

Aus der Abteilung für Kardiologie und Angiologie
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Hochschule Hannover

Tyrosinkinasen der Src-Familie
inhibieren die Aktivität von L-Typ-Calciumkanälen
in humanen atrialen Kardiomyozyten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der
Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Tanja Kim Frank

aus Göttingen

Hannover, 2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 28.08.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Professor Dr. med. Dieter Bitter-Suermann
Betreuer: Privatdozent Dr. med. Frank Schröder
Referent: Professor Dr. med. Dirk Stichtenoth
Korreferent: Professor Dr. med. Armin Wessel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2007

Promotionsausschussmitglieder: Professor Dr. Hermann Haller
Professor Dr. Klaus Otto
Professor Dr. Gesine Hansen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis eingesetzter Substanzen	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Der kardiale L-Typ-Calciumkanal	1
1.2 Bisherige Studienergebnisse zur Regulation des L-Typ- Calciumkanal-Schaltverhaltens	5
1.3 Rolle der Tyrosinkinase bei der Regulation des L-Typ- Calciumkanals	7
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Patch-Clamp-Methode.....	11
2.2 Materialgewinnung	12
2.3 Patientenprotokolle	12
2.4 Ausschlusskriterien	13
2.5 Eingesetzte Lösungen und Substanzen	13
2.5.1 Lösungen.....	13
2.5.2 Substanzen	15
2.6 Apparativer Aufbau der Patch-Clamp-Anlage.....	19
2.7 Versuchsdurchführung	22
2.7.1 Präparation und enzymatische Isolation der humanen Vorhofmyozyten	22
2.7.2 Herstellung der Pipetten.....	23
2.7.3 Messung von Einzelkanalströmen	23
2.8 Auswertung.....	25

2.8.1	Erstellen der Ereignislisten.....	25
2.8.2	Auswertung der Ereignislisten.....	26
2.9	Mathematische Auswertung und statistische Verfahren.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Patientendaten.....	31
3.2	Wirkung von Tyrosinkinase auf den L-Typ-Calciumkanal.....	34
3.2.1	Versuche mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein.....	34
3.2.2	Wirkung des Src-Tyrosinkinase-Inhibitors PP1.....	37
3.2.3	Vergleich der Effekte von Genistein und PP1.....	41
3.2.4	Wirkung des inaktiven PP1-Analogons PP3.....	42
3.2.5	Wirkung des Tyrosinphosphatase-Inhibitors bpVanadat (bpV).....	43
3.3	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Tyrosinkinase.....	45
3.3.1	Wirkung des Proteinkinase A-Aktivators 8Br- cAMP und Interaktion mit Genistein.....	45
3.3.2	Wirkung von Genistein nach Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem Proteinkinase A- Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPs.....	48
3.3.3	Wirkung von Genistein nach Präinkubation mit dem Proteinphosphatase-Inhibitor Okadasäure.....	50
3.3.4	Genisteinwirkung nach Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem Proteinkinase C- Aktivator PMA.....	51
3.3.5	Wirkung von Genistein nach Präinkubation mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin.....	54
3.3.6	Wirkung von Genistein nach Präinkubation mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIS).....	57

4	Diskussion	59
4.1	Versuche zur Wirkung von Tyrosinkinase auf die Aktivität des L-Typ-Calciumkanals.....	59
4.2	Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen, durch die Tyrosinkinase der Src-Familie das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in humanen atrialen Kardiomyozyten regulieren.....	62
4.3	Klinische Bedeutung	67
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	75
	Lebenslauf	76
	Publikationen	77
	Erklärung	78

Abkürzungsverzeichnis eingesetzter Substanzen

BAPTA-AM	[1,2- bis (σ -Aminophenoxy) ethane- N, N, N', N'- tetraacetic Acid Tetra (Acetoxymethyl) Ester]
BaCl ₂	Bariumchlorid
BIS	Bisindolylmaleimid
bpV (phen)	[Potassium-bisperoxo(1,10-phenantroline)oxovanadat (V)]
8Br-cAMP	8- Bromoadenosin 3': 5'-cyclo-Monophosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
EGTA	Ethylene Glycol- bis (β -Aminoethyl Ether)- N, N, N', N'- Tetraacetone Säure
HEPES	(N- [2-Hydroxyethyl] Piperazin- N'[2-Ethansulfonsäure])
KCl	Kaliumchlorid
K-Glutamat	Kaliumglutamat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure
Na ₂ -ATP	Natrium-Adenosintriphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PMA	Phorbol-12- Myristat-13- Acetat
PP1	4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin
PP3	4-Amino-7-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin
Rp-8-CPT-cAMPs	8-(4-Chlorophenylthio)adenosin-3',5'-cyclo-Monophosphorothioat, RP-isomer
TEA-OH	Tetraethylammoniumhydroxid

1 Einleitung

1.1 Der kardiale L-Typ-Calciumkanal

Calciumkanäle sind komplexe Proteine aus vier bis fünf verschiedenen Untereinheiten [1]. Die größte, Kanal-formende α_1 -Untereinheit enthält dabei zusätzlich den Spannungssensor, den Schaltapparat und die Angriffsstellen für regulatorische Second messenger, Medikamente und Gifte [2]. Weiterhin unterscheidet man eine intrazelluläre β -, einen transmembranären, Disulfid-gekoppelten Komplex aus einer α_2 - und δ - und in manchen Fällen eine transmembranäre γ -Untereinheit [1,3].

