

## **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 $\alpha,\gamma$  und CGP54345 – PKC $\alpha$ ) 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 Jongma 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-amplifier) 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 $\Omega$ ), Membranwiderstand (100-1000M $\Omega$ ), 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 Meßgenauigkeit 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 (dSEVC-Verstärker) das im 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	Leitonen der Pipettenlsg.	Initialleitfähigkeit in nS
[Kameyama 1983]	Cs-Aspartat	476 - 714
[Weingart 1986]	Cs <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	204
[Noma und Tsuboi 1987]	Cs-Aspartat	90 - 3900
[Müller et al. 1997a,b]	Cs <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	160 ± 25
[Daleau 1998]	K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	71
[Schaefer et al. 1999]	Cs <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	35 ± 5
eigene Arbeit	Cs <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	56 ± 14

Tab. 7: Initialleitfähigkeiten an gekoppelten Meerschweinchenkardiomyozytenpaaren.

In dieser Arbeit wurde in der Kontrollgruppe eine Initialleitfähigkeit von  $56 \pm 14 \text{ nS}$  mit  $\text{Cs}^+/\text{Cl}^-$  als Leitonen 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 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , 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] beobachtete 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-Protein-gekoppelten 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  $^{14}\text{C}$ -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 der PKC $\alpha$ und PKC $\gamma$	[Kashiwada et al. 1994]
CGP54345	katalytische Untereinheit der PKC $\alpha$	[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 Na<sub>2</sub>ATP, 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 widersprachen 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<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und Ca<sup>2+</sup>-ATPase führt. Folglich steigt die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-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  $\text{Ca}^{2+}$ -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 Pipetten-perfusionstechnik: ( $-343 \pm 208\text{pS/min}$  [Schaefer et al. 1999];  $-2500 \pm 2000\text{pS/min}$  [Müller et al. 1997a,b]). In der vorliegenden Arbeit lag der Rundown der Kontrollserie bei  $-406 \pm 219\text{pS/min}$ .

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 =  $-2,5 \pm 2,0\text{nS/min}$  versus AAP10-Phase =  $+1,0 \pm 0,7\text{nS/min}$  und [Schaefer et al. 1999]: Kontrollphase =  $-160 \pm 30\text{pS/min}$  versus AAP10-Phase =  $+290 \pm 220\text{pS/min}$ ). In der Kontrollphase dieser Arbeit konnte ebenfalls der AAP10-Effekt nachgewiesen werden. Nach Messung des Rundown ( $-406 \pm 219\text{ps/min}$ ) konnte durch extrazelluläre Gabe von AAP10 (50nM) der Rundown umgekehrt werden, und führte zu einer signifikanten Zunahme der Leitfähigkeit ( $+282 \pm 193\text{pS/min}$ ). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der AAP10-Effekt innerhalb der Auswaschphase (10min) reversibel war, und zu einem signifikanten Fortschreiten des Rundown führte ( $-1177 \pm 481\text{pS/min}$ ).

