmic agents on junctional resistance of guinea pig ventricular cell pairs. J Pharmacol Exp Ther 284 (1998) 1174-1179
13)	Dekker LRC, Fiolet JWT, Van Bavel E, Coronel R, Opthof T, Spaan JAE, Janse MJ: Intracellular Ca ²⁺ , intercellular electrical coupling and mechanical activity in ischemic rabbit papillary muscle. Circ Res 79 (1996) 237-246
14)	De Mello WC: Influence of the sodium pump on intercellular communication in heart fibers: Effect of intracellular injection of sodium ion on electrical coupling. J Physiol 263 (1976) 171-197
15)	Dhein S: Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. Trends pharmacol sci, 19 (1998a) 229-241
16)	Dhein S: Gap-Junction-Kanäle und zelluläre Kommunikation. Dtsch Med Wochenschr, 123 (1998b) 912-917
17)	Dhein S: Cardiac gap junctions – physiology, regulation, pathophysiology and pharmacology. Karger, Basel (u.s.w), 1998c
18)	Dhein S, Gottwald M, Schaefer T, Müller A, Gover R, Tudyka T: Improvement of intercellular coupling by an antiarrhythmic peptide during ischemia and hypoxia. Eur Heart J 18 Supplement (1997) 568

19)	Dhein S, Hammerath SB: Effect of a gap junction blockade using palmitoleic acid in the beating heart. Anisotropy and electrophysiology. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 361 Supplement (2000) R108
20)	Dhein S, Hammerath SB: Aspects of the intercellular communication in aged hearts: effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 364 (2001) 397-408
21)	Dhein S, Krüsemann K, Schaefer T: Effects of the gap junction uncoupler palmitoleic acid on the activation and repolarisation wavefronts in isolated rabbit hearts. Br J Pharmacol 128 (1999a) 1375-1384
22)	Dhein S, Manicone N, Müller A, Gerwin R, Ziskoven U, Irankhahi A, Minke C, Klaus W: A new synthetic antiarrhythmic peptide reduces dispersion of epicardial activation recovery interval and diminishes alterations of epicardial activation patterns induced by regional ischemia. A mapping study. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 350 (1994) 174-184
23)	Dhein S, Müller A, Gerwin R, Klaus W: Comparative study on the proarrhythmic effects of some antiarrhythmic agents. Circulation 87 (1993) 617-630
24)	Dhein S, Poeppel P, Krüsemann K, Schaefer T, Stuhlmann D, Klaus W: Intracellular distribution of gap junction channels in rat atria is altered by arrhythmia. Europ J Physiol 435 Supplement (1998d) R81
25)	Dhein S, Schaefer T, Poeppel P, Grover R, Bachmann M, Müller A: On the molecular mechanism of action of antiarrhythmic peptides in transfected HELA-Cx43-Cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359 Supplement (1999b) R7
26)	Dhein S, Schott M, Gottwald E, Tudyka T, Rutten P: Antiarrhythmic effects of the antiarrhythmic peptide AAP10 in regional ischemia: preservation of longitudinal propagation of activation. Circulation 94 Supplement (1996) 715