Man unterscheidet sechs Typen von Calciumkanälen: den L-, T-, N-, P-, Q- und R-Typ-Calciumkanal [1], wobei die N-, P/Q- und R-Typen hauptsächlich in Neuronen vorkommen [1, 2, 4]. T- und L-Typ unterscheiden sich in Kardiomyozyten aufgrund der Dichte ihres Vorkommens. So ist die Ganzzell-dichte des L-Typ-Calciumkanals mit $1-5/\mu\text{m}^2$ deutlich höher als die des T-Typs ($0,1-0,3/\mu\text{m}^2$). Dazu korrespondierend beträgt die Ganzzellstromamplitude des T-Typ-Calciumkanals bei dem Haltepotential mit maximaler Stromamplitude generell weniger als 10% des L-Typ-Calciumkanal-Stroms. In Einzelkanalmessungen kommt es beim kurzlebigen T-Typ generell rascher und bei negativeren Membranpotentialen zur Kanalaktivierung und -inaktivierung als beim L-Typ-Calciumkanal. Charakteristisches Unterscheidungsmerkmal ist auch die unterschiedliche Einheitsleitfähigkeit bei ca. 100 mM Barium als Ladungsträger: 25 pS beim L-Typ im Vergleich zu ca. 8 pS beim T-Typ-Calciumkanal [4].

Die Regulation des kardialen L-Typ-Calciumkanals erfolgt u.a. über das cAMP-abhängige Second-messenger-System. Durch Kopplung eines Agonisten an den β -adrenergen Rezeptor ändert dieser seine Konformation, wodurch benachbarte stimulierende G-Proteine aktiviert werden. Das G-Protein besteht aus drei Untereinheiten: der an GDP gebundenen α -Untereinheit, einer β - und einer γ -Untereinheit. Durch den Rezeptor-Hormon-Komplex kommt es zum Ersatz von GDP durch GTP, und die β - und γ -Untereinheiten werden abgespalten. Das entstehende α -GTP aktiviert die katalytische C-Untereinheit der Adenylat-

cyclase. Durch den daraus folgenden Anstieg von cAMP kommt es zur Aktivierung von Proteinkinasen, welche dann den L-Typ-Calciumkanal unter ATP-Verbrauch durch Phosphorylierung der transmembranären α_1 -Untereinheit aktivieren. Proteinphosphatasen deaktivieren den L-Typ-Calciumkanal durch Dephosphorylierung. Stimulation von muskarinergen Rezeptoren wirkt durch Inhibition der Adenylatcyclase über hemmende G-Proteine der β -adrenergen Kanalstromzunahme entgegen [3].

Eine schematische Darstellung der Regulation des L-Typ-Calciumkanals über Proteinkinase A und die Proteinphosphatasen Typ 1 und Typ 2a zeigt Abbildung 1 auf der nächsten Seite.

Abbildung 1:

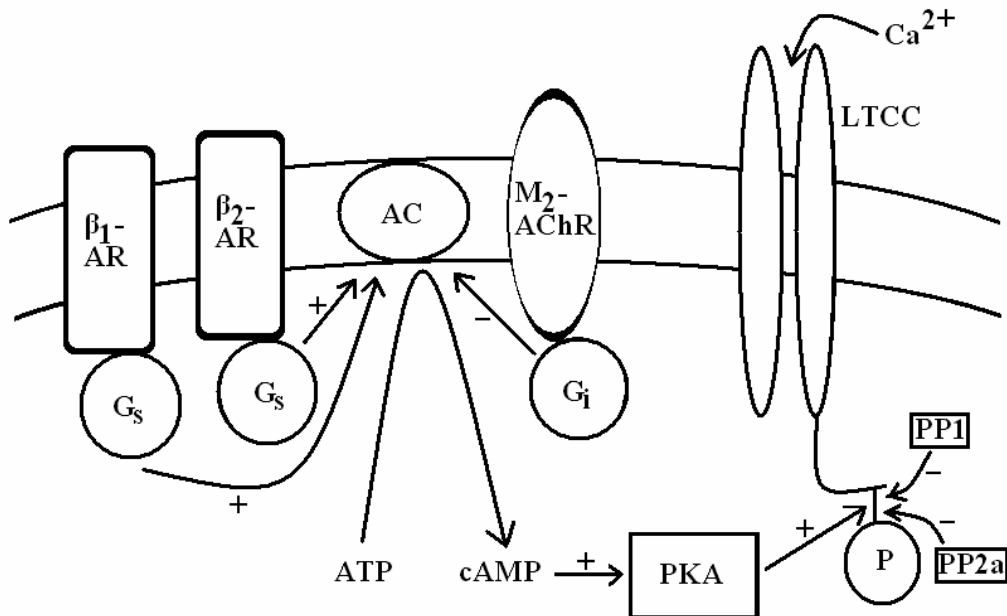


Abb. 1: Schematische Darstellung der Regulation des L-Typ-Calciumkanals (LTCC) über Proteinkinase A (PKA) und die Proteinphosphatasen Typ 1 (PP1) und Typ 2a (PP2a). Stimulation von β_1 - oder β_2 -Adrenorezeptoren (β_1 -AR, β_2 -AR) führt über stimulierende G-Proteine (G_s) zu einer Aktivierung von Adenylatcyclase (AC) mit folgendem cAMP-Anstieg, was wiederum zu einer Aktivierung von Proteinkinase A führt. Diese kann dann durch Phosphorylierung den L-Typ-Calciumkanal aktivieren. Die Proteinphosphatasen Typ 1 und 2a deaktivieren den L-Typ-Calciumkanal durch Dephosphorylierung. Bei Stimulation von muskarinergen M_2 -Rezeptoren (M_2 -AChR) wird durch Hemmung der Adenylatcyclase über inhibitorische G-Proteine (G_i) der β -adrenergen Kanalstromzunahme entgegengewirkt. (Abbildung modifiziert nach Kamp und Hell, 2000)

Der depolarisierende Calciumstrom durch den L-Typ-Calciumkanal ist entscheidend für die kardiale Erregbarkeit, Erregungs-Kontraktions-Kopplung sowie Aktionspotentialdauer und trägt ebenso zur Schrittmacheraktivität in den sinuatrialen nodalen Zellen bei [3, 5- 7].