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 $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  [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 PKC $\gamma$  direkt neben den Glanzstreifen lokalisiert werden [Rouet-Benzineb et al. 1996], so daß eine enge räumliche Beziehung zwischen dem Cx43 und der PKC $\gamma$  nachgewiesen werden konnte. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß die PKC $\gamma$  eine Rolle bei der Vermittlung des AAP10-Effektes spielen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in der vorliegenden Arbeit HBDDE (50 $\mu$ M) und CGP54345 (10 $\mu$ M) eingesetzt. Diese beiden Stoffe wurden gewählt, da sie sehr spezifisch einzelne Isoformen der PKC hemmen können (HBDDE: PKC $\alpha$  IC<sub>50</sub>=43 $\mu$ M, PKC $\gamma$  IC<sub>50</sub>=50 $\mu$ M, andere PKC-Isoformen IC<sub>50</sub>>218 $\mu$ M [Kashiwada et al. 1994] und CGP54345: PKC $\alpha$  IC<sub>50</sub>=5,8 $\mu$ M, andere PKC-Isoformen IC<sub>50</sub>>100 $\mu$ M [Zimmermann et al. 1994]). Würde der AAP10-Effekt allein über die PKC $\gamma$  moduliert werden, so müßte HBDDE, in der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 50 $\mu$ M, den AAP10-Effekt wirkungsvoll unterdrücken, CGP54345 (10 $\mu$ M) 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  $\pm$  193pS/min, HBDDE-Serie = -258  $\pm$  205pS/min; CGP54345-Serie = -351  $\pm$  204pS/min). Dies läßt den Schluß zu, daß der AAP10-Effekt im wesentlichen über die PKC $\alpha$  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 PKC $\alpha$  nicht vollständig gehemmt wurde, da die Wirkkonzentrationen für HBDDE nur geringfügig, und für CGP54345 um den Faktor 2, über der jeweiligen IC<sub>50</sub> 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 widerspricht 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 AAP10-induzierter, 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 AAP10-bedingte Zunahme der Leitfähigkeit (Abb. 23). Der Rundown der Kontrollphase ( $-487 \pm 52$  pS/min) veränderte sich nur unbedeutend in der anschließenden AAP10-Phase ( $-455 \pm 105$  pS/min), war aber signifikant erniedrigt gegenüber der AAP10-Phase der Kontrollserie ( $+282 \pm 193$  pS/min). Des weiteren war in der Monensin-Serie eine geringere Initialleitfähigkeit ( $37,1 \pm 8,0$  nS) im Vergleich zu den anderen Meßserien auffällig. (Kontrollserie:  $56,5 \pm 14,1$  nS, HBDDE-Serie:  $53,2 \pm 6,4$  nS, CGP54345-Serie:  $54,7 \pm 10,2$  nS). Dieser Effekt könnte auf einen geringeren Einbau von Connexinen hinweisen, aber auch

durch einen zusätzlichen Einbau von Na<sup>+</sup>-Kanälen in die Membran mitbeeinflusst sein, da Monensin außerdem als Na<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-Ionophor kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration, die einen komplexen Kompensationsmechanismus der Herzmuskelzelle nach sich zieht. Durch den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher kommt es sekundär zu einer regulatorisch erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, die wiederum zu einer erhöhten H<sup>+</sup>-Konzentration führt (Ca<sup>2+</sup>-ATPase). Eine Erhöhung der Ionenkonzentrationen von Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oder H<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, und H<sup>+</sup>) 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 Zellklustern 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 (H<sub>2</sub>N-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 hauptsächlich dieser Fragestellung nachgingen. Die Arbeitsgruppe Argentieri et al. [1989] vermuteten erstmals, daß der AAPnat-Effekt mehr



Resultat passiver Membraneigenschaften als aktiver Ionenströme 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:  $\text{H}_2\text{N-Gly-Ala-Gly-4Hyp-Pro-Tyr-CONH}_2$ ) 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, der maximalen Aufstrichgeschwindigkeit und des Ruhemembranpotentials, aber eine erhöhte Leitungsgeschwindigkeit. Wegen der unveränderten maximalen Aufstrichgeschwindigkeit konnte eine 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 ( $-2,5 \pm 2,0\text{nS/min}$ ), der nach extrazellulärer AAP10-Gabe (50nM) aufgehoben werden konnte, und zu einer Zunahme der Gap-Junction-Leitfähigkeit führte ( $+1,0 \pm 0,7\text{nS/min}$ ). Das Ergebnis wurde durch Schaefer et al. [1999] (Kontrollphase =  $-160 \pm 30\text{pS/min}$ , AAP10-Phase =  $+290 \pm 220\text{pS/min}$ ), und durch die Ergebnisse dieser Arbeit (Kontrollphase =  $-406 \pm 219\text{pS/min}$ , AAP10-Phase =  $+282 \pm 193\text{pS/min}$ ) 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  $^{32}\text{P}$ -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  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate-Studie (vermehrte Phosphorylierung des Kanals) durch einen Inhibitor der Proteinkinase C gehemmt werden müßte. Tatsächlich entsprachen die Ergebnisse der  $^{32}\text{P}$ -orthophosphate-Inkubationsstudie und die Ergebnisse der Doppelzell-Voltage-Clamp-Messungen mit dem PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I, hemmt die PKC-Isoformen PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  [Toullec et al. 1991]) den Befunden von Kwak et al. Die  $^{32}\text{P}$ -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 ( $-130 \pm 50\text{pS}/\text{min}$ ) [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, Asaoka et al. 1992, Hofmann 1997, Jalili et al. 1999, Way et al. 2000]:

Gruppen	Isoformen	Abhängigkeiten der Aktivierung
conventional PKC (cPKC)	$\alpha, \beta_1, \beta_2, \gamma$	-Ca <sup>2+</sup> -Abhängig aktiviert durch PS und DAG
novel PKC (nPKC)	$\delta, \epsilon, \eta, \theta, \mu$	Ca <sup>2+</sup> -Unabhängig reguliert durch PS und DAG
atypical PKC (aPKC)	$\lambda, \tau, \zeta$	Ca <sup>2+</sup> -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 (PIP<sub>2</sub>) zu Diazylglyzerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). Die Freisetzung von IP<sub>3</sub> und deren Bindung an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor des endoplasmatischen oder sarkoplasmatischen Retikulums setzt Ca<sup>2+</sup> aus den Speichern in das Cytosol frei. Eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-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 C<sub>1</sub> (Bindungsstelle für Phorbolster und DAG) mit zwei cysteinreichen Zinkfingern, und C<sub>2</sub> (Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup> und Phospholipidsäuren). Die katalytische Region enthält die Domänen C<sub>3</sub> (Bindungsstelle für ATP) und C<sub>4</sub> (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 C<sub>2</sub>-like-Domäne anstelle einer C<sub>2</sub>-Region. Diese Domäne bindet kein Ca<sup>2+</sup>, 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-Isoformen sind in vielen Geweben vorhanden. Einige PKC-Isoformen sind jedoch relativ spezifisch für eine Gewebeart (z.B. PKC $\gamma$  - Zentralnervensystem, PKC $\theta$  - Skelettmuskulatur, PKC $\beta$  - 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], PKC $\delta$  [Rybin und Steinberg 1994] und die PKC $\gamma$  [Rouet-Benzineb et al. 1996]. Die inaktiven Formen liegen im Cytosol und wandern erst nach Aktivierung (Ca<sup>2+</sup>-Bindung) zur Membran (Translokation). Dabei beobachteten Rouet-Benzineb et al. [1996], daß die PKC $\gamma$  vermehrt an den Glanzstreifen lokalisiert war, und somit eine räumliche Nähe zwischen der PKC $\gamma$  und dem Cx43 bestand, weswegen eine Beteiligung der PKC $\gamma$  an der AAP10-Modulation vermutet wurde. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde innerhalb dieser Arbeit HBDDE (Inhibitor der PKC $\alpha$ ,  $\gamma$  [Kashiwada et al. 1994]) und CGP54345 (Inhibitor der PKC $\alpha$  [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 PKC $\alpha$  IC<sub>50</sub>=5,8 $\mu$ M) erst in Konzentrationen >100 $\mu$ M andere Isoformen inhibiert, und in dieser Studie CGP54345 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M verwendet wurde, sprechen die Befunde dafür, daß die PKC $\alpha$  an der Signaltransduktion des AAP10 beteiligt ist. Eine Beteiligung der PKC $\gamma$ , wie sie nach der Beobachtung der PKC $\gamma$  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-Isoformen ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ) eine Rolle bei der AAP10-Wirkung spielen könnten. Für die PKC $\epsilon$  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 PKC $\alpha$ .

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  $^{14}\text{C}$ -AAP10 zeigten ebenfalls eine Bindung des AAP10 an ein Membranprotein ( $K_D \approx 1,0\text{nM}$ ) [Dhein et al. 2001a]. Ebenso zeigte sich eine Blockierbarkeit mit GDP $\beta$ 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 entkopplungsbedingte 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.