27)	Dhein S, Tudyka T: Therapeutic potential of antiarrhythmics peptides. Cellular coupling as a new antiarrhythmic target. Drugs 49 (1995a) 851-855
28)	Dhein S, Tudyka T, Schott M, Gottwald E, Müller A, Klaus W: A new antiarrhythmic peptide improves cellular coupling: A possible new antiarrhythmic mechanism. Circulation 92 Supplement (1995b) 641
29)	Dhein S, Weng S, Grover R, Tudyka T, Gottwald M, Schaefer T, Polontchouk L: Proteinkinase C α mediates the effect of antiarrhythmic peptide on gap junction conductances. Cell Adhesion and Communication 8 (2001c) 257 - 264
30)	Dhein S, Weng S, Polontchouk L, Grover R, Schaefer T: Pharmacological modification of gap junctional coupling by antiarrhythmic peptides. Role of PKC. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 363 Supplement (2001a) R99
31)	Dhein S, Weng S, Schaefer T, Grover R, Polontchouk L: Role of protein kinase c (PKC) in the action of antiarrhythmic peptides. FASEB J 15 (2001b) A916
32)	Doble BW, Kardami E: Basic fibroblast growth factor and gap junction mediated intercellular communication of cardiac fibroblasts. Mol Cell. Biochem 143 (1995) 81-87
33)	Doble BW, Ping P, Kardami E: The ϵ subtype of proteinkinase C is required for cardiomyocyte connexin-43 phosphorylation. Circ Res 86 (2000) 293-301
34)	Echt DS, Liebson PR, Mitchel LB et al.: Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide or placebo. The cardiac arrhythmia suppression trial. New Engl J Med 324 (1991) 781-788
35)	Elvan A, Huang XD, Pressler ML, Zipes DP: Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs. Circulation 96 (1997) 1675-1685

36)	Faber DS, Yang XD, Wolszon LR: Plasticity of gap junctions at mixed synapses. In: Hall JE, Zampighi GA, Davis RM (Hrsg.): Gap Junctions. Elsevier, Amsterdam, 1993, 135-139
37)	Hillis GS, Duthie LA, Brown PA, Simpson JG, MacLeod AM, Haites NE: Upregulation an co-localisation of connexin 43 and cellular adhesion molecules in inflammatory renal disease. J Pathol. 182 (1997) 373-379
38)	Hofmann, J: The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. The FASEB Journal 11 (1997) 649-669
39)	Horowitz P, Hill W: The art of electronics. Cambridge Univers. Press, 1991
40)	Hoya A, Venosa RA: Ionic movements mediated by monensin in frog skeletal muscle. Biochim Biophys Acta 1104(1) (1992) 123-131
41)	Imanishi S, Surawicz B: Automatic activity in depolarized guinea pig ventricular myocardium. Circ Res 39 (1976) 751
42)	Inabayashi M, Miyauchi S, Kamo N, Jin T: Conductance change in phospholipid bilayer membrane by an electroneutral ionophore, monensin. Biochemistry 34(10) (1995) 3455-3460
43)	Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL: Preferential elevation of protein kinase c isoform βII and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. Proc Natl Acad Sci 89 (1992) 11059-11063
44)	Jalili T, Takeishi Y, Walsh RA: Signal transduction during cardiac hypertrophy: The role of $G\alpha_q$, PLC β_1 ,and PKC. Cardiovasc Res 44 (1999) 5-9
45)	Jara PI, Boric MP, Saez JC: Leukocytes express connexin 43 after activation with lipopolysaccharide and appear to form gap junctions with endothelial cells after ischemia-reperfusion. Proc Natl Acad Sci 92 (1995) 7011-7015

Kameyama M: Electrical coupling between ventricular paired cells isolated 46) from guinea-pig heart. J Physiol 336 (1983) 345-357 47) Kashiwada Y, Huang L, Ballas LM, Jiang JB, Janzen WP, Lee KH: New hexahydroxybiphenyl derivatives as inhibitor of protein kinase c. J Med Chem 37 (1994) 195-200 48) Klaunig JE, Ruch RJ: Biology of disease. Lab Invest 62 (1990) 135-142 49) Kohama Y, Iwabuchi K, Shibahara T, Okabe M, Mimura T: Response of immunoreactive antiarrhythmic peptide (IR-AAP) level associated with experimental arrhythmia in rats. J Pharmacobiodyn 9 (1986) 806-810 50) Kohama Y, Kawahara Y, Kabe M, Mimura T, Aonuma S: Determination of immunoreactive antiarrhythmic peptide (AAP) in rats. J Pharmacobiodyn 8 (1985) 1024-1031 51) Kohama Y, Okimoto N, Mimura T, Fukaya C, Watanabe M, Yokoyama K: A new antiarrhythmic peptide, N-3-(4-hydroxyphenyl)-propionyl-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly. Chem Pharm Bull 35 (1987) 3928-3930 52) Kolb HA: Double whole-cell patch clamp technique. In: Kettenmann H., Grantyn R. (Hrsg.): Practical Electrophysiological Methods. Wiley-Liss, New York (u.s.w), 1992, S. 289-298 53) Krutovskikh VA, Mazzoleni G, Mironov N, Omori Y, Aguelon AM, Mesnil M, Berger F, Partenski C, Yamasaki H: Altered homologues and heterologoues gap junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. Int J Cancer 56 (1994) 87-94 54) Kwak BR, Hermans MM, De Jonge HR, Lohmann SM, Jongsma HJ, Chanson M: Differential regulation of distinkt types of gap junction channels by similar phosphorylating conditions. Mol Biol Cell 6 (1995c) 1707-1719