Der Einstrom von Calcium in die Zelle triggert die Freisetzung von weiterem Calcium aus den intrazellulären Speichern des Sarkoplasmatischen Retikulums und führt durch den folgenden Calciumtransient schließlich zur Myofilamentaktivierung [3].

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Veränderungen der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in kardialen Zellen eine pathophysiologisch wichtige Rolle bei der Entwicklung und Persistenz verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen spielen. So wurden Veränderungen des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens in humanen atrialen Kardiomyozyten bei verschiedenen pathologischen Zuständen beobachtet. Beispiele hierfür sind neben dem Vorhofflimmern [8-11] unter anderem die subklinische Hyperthyreose [12] und die Vorhofdilatation [13].

Der L-Typ-Calciumkanal ist Angriffspunkt der verschiedensten Neurotransmitter, Hormone, Zytokine und Therapeutika. Es ist daher wichtig, die Regelkreisläufe, die die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in humanen atrialen Kardiomyozyten kontrollieren, zu ermitteln.

Einige Beispiele für Neurotransmitter, Hormone, Zytokine und Medikamente mit Wirkung auf den L-Typ-Calciumkanal sind in Tabelle 1 auf der folgenden Seite dargestellt.

Tabelle 1:

Wirkstoff		Wirkmechanismus	Effekt am LTCC	Literatur
Neurotransmitter	Noradrenalin	Rezeptor-vermittelt über G _s -Protein	Steigerung LTCC-Strom	[14]
	Dopamin	Rezeptor-vermittelt über G _s -Protein	Steigerung LTCC-Strom	[15]
Hormon	Angiotensin II	Rezeptor-vermittelt über G _q -Protein	Steigerung LTCC-Strom	[16]
	Histamin	Rezeptor-vermittelt über G _s -Protein	Steigerung LTCC-Strom	[17]
Zytokin	Interleukin-1 β	Rezeptor-vermittelt über G-Protein	Abnahme LTCC-Strom	[18]
	Leukämie-inhibierender Faktor	über extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2	Steigerung LTCC-Strom	[19]
Medikament	Calciumkanalblocker: -Phenylalkylamine -Dihydropyridine -Benzothiazepine	direkte Bindung an Kanal-formende α_1 -Untereinheit LTCC	Abnahme LTCC-Strom	[20]

Tab. 1: *Aufstellung einiger Neurotransmitter, Hormone, Zytokine und Medikamente mit jeweiligem Wirkmechanismus und Effekt auf den L-Typ-Calciumkanal (LTCC).*

1.2 Bisherige Studienergebnisse zur Regulation des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens

Das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten ist eng kontrolliert durch komplexe Netzwerke von Proteinkinasen und -phosphatasen [3, 21-25]. Es ist bekannt, dass das Schaltverhalten von L-Typ-Calciumkanälen durch Serin-/Threonin-Phosphorylierung durch Proteinkinase A (PKA) oder Serin-/Threonin-Dephosphorylierung durch Phosphatase Typ 1 und Typ 2a reguliert wird [21, 26, 27].

So führt z.B. eine β -adrenerge Stimulation über Anstieg des verfügbaren cAMP mit Proteinkinase A-Aktivierung zu einer verstärkten Phosphorylierung und damit erhöhten Aktivierung des L-Typ-Calciumkanals. Es konnte nach Proteinkinase A-Aktivierung sowohl ein Anstieg der Zahl aktiver Kanäle als auch eine erhöhte Aktivität des einzelnen Kanals beobachtet wer-

den [26]. Diese äußert sich in Einzelkanalmessungen in einem Anstieg von Verfügbarkeit und/oder Offenwahrscheinlichkeit mit folgend erhöhtem Ganzzellstrom [27]. So fanden Yue et al. in Einzelkanaluntersuchungen an isolierten Meerschweinchenventrikelzellen nach Gabe von β -Mimetika einen Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit mit einer Verschiebung im Verhältnis der drei Aktivitätsmodi des L-Typ-Calciumkanals vom wenig aktiven Modus 0_a mit wenig kurzen Kanalöffnungen zugunsten der zwei aktiveren Modi Modus 1 mit vielen kurzen und Modus 2 mit sehr langen Kanalöffnungen [26].

Interessanterweise beobachteten Schröder et al. in ihren Untersuchungen am Einzelkanal von Rattenventrikelzellen bei β_2 -adrenerger Kanalstimulation eine Zunahme der mittleren Offenzeiten nicht wie bei β_1 -adrenerger Stimulation über eine Abnahme der Geschlossenzeiten, sondern über eine Abnahme der aktiven sweeps mit sehr kleiner mittlerer Offenwahrscheinlichkeit. Dieses weist auf einen qualitativen Unterschied zwischen β_2 -adrenerger Kanalaktivierung und dem klassischen cAMP-abhängigen Mechanismus hin. Da über β_2 -adrenerge Rezeptoren auch Pertussistoxin-sensitive G-Proteine aktiviert werden, welche wiederum die Adenylatcyclase inhibieren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine β_2 -adrenerge Stimulation möglicherweise über PTX-sensitive G-Proteine zu einer Proteinphosphatase Typ 2a-Aktivierung führt, welche dann mit der cAMP-abhängigen Phosphorylierung an nur einer von mehreren regulatorischen Seiten des Calciumkanals interferiert [27].

