

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

urn:nbn:de:gbv:3-000006052

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006052>]

Herzrhythmusstörungen stellen eine häufige Komplikation infolge von Herz-Kreislauf-erkrankungen 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 PKC α) 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 PKC α 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	Bisindolylmaleimid
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
e^-	Elektron
EGF	Epithelwachstumsfaktor
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
f_e	Grenzfrequenz der Elektrode
f_f	Grenzfrequenz des Tiefpaßfilters
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
f_m	Grenzfrequenz der Membran
f_s	sampling frequency
f_{sw}	switching frequency
g_j	junctionale Leitfähigkeit
I_m	Membranstrom
I_{max}	maximaler Strom
I_{offset}	Leckstrom
IP ₃	Inositoltriphosphat
LAD	left anterior descending artery
LED	light emitting diode

MAPK	Mitose-assoziierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MW	Molekulargewicht
NI-DAQ	National Instruments data aquisition
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, Kommandopotential
U _{trans}	transjunctionale Spannung