55)	Kwak BR, Jongsma HJ: Cardiac gap junctions: three distinct single channel conductances and their modulation by phosphorylating treatments. Pflügers Arch 422 (1992) 198-200
56)	Kwak BR, Jongsma HJ: Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. Mol Cell Biochem 157 (1996) 93-99
57)	Kwak BR, Saez JC, Wilders R, Chanson M, Fishman GI, Hertzberg EL, Spray DC, Jongsma HJ: Effects of cGMP-dependent phosphorylation on rat and human connexin43 gap junction channels. Pflügers Arch 430 (1995a) 770-778
58)	Kwak BR, Van Veen TA, Analbers LJ, Jongsma HJ: TPA increases conductance but decreases permeability in neonatal rat cardiomyocyte gap junctional channels. Exp Cell Res 220 (1995b) 456-463
59)	Laird DW, Puranam KL, Revel JP: Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. Biochem J 273 (1991) 67-72
60)	Loewenstein WR: Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochem Biophys Acta 56 (1979) 1-65
61)	Loewenstein WR, Kanno Y: Intercellular communication and the control of tissue growth. Nature 209 (1966) 1248-1249
62)	Lüderitz B: Herzrythmusstörungen. 5.Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1998
63)	Mesnil M, Piccoli C, Klein JL, Morand I, Yamasaki H. Lack of correlation between the gap junctional communication capacity of human colon cancer cell lines and expression of the DCC gene, a homologue of a cell adhesion molecule (N-CAM). Jpn J Cancer Res 84 (1993a) 742-747
64)	Mesnil M, Yamasaki H: Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells – evidence and hypothesis. Mol Carcinogen 7 (1993b) 14-17

65)	Metzger P, Weingart R: Electric current flow in cell pairs isolated from adult rat hearts. J Physiol 366 (1985) 177-195
66)	Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, Khaner H, Simpson PC: A PKC- Isoenzym is translocated to cytoskeletal elements on activation. Cell Regul 1 (1990) 693-706
67)	Müller A, Gottwald M, Tudyka T, Linke W, Klaus W, Dhein S: Increase in gap junction conductance by an antiarrhythmic peptide. Eur J Pharmacol 327 (1997a) 65-72
68)	Müller A, Lauven M, Berkels R, Dhein S, Polder HR, Klaus W: Switched single-electrode voltage-clamp amplifiers allow precise measurement of gap junction conductance. Am. J. Physiol 276 (Cell Physiol. 45) (1999) C980-C987
69)	Müller A, Schaefer T, Linke W, Tudyka T, Gottwald M, Klaus W, Dhein S: Actions of the antiarrhythmic peptide AAP10 on intercellular coupling. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 356 (1997b) 76-82
70)	Musil LS, Cunningham BA, Edelmann GM, Goodenough DA: Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junctional communication-competent and –deficient cell lines. J Cell Biol 111 (1990) 2077-2088
71)	Musil LS, Goodenough DA: Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin 43, occurs after exit from the ER. Cell 74 (1993) 1065-1077
72)	Musil LS, Goodenough DA: Biochemical analysis of connexon assembly. In: Kanno Y, Kataoka K, Shiba Y, Shibata Y, Shimazu T (Hrsg.): Intercellular communication through gap junctions. Progress in Cell Research, Elsevier, Amsterdam, 1995, 327-330
73)	Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase c and its implication for cellular regulation. Nature 334 (1988) 661-665