Muskarinerge Stimulation und Freisetzung von Acetylcholin sowie NO über cGMP senken den L-Typ-Calciumkanal-Strom nach vorheriger β -adrenerger Stimulation [23, 24]. Herzig et al. legten nach Ganzzellmessungen an isolierten Meerschweinchenventrikelzellen die Vermutung nahe, dass möglicherweise eine Stimulation von Proteinphosphatase Typ 2a Teil der Signaltransduktionskaskade der L-Typ-Calciumkanal-Hemmung durch Acetylcholin sei [24]. Kanaldephosphorylierung durch Phosphatasen führt zur Inaktivierung und damit einer Abnahme der Kanalaktivität, ersichtlich in einer Abnahme von mittlerer Offenwahrscheinlichkeit und Verfügbarkeit. Dabei sahen Wiechen et al. in ihren Einzelkanalmessungen an Meerschweinchenventrikelzellen Hinweise auf einen Angriff der verschiedenen Phosphatasen an verschiedenen Phosphorylierungsorten für verschiedene Effekte. So führte der Proteinphosphatase Typ 2a-prävalente Inhibitor Okadasäure zu einer Zunahme der Calciumkanal-Aktivität besonders durch Erhöhung der mittleren Offenzeiten, während bei dem Protein-

phosphatase Typ 1-prävalenten Calyculin A ein deutlicher Anstieg der Kanalverfügbarkeit zu erkennen war [21].

In Einzelkanalmessungen an Ventrikelzellen transgener Mäuse mit Überexpression von Proteinkinase G1 (PKG1) fanden Schröder et al. eine Verstärkung der inhibitorischen NO/cGMP-Wirkung auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität. Sie stellten die Vermutung auf, dass PKG1 ein Ziel für NO aber nicht für den muskarinergen Rezeptor darstellt [23]. Klein et al. kamen nach Experimenten mit dem PKG-Aktivator 8Br-cGMP und dem PKG-Inhibitor RP-8Br-PET-cGMPS nach vorheriger Aktivierung der cAMP/PKA-Kaskade zu dem Schluss, dass die PKG mit PKA interagiert. Da eine aktivitätsmindernde Wirkung von PKG nur nach vorheriger β -adrenerger bzw. PKA-Stimulation zu erkennen war, wurde vermutet, dass die PKG distal der Adenylatcyclase mit dem β -adrenergen Signalübertragungsweg interagiert [22].

Aktivierung von α_1 -, Endothelin- oder Angiotensin₁-Rezeptoren führt zu einer G_q-Stimulation mit folgender Aktivierung von Phospholipase C, was wiederum eine Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) nach sich zieht. Es wurde angenommen, dass diese nach Bindung eines RACK-Proteins in der Nachbarschaft dann den Kanal durch Phosphorylierung aktiviert. Da PKC und PKA zum Teil dieselben Kanaluntereinheiten als Substrat nutzen, wurde ein „Crosstalk“ zwischen ihnen postuliert. Interessanterweise kann eine PKC-Aktivierung, abhängig von den untersuchten Zellen und Versuchsbedingungen, sowohl zu Kanalaktivierung als auch -inhibition führen. So wirken α_1 - und β -adrenerge Stimulation des L-Typ-Calciumkanal-Stroms nicht einfach additiv. α_1 -Adrenerge Stimulation mindert den durch β -adrenerge Stimulation erzeugten Anstieg des L-Typ-Calciumkanal-Stroms. Auch Aktivierung von ET- und AT₁-Rezeptoren, welche mit einer PKC-Stimulation assoziiert sind, antagonisieren den β -adrenergen Effekt auf den L-Typ-Calciumkanal [3].

1.3 Rolle der Tyrosinkinasen bei der Regulation des L-Typ-Calciumkanals

Auch Tyrosinkinasen sind als wichtige Regulatoren des L-Typ-Calciumkanal-Stroms in verschiedenen Zelltypen erkannt worden [28-34]. Der Effekt von Tyrosinkinasen auf das Schaltverhalten des L-Typ-Calciumkanals in intakten humanen atrialen Kardiomyozyten ist derzeit nicht geklärt.

Tyrosinkinasen werden in zwei generelle Gruppen eingeteilt: Membran-gebundene Tyrosinkinasen mit Rezeptor-vermitteltem Wirkmechanismus und lösliche, zytosolische Tyrosinkinasen. Darunter sind auch Membran-assoziierte Tyrosinkinasen wie die der Src- und Jak-Familie, die nach ihrer Aktivierung von der Membran dissoziieren können und zytosolische Signalmechanismen beeinflussen [28]. Im Weiteren erfolgt eine Einordnung der Tyrosinkinasen in Subfamilien [35]. Eine Auswahl repräsentativer Subfamilien der Tyrosinkinasen beim Menschen zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2:

Subfamilien Rezeptor-gebundener Tyrosinkinasen			Subfamilien zytosolischer Tyrosinkinasen	
-ALK	-MUSK	-RYK	-ABL	-FRK
-DDR	-PDGFR	-TIE	-ACK	-JAK
-EGFR	-PTK7	-TRK	-CSK	-SRC
-EPHR	-RET	-VEGFR	-FAK	-SYK
-FGFR	-ROR	-AATYK	-FES	-TEC
-INSR	-ROS			

Tab. 2: *Aufführung ausgewählter Subfamilien der humanen Rezeptor-gebundenen und zytosolischen Tyrosinkinasen.*

Abkürzungen: ALK=anaplastic lymphoma kinase, DDR=discoidin domain receptor, EGFR=epidermal growth factor receptor, EPHR=ephrin receptor, FGFR=fibroblast growth factor receptor, INSR=insulin receptor, MUSK=muscle specific kinase, PDGFR=platelet-derived growth factor receptor, PTK7=protein tyrosine kinase 7, RET=rearranged during transfection, ROR=receptor orphan, ROS=reactive oxygen species, RYK=related to tyrosine kinase, TIE=tyrosine kinase receptor in endothelial cell types, TRK=tropomyosin-related kinase, VEGFR=vascular endothelial growth factor receptor, AATYK=apoptosis-associated tyrosine kinase. ABL=Abelson kinase, ACK=activated Cdc42-associated kinase, CSK=carboxyterminal Src-kinase, FAK=focal adhesion kinase, FES=feline sarcoma, FRK=Fer-related kinase, JAK=Janus kinase, SRC=sarcoma, SYK=spleen tyrosine kinase, TEC=tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma.

