

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 (= Nexus, Ansammlung von Gap-Junction-Kanälen) stellen neben Tight Junctions (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 Isoformen der Connexine identifiziert werden, wobei ein Gap-Junction-Kanal aus homologen (nur aus einer 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.

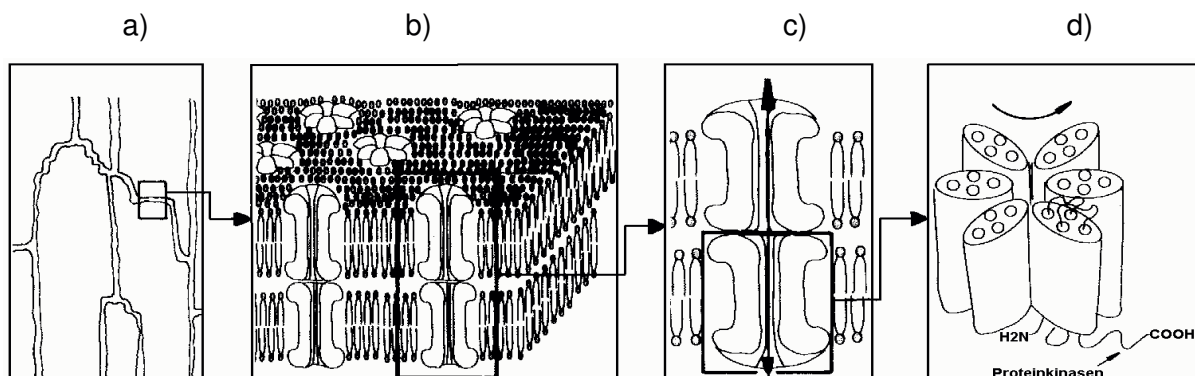


Abb. 1:(a)Zeichnung eines Herzmuskelzellverbandes (b)Darstellung eines Gap-Junction-Clusters (Nexus) benachbarter Zellen, (c)Modell eines einzelnen Gap-Junction-Kanals. Der Pfeil liegt im dodecameren Kanal. (d)Modell eines Connexons. Dieser Pfeil weist auf eine Rotationsbewegung hin, die den Kanal öffnet 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, posttranslational 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.

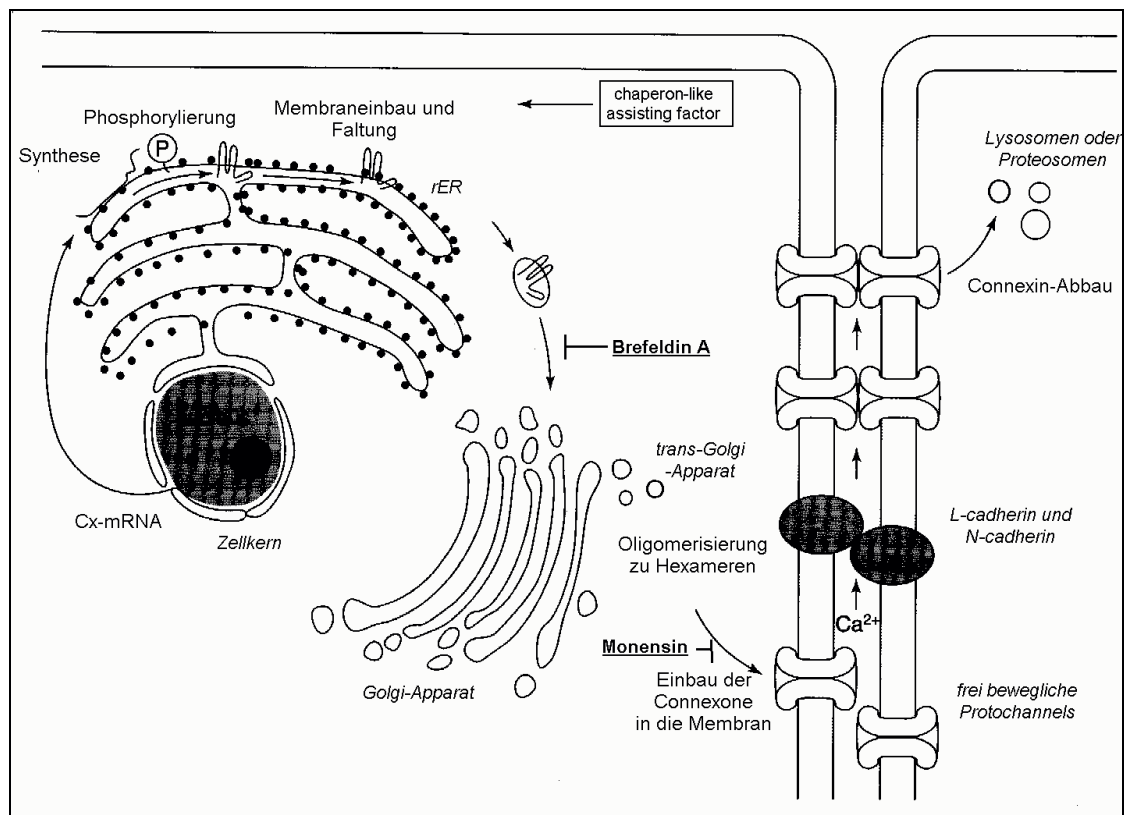


Abb.2: Darstellung der Connexinsynthese am rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER), Connexineinbau in die Membran und Connexinabbau durch Lysosomen oder Proteosomen. Der Transport vom rER zum Golgi-Apparat kann durch Brefeldin A, und der Transport vom Golgi-Apparat zur Membran durch Monensin gehemmt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

Gap-Junction-Kanäle sind regulierte niederohmige interzelluläre Verbindungen, die öffnen und schließen können. Sie sind permeabel für Ionen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ , Mg^{2+}) 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^+ , Ca^{2+} , H^+ , Mg^{2+}), 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 Voraussetzung 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 Ca^{2+} -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 Ia 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 Voraussetzungen 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
Ia	Blockade des Na ⁺ -Kanals mit Verlängerung des Aktionspotentials
Ib	Blockade des Na ⁺ -Kanals mit Verkürzung des Aktionspotentials
Ic	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>Ia>Ib>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, Kardioverttern 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 Zellklustern 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: λ, τ, ζ) [Nishizuka 1988, Asaoka 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 PKC γ 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 PKC γ 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:

1. 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?