74)	Noma A, Tsuboi N: Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig. J Physiol 382 (1987) 193-211
75)	Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996
76)	Oyamada M, Sakamoto H, Enomoto K, Oyamada Y, Kojima T, Sawada M, Mori M: Expression of multiple connexins is differentially modulated during multistage hepatocarcinogenesis. In: Kanno Y, Kataoka K, Shiba Y, Shibata Y, Shimazu T (Hrsg): Intercellular communication trough gap junctions. Elsevier, Amsterdam, 1995, 103-106
77)	Page E: Cardiac gap junctions. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE (Hrsg.): The cardiovascular system. Raven Press 2 nd ed., New York, 1992, 1003-1047
78)	Paul DL: New functions for gap junctions. Curr opin Cell Biol 7 (1995) 665-672
79)	Perkins G, Goodenough DA, Sosinsky G: Three dimensional structure of the gap junction connexon. Biophys J 72 (1997) 533-544
80)	Peters NS: Myocardial gap junction organization in ischemia and infarction. Microscopy Res Tech 31 (1995) 375-386
81)	Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ: Reduced content of connexin 43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischaemic human hearts. Circulation 88 (1993) 864-875
82)	Petersen OH: The electrophysiology of gland cells. Academic press, London, 1980
83)	Polder HR: SEC 05L/H Single electrode system – Operating instructions and system description. NPI Electronic GmbH, Tamm, 1996

84)	Polontchouk L, Haefliger JA, Ebelt B, Schaefer T, Stuhlmann D, Mehlhorn U, Kuhn-Regnier F, De Vivie ER, Dhein S: Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. J Am Coll Cardiol 38(3) (2001) 883-891
85)	Powell T, Terrar D, Twist VM: Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. J Physiol 303 (1980) 131-153
86)	Puranam KL, Laird DW, Revel JP: Trapping an intermediate form of connexin 43 in the golgi. Exp Cell Res 206 (1993) 85-92
87)	Rouet-Benzineb P, Mohammadi K, Perennec J, Poyard M, Bouanani NEH, Crozatier B: Protein kinase c isoform expression in normal and failing rabbit heart. Circ Res 79 (1996) 153-161
88)	Rybin VO, Steinberg SF: Protein kinase c isoform expression and regulation in the developing rat heart. Circ Res 74/2 (1994) 299-309
89)	Saez JC, Nairn AC, Czernik AJ, Fishman GI, Spray DC, Hertzberg EL: Phosphorylation of connexin 43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. J Mol Cell Cardiol 29 (1997) 2131-2145
90)	Schaefer T: Molekularer Wirkmechanismus des antiarrhythmischen Peptides AAP10. Inaugural Dissertation, MathNat. Fak., Univ. zu Köln (2000)
91)	Schaefer T, Gottwald M, Grover R, Dhein S: Action and mechanism of antiarrhythmic peptide AAP10. Eur J Physiol 437 Supplement (1999) R156
92)	Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. 27.Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1997
93)	Spray DC, Burt JM: Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. Am J Physiol 258 (1990) C195-C205
94)	Spray DC, Harris AL, Bennett MV: Equilibrium properties of a voltage- dependent junctional conductance. J Gen Physiol 77 (1981) 77-93