Tyrosinkinasen dienen der intrazellulären Signaltransduktion, welche vermittelt wird durch verschiedene Hormon- und Wachstumsfaktorrezeptoren der Zelloberfläche, wie z.B. den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor, den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor IGF-1 oder den AngiotensinII-Typ1-Rezeptor [36-39]. Dabei spielen die Tyrosinkinasen in vielen Zellen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle diverser Aspekte von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellteilung [40]. Zusätzlich haben Tyrosinkinasen bei verschiedenen Zelltypen einen kurzzeitigen Effekt auf transmembranäre Ionenströme. In Kardiomyozyten sind die Tyrosinkinasen involviert in die Regulation von transmembranären Ionenflüssen, insbesondere bei der Feineinstellung des sarkoplasmatischen L-Typ-Calciumkanal-Stroms [28-34].

Tyrosinkinasen phosphorylieren die kanalformende α_1 -Untereinheit von L-Typ-Calciumkanälen direkt [41] und beeinflussen den L-Typ-Calciumkanal-Strom indirekt durch Modulation diverser Signaltransduktionswege einschließlich Signaltransduktion durch Adrenorezeptoren und Proteinkinase C (PKC) [33, 34, 42].

In humanen Vorhofkardiomyozyten steigert die Inhibition von Tyrosinkinasen den L-Typ-Calcium-Strom auf Ganzzelebene [32]. Dieser Effekt wird gesteigert durch Aktivierung von PKC, welche wiederum befähigt ist, die α_1 - und β -Untereinheiten des L-Typ-Calciumkanals zu phosphorylieren [43]. Aktivierung von PKC verursacht Arrhythmien [44], und PKC-Isoformen sind Mediatoren bei der Entwicklung der myokardialen Hypertrophie [45, 46]. Zusammen sind Tyrosinkinasen ebenso wie PKC in die ischämische Präkonditionierung involviert [47].

Frühere Studien über die Rolle von Tyrosinkinasen bei der Kontrolle von L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in Herzmuskelzellen haben widersprüchliche Ergebnisse geliefert, und es stellte sich heraus, dass die Tyrosinkinase-Effekte abhängig sind von der untersuchten Spezies und der verwendeten Art der Zellpräparation [28-34].

Für unsere Studie wurde vorausgesetzt, dass Tyrosinkinasen das Schaltverhalten von Einzel-L-Typ-Calciumkanälen durch Modulation von Verfügbarkeit und/oder Kanaloffenwahrscheinlichkeit beeinflussen.

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Wir verwendeten die cell-attached Einzelkanal-Patch-Clamp-Technik an humanen atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Operationen am offenen Herzen

- 1) um die Rolle von Tyrosinkinasen bei der Kontrolle der Einzel-L-Typ-Calciumkanal-Aktivität zu untersuchen,
- 2) um mögliche Untergruppen von Tyrosinkinasen zu identifizieren, die die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität kontrollieren,
- 3) um potentielle Zusammenhänge zwischen Tyrosinkinasen und Proteinphosphatasen, Proteinkinase A und Proteinkinase C zu erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Patch-Clamp-Methode

Bereits um 1969/70 gelang mit Hilfe der sog. Black-Film-Technik die Beobachtung erster Ionenkanäle in künstlichen Membranen. Allerdings handelte es sich bei diesen sog. Gramicidinkanälen nicht um die gleichen Kanäle, die den elektrischen Phänomenen in erregbaren Zellen zugrunde liegen. Die Messung von Ionenkanaleigenschaften in Membranen erregbarer Zellen mit Hilfe der sog. Rauschanalyse wurde erstmals 1972 von B. Katz und R. Miledi durchgeführt. Die direkte Beobachtung einzelner Kanäle gelang erst E. Neher und B. Sakmann 1975/76 mit Hilfe der auch von uns verwendeten Patch-Clamp-Technik. Bei dieser unterscheidet man verschiedene Konfigurationen wie z.B. die whole-cell, cell-attached, inside-out oder outside-out Konfiguration [48].

Die für diese Studie geeignete ist dabei die sog. cell-attached Konfiguration, bei der man die Membran unter der Pipettenöffnung intakt lässt und die sehr dünne Pipette dem einzelnen Ionenkanal quasi überstülpt. Durch die intakte Zellmembran bleiben die intrazellulären Ionenkonzentrationen und besonders alle intrazellulären Proteine und Substrate unbeeinflusst [49], was gerade für die Experimente der vorliegenden Arbeit von besonderem Vorteil ist. Man ermittelt so den unmittelbaren Beitrag einzelner Kanäle. Da der Ganzzellcalciumstrom (I) sich anhand der Formel $I = n \cdot i \cdot p_o \cdot f_a$ errechnet, sind folglich nicht nur die Kanalzahl (n), sondern auch die individuellen Eigenschaften des einzelnen Kanals, wie Einzelkanalstrom (i), Offenwahrscheinlichkeit (p_o) und Verfügbarkeit (f_a) für die Definition des Ganzzellcalciumstroms von Bedeutung.

Die Kanalströme werden am Oszilloskop sichtbar gemacht. Dabei sind die Kanalstromaufnahmen mit Öffnungen charakterisiert durch rechteckige Ausschläge von der Null-Strom-Basislinie. Die Rechteckform der gemessenen Ströme folgt aus dem Alles-oder-Nichts-Prinzip, dem die Übergänge zwischen offenem, Ionen-leitendem und geschlossenem Zustand folgen. Die Ausschläge sind bei Potentialen unter dem Umschlagpotential nach innen gerichtet und haben eine Einheitsamplitude, wenn sich nur ein Kanal im Patch findet. Bei Doppelkanälen erzeugen simultane Öffnungen Kanalströme mit zweifacher Einheitsamplitude [48].

2.2 Materialgewinnung

Das Gewebe wurde von Patienten entnommen, die sich aufgrund einer KHK, eines Aortenaneurysmas oder eines Klappenvitiums einer kardiochirurgischen Operation mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine unterziehen mussten.

Dabei wurde ein zum Anschluss der Maschine entferntes Stück des Auriculum dextrum in einem mit ca. 40 ml auf 4 °C gekühlter Lösung A (s. Kap. 2.5.1, Tabelle 3) gefüllten Greiner-Röhrchen aufgefangen und zur weiteren Bearbeitung unverzüglich auf Eis ins Labor transportiert.

Die Patienten wurden 24 Stunden vor Stattfinden des operativen Eingriffs über die Gewebentnahme aufgeklärt und erteilten mit ihrer Unterschrift ihr Einverständnis. Eine entsprechende Genehmigung der Ethikkommission liegt vor (Nr. 2374-2000).

2.3 Patientenprotokolle

Protokolliert wurden jeweils Alter, Geschlecht und die vorliegende Operationsindikation. Des Weiteren wurden die Befunde folgender präoperativer Untersuchungen festgehalten: EKG (mit Rhythmus, Lagetyp, Herzfrequenz und eventuellen pathologischen Auffälligkeiten), Linksherzkatheter (mit Ventrikelgröße, -kontraktilität, Auswurffraktion, Beurteilung von Klappenfunktion und Klappenöffnungsfläche, Beschreibung von Aorta und der Koronargefäße) und, falls vorhanden, Ergebnisse der Echokardiographie. Außerdem wurden kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und eine positive Familienanamnese protokolliert. Die präoperative Medikation bzw. die Medikation während der Operation bis zum Anschluss der Herz-Lungen-Maschine wurde ebenfalls festgehalten.

2.4 Ausschlusskriterien

Voraussetzungen für den Ausschluss aus der untersuchten Patientengruppe waren:

1. kardiale Auswurfraction < 35 %
2. Vorhofflimmern

Ausschlaggebend für die Aufnahme in die Versuchsgruppe waren die Ergebnisse von EKG, Herzkatheteruntersuchung und/oder Echokardiographie.

2.5 Eingesetzte Lösungen und Substanzen

2.5.1 Lösungen

Im folgenden Abschnitt sind die verwendeten Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung aufgeführt.

1. Lösung A: pH 7,4 mittels 1 M NaOH

Tabelle 3: Zusammensetzung der eingesetzten Lösung A

Substanz	NaCl	KCl	MgSO ₄	Glucose	Taurin	MOPS
Endkonzentration in mM	100	10	5	20	50	5

2. Lösung B: pH 7,4 mittels 1 M KOH

Tabelle 4: Zusammensetzung der eingesetzten Lösung B

Substanz	K-Glutamat	KCl	KH ₂ PO ₄	Taurin	MgCl ₂	HEPES	EGTA	Glucose	KOH
Endkonzentration in mM	50	40	20	20	3	10	5	10	20

3. Kalium-depolarisierende Badlösung: pH 7,3 mittels 1 M KOH

Tabelle 5: Zusammensetzung der eingesetzten Kalium-depolarisierenden Badlösung

Substanz	KCl	HEPES	MgCl ₂	CaCl ₂	K-Glutamat	EGTA	Na ₂ -ATP	Glucose
Endkonzentration in mM	25	10	2	1	120	2	1	10

4. Pipettenlösung: pH 7,4 mittels 1 M TEA-OH

Tabelle 6: Zusammensetzung der eingesetzten Pipettenlösung

Substanz	BaCl ₂	Saccharose	HEPES
Endkonzentration in mM	70	110	10

Alle Lösungen wurden mit destilliertem, entionisiertem und autoklaviertem Wasser hergestellt.

5. Enzymlösung I: gelöst in 10 ml Lösung A bei 37,5 °C

Tabelle 7: Zusammensetzung der eingesetzten Enzymlösung I

Substanz	BSA	Kollagenase	Protease
Menge in mg/ml	10	1,3	0,5

6. Enzymlösung II: gelöst in 10 ml Lösung A bei 37,5 °C

Tabelle 8: Zusammensetzung der eingesetzten Enzymlösung II

Substanz	BSA	Kollagenase
Menge in mg/ml	1	0,43

BSA: Bovines Serum Albumin
Sigma, Deutschland

Kollagenase: 232 U/mg Typ CLS 1
Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, CA, USA

Protease: 9,91 U/mg Typ XXIV
Sigma, Deutschland

2.5.2 Substanzen

Es folgt eine kurze Übersicht über die in unseren Experimenten eingesetzten Substanzen.

1. BIS: Bisindolylmaleimid
MG 412,5
Calbiochem, US and Canada
als 10^{-4} Lösung gelöst in DMSO
in 100 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-6} M

2. bpVanadat: [Potassium-bisperoxo(1,10-phenantroline)oxovanadat (V)]
MG 404,3
Calbiochem, US and Canada
als 10^{-5} Lösung gelöst in H₂O
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-7} M

3. 8Br-cAMP: 8- Bromoadenosin 3': 5'-cyclo-Monophosphat
MG 430,10
Sigma, Deutschland
als 10^{-1} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-3} M

4. Genistein: MG 270,20
Sigma, Deutschland
als $5 \cdot 10^{-3}$ Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung $5 \cdot 10^{-5}$ M

5. Okadasäure: MG 822,04
Calbiochem, US and Canada
als 10^{-4} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-6} M
6. PMA: Phorbol-12- Myristat-13- Acetat
MG 616,8
Calbiochem, US and Canada
als 10^{-3} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-5} M
7. PP1: 4-Amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]
pyrimidin
MG 281,4
Biomol, USA
als 10^{-3} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-5} M
8. PP3: 4-Amino-7-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin
MG 211,2
Calbiochem, US and Canada
als 10^{-3} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-5} M

9. Rp-8-CPT-cAMPs: 8-(4-Chlorophenylthio)adenosin-3',5'-cyclo-
Monophosphorothioat, RP-isomer
MG 509,9
Sigma, Deutschland
als 10^{-3} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-5} M
10. Staurosporin: MG 466,5
Sigma, Deutschland
als 10^{-5} Lösung gelöst in DMSO
in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert
Endkonzentration nach Zugabe in Badlösung 10^{-7} M

Die folgende Tabelle fasst die Wirkungen der eingesetzten Substanzen auf die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme zusammen.

Tabelle 9:

eingesetzte Substanz	Wirkung	zu untersuchendes Enzym
Genistein	Inhibition	Tyrosinkinase
PP1	Inhibition	Src-Tyrosinkinase
PP3	*	
bpVanadat	Inhibition	Tyrosinphosphatase
8Br-cAMP	Aktivierung	Proteinkinase A
Rp-8-CPT-cAMPs	Inhibition	Proteinkinase A
Okadasäure	Inhibition	Proteinphosphatase
PMA	Aktivierung	Proteinkinase C
Staurosporin	Inhibition	Proteinkinase C
BIS	Inhibition	Proteinkinase C

Tab. 9: Auflistung der in den durchgeführten Experimenten eingesetzten Testsubstanzen und ihrer Wirkung auf das zu untersuchende Enzymsystem. * PP3 ist ein inaktives PP1-Analogon.

2.6 Apparativer Aufbau der Patch-Clamp-Anlage

Zubehör:

1. Patch-Clamp-Verstärker: Axopatch 200 B (Axon Instruments, Foster City, CA, USA)
2. Mikroskop: Axiovert 35 Invertmikroskop (Zeiss, Deutschland), ermöglicht 50fache, 100fache und 320fache Vergrößerung
3. Mikromanipulator hydraulisch/mechanisch: (Narishige, Japan), ermöglicht die Pipettenbewegung in drei Dimensionen
4. Spülsystem: Eigenherstellung, ermöglicht Zuführung von Badlösung mittels Infusionssystem und Absaugung über eine mittels Schlauchsystem an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Injektionsnadel
5. Ag-Ag-Cl-Badelektrode: Eigenherstellung aus Silberdraht
6. Vorverstärker mit Pipettenhalter: Headstage CV 203 BU mit HL-U pipette holder (Axon Instruments, USA)
7. Analog/Digital Wandler: Digi Data 1200 Series Interface (Axon Instruments, USA)
8. Software für die Datenaufnahme und -auswertung: PClamp Version 6.0.3 (Axon Instruments, USA)
9. Personalcomputer: Pentium 2 MMX CPU, 300 MHz, 32,0 MB RAM, 3,99 GB Hard Disc
10. Batterie: 12 V, 88 Ah, 640 A, gewährleistet Stromversorgung der Mikroskoplampe
11. Lufthydraulisch schwingungsgedämpfter Tisch mit Metallplatte: (Luigs & Neumann, Deutschland), vermindert Anfälligkeit der Anlage gegen Vibrationen, trägt Mikroskop, Mikromanipulator, Vorverstärker mit Pipettenhalter, Batterie und Spülsystem
12. Faradaykäfig: Eigenherstellung, umschließt Arbeitsgeräte auf dem Tisch zur Abschirmung elektromagnetischer Störwellen

Abbildung 2:

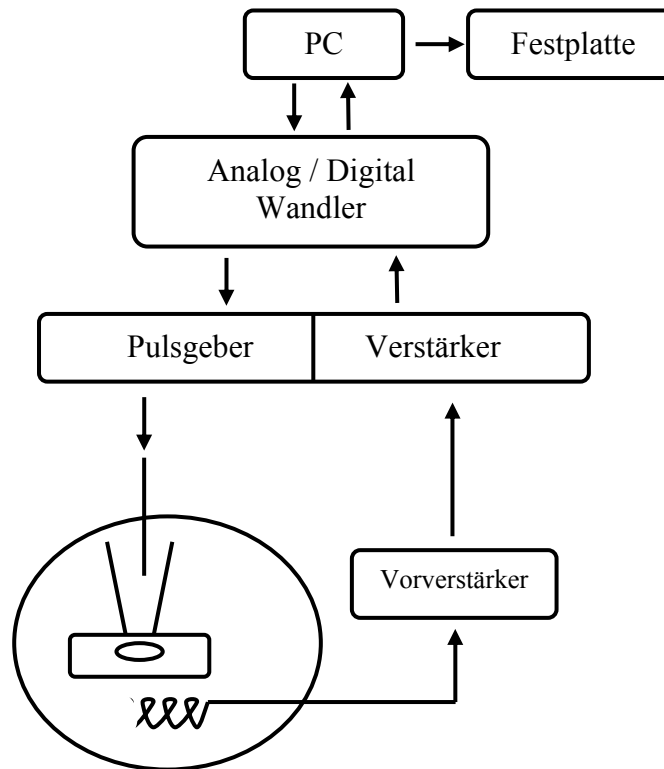


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Über den PC wurde die Pulsvorgabe eingegeben, in einen analogen Reiz umgewandelt und dann über den Pulsgeber an die Zelle geleitet. Die Antwortweiterleitung erfolgte über die Badelektrode an den Vorverstärker und von dort weiter zum Verstärker. Im Anschluss wurde die Antwort digitalisiert, auf dem Bildschirm sichtbar gemacht und gespeichert.

Abbildung 3:

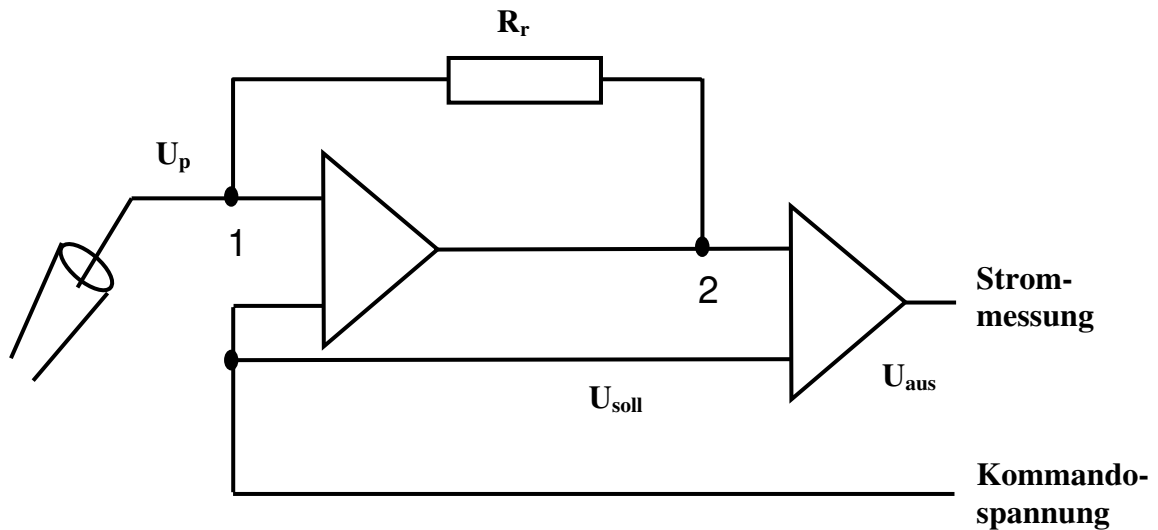


Abb. 3: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp-Verstärkers. Der Versuchsdurchführende gibt die Kommandospannung vor. Im Verstärker wird über einen ständigen Rückkopplungsmechanismus die Differenz zwischen aktuellem Membranpotential ($=U_p$) und Kommandopotential ($=U_{soll}$) bestimmt. Die beiden Eingänge messen die anliegende Spannung, am Ausgang liefert der Verstärker eine Spannung (U_{aus}) proportional zur Differenz der Eingangsspannungen. Am dafür notwendigen Rückkopplungswiderstand R_f liegt immer eine Spannung an, die proportional zum Strom zwischen Punkt 1 und Punkt 2 ist und so die Differenz zwischen Membran- und Kommandopotential ausgleicht. Dieser Abgleich erfolgt so schnell, dass die Höhe des Pipettenpotentials der Kommandospannung praktisch gleichkommt.

(Abbildung modifiziert nach Numberger und Draguhn, 1996)

2.7 Versuchsdurchführung

2.7.1 Präparation und enzymatische Isolation der humanen Vorhofmyozyten

Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind in Kap. 2.5.1 angeführt.

Das Gewebe wurde sofort nach Entnahme in einem mit ca. 40 ml auf 4°C gekühlter und zuvor oxygenisierter Lösung A gefüllten 50 ml Greiner-Röhrchen aufgefangen und umgehend auf Eis ins Labor transportiert. Dort wurde das Herzohr in ein mit Lösung A (Raumtemperatur) gefülltes Petrischälchen gegeben, mit Lösung A gespült, mittels Schere und Pinzette von umgebendem Fettgewebe und Epikard befreit und sorgfältig zerkleinert.

Danach wurde das zerkleinerte Gewebe zum Enzymansatz I gegeben und 35 min. bei 37,5 °C im Wärmebad (GFL, Deutschland) unter Schütteln und Rühren inkubiert.

Nach 35 min. wurde die Inkubation durch Zugabe von 30 ml Lösung A (Raumtemperatur) gestoppt, und das Gewebe wurde für 15 min. sedimentiert.

Nach Absetzen des Gewebes wurde der Überstand abgesaugt und die zweite Inkubation durch Zugabe des Gewebes zum Enzymansatz II bei 37,5 °C unter Schütteln und Rühren gestartet. Dabei wurde nach einer Dauer von 7,5 min. jede Minute der Isolationserfolg unter dem Mikroskop beurteilt und bei einer optimalen Zellausbeute die Inkubation durch Zugabe von wiederum 30 ml Lösung A (Raumtemperatur) beendet.

Nach Absetzen des Gewebes nach weiteren 15 min. wurde erneut der Überstand abgesaugt und durch 15 ml Lösung B (Raumtemperatur) ersetzt.

Anschließend wurden die Kardiomyozyten durch wiederholtes vorsichtiges Ansaugen der Gewebeteilchen mit Hilfe einer umgedrehten 5 ml Pipette von den Gewebefragmenten gelöst.

Nach Zugabe von 20 µl 10⁻² M BAPTA-AM (intrazellulärer Calciumchelator; Senkung des intrazellulären Calciumspiegels auf in allen Zellen gleiches Niveau, Verhinderung der Zellkontraktion) auf 20 ml Zellsuspension und 15 min. Inkubationszeit wurde mit der Messung begonnen.

2.7.2 Herstellung der Pipetten

Die für die Messungen erforderlichen Pipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (Länge ca. 80 mm, Innendurchmesser 1,13 mm, Wanddicke 0,28 mm; Hilgenberg, Deutschland) hergestellt. Dabei wurden zunächst mit einem Pipettenziehgerät (Model PP-830, Narishige, Japan) zwei Pipetten gezogen. Diese wurden anschließend unter Lupenvergrößerung mit Silikon (