95)	Spray DC, White RL, Mazet F, Bennett MV: Regulation of gap junctional conductance. Am J Physiol 248 (1985) H753-H764
96)	Stergiopoulos K, Alvarado JL, Mastroianni M, EK-Vitorin JF, Taffet M, Delmar M: Hetero-domain interactions as a mechanism for the regulation of connexin channels. Circ Res 84 (1999) 1144-1155
97)	Sugiura H, Toyama J, Tsuboi N, Kamiyama K, Kodama I: ATP directly affects junctional conductance between paired ventricular mycytes isolated from guinea pig heart. Circ Res 66 (1990) 1095-1102
98)	Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, Duhamel L, Charon D, Kirilovsky J: The bisindolyImaleimide GF 109203X is a potent selective inhibitor of proteinkinase C: J Biol Chem 266(24) (1991) 15771-15781
99)	Valiunas V, Weingart R, Brink PR: Formation of heterotypic channels by connexins 40 and 43. Circ Res 86 (2000) e42-e49

- 100) Van Der Velden HMW, Van Zijverden M, Van Kempen MJA, Wijfeld MCEF, Groenewegen WA, Allessie MA, Jongsma HJ: Abnormal expression of the gap junction protein connexin 40 during chronic atrial fibrillation in the goat. Circulation 94 Supplement I (1996) I-593
- 101) Van Rijen HVM, Wilders R, Van Ginneken ACG, Jongsma HJ: Quantitative analysis of dual whole-cell voltage-clamp determination of gap junctional conductance. Pflüger Arch – Eur J Physiol 436 (1998) 141-151
- 102) Vera B, Sanchez-Abarca LI, Bolanos JP, Medina JM: Inhibition of astrocyte gap junctional communication by ATP depletion is reversed by calcium sequestration. FEBS Letters 392 (1996) 225-228
- 103) Verrecchia F, Duthe F, Duval S, Duchatelle I, Sarrouilhe D, Herve JC: ATP counteracts the rundown of gap junctional channels of rat ventricular myocytes by promoting protein phosphorylation. J Physiol 516 (1999) 447-459

- 104) Verrechia F, Herve JC: Reversible inhibition of gap junctional communication elicited by several classes of lipophilic compounds in cultured rat cardiomyocytes. Can J Cardiol 13(11) (1997) 1093-1100
- 105) Way KJ, Chou E, King GL: Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. Trends pharmakol sci 21 (2000) 181-187
- 106) Weingart R: Electrical properties of the nexal membrane studied in rat ventricular cell pairs. J Physiol 370 (1986) 267-284
- 107) Weingart R, Maurer P: Action potential transfer in cell pairs isolated from adult rat and guinea pig ventricles. Circ Res 63 (1988) 72-80
- 108) Wilders R, Jongsma HJ: Limitations of the dual voltage clamp method in assaying conductance and kinetics of gap junction channels. Biophys J 63 (1992) 942-953
- 109) Wit AL, Hoffmann BF, Cranefield PF: Slow conduction and re-entry in the ventricular conducting system. Return extrasystole in canine Purkinje fibers. Circ Res 30 (1972)
 1
- 110) Zimmermann J, Garavani G, Fabbro P, Mett H, Müller M, Regenass B, Meyer E:
 Phenylaminopyrimidines a new class of highly selective PKC-Inhibitor. International meeting on growth control and therapy of cancer. abstr 015 (1994)

8. Thesen

- 1. Die Leitfähigkeit an den Gap Junctions gekoppelter, adulter Meerschweinchenkardiomyozytenpaare konnte durch das Antiarrhythmische Peptid 10 (AAP10, 50nM) signifikant gesteigert werden. Dieser Effekt konnte nach Auswaschen des AAP10 nicht mehr beobachtet werden, und war somit vollständig reversibel.
- Der leitfähigkeitsteigernde Effekt des AAP10 konnte durch intrazelluläre Gabe von Proteinkinase C-isoformspezifischen Inhibitoren (HBDDE – blockiert die PKCα und die PKCγ, und CGP54345 – blockiert die PKCα) vollständig und signifikant aufgehoben werden. Das läßt auf eine Beteiligung der PKCα in der Signaltransduktion des AAP10 schließen.
- 3. Der leitfähigkeitsteigernde Effekt des AAP10 konnte ebenfalls durch eine Blockade des Connexintransports vom Golgi-Apparat zu der Plasmamembran durch Monensin signifikant gehemmt werden. Das gibt einen Hinweis darauf, daß auch die Connexine im Golgi-Apparat durch AAP10 verstärkt phosphoryliert werden, und somit vermehrt in die Membran eingebaut werden.

<u>Lebenslauf</u>

Persönliche Angaben

Name: Wohnort:	Stephan Weng Burgstr. 5 06114 Halle Tel.: 0345/5229424
Geburtstag und –ort: Familienstand: Nationalität:	04.05.1973, Magdeburg ledig deutsch
Mutter: Vater:	Doris Weng, Sekretärin Hans-Joachim Weng, Diplom-Ingenieur
Schulbildung	
1979 – 1989	Besuch der allgemeinbildenden polytechnischen Oberschule Abschluß: 10. Klasse
1993 – 1996	Besuch der Schule des Zweiten Bildungsweges Magdeburg (Abendgymnasium) Abschluß: Abitur
Zivildienst 1993 – 1995	Malteser Hilfsdienst Magdeburg Ausbildung zum Rettungssanitäter Abschluß: Rettungssanitäter
Berufsausbildung 1989 – 1993	Ausbildung zum Krankenpfleger im StElisabeth-Krankenhaus Halle/Saale Abschluß: Krankenpfleger
Berufspraxis 1995 – 1996 6/96 – 8/96 1997 – 1998	Arbeit als Rettungssanitäter, Malteser Hilfsdienst Magdeburg medizinischer Betreuer für Kinder im Ferienlager Camp Pocono Ridge, South Sterling, Pennsylvania, USA Arbeit als studentische Aushilfe, Rettungsdienst, Fa. Stefan Kotte, Halle/Saale
seit 1998	Arbeit als studentische Aushilfe, Notfallambulanz, StElisabeth- Krankenhaus Halle/Saale
Studium seit 1996	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
Halle. den 07.09.2002	

Stephan Weng

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, daß ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland, noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, den 07.09.2002

Stephan Weng

Publikationen

Dhein S, Schaefer T, Polontchouk L, Weng S: Involvement of protein kinase C (PKC) in the effekt of antiarrhythmic peptide (AAP) on cardiac gap junctions. Br. J. Pharmacol (Suppl.) (2001) C27

Dhein S, Weng S, Grover R, Tudyka T, Gottwald M, Schaefer T, Polontchouk L: Proteinkinase C α mediates the effect of antiarrhythmic peptide on gap junction conductances. Cell Adhesion and Communication 8 (2001c) 257 - 264

Dhein S, Weng S, Polontchouk L, Grover R, Schaefer T: Pharmacological modification of gap junctional coupling by antiarrhythmic peptides. Role of PKC. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 363 (Suppl.) (2001) R99

Dhein S, Weng S, Schaefer T, Grover R, Polontchouk L: Role of protein kinase C (PKC) in the action of antiarrhythmic peptides. Faseb J 15 (2001) A916

Weng S, Lauven M, Schaefer T, Polontchouk L, Grover R, Dhein S: Pharmacological modifikation of gap junction coupling by an antiarrhythmic peptide via protein kinase C activation. Faseb J 16 (2002) 1114 - 1116

Danksagung

Herrn Prof. Brodde danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. S. Dhein bedanken, für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, und besonders für die ausgezeichnete und herzliche Betreuung, wodurch meine Arbeit ermöglicht wurde.

Herrn Dr. T. Schaefer möchte ich danken, für die intensive Anleitung an der Patch-Clamp-Anlage, und für die zahlreichen Ratschläge.

Karina Abuazide Paulus danke ich für die großzügige Unterstützung bei der Präparation der Herzmuskelzellen.

Frau Dr. L. Polontchouk danke ich für die allzeit gewährte Hilfe.

Nicole Huebel danke ich für die nette Unterstützung bei der Gestaltung der Grafiken.

Des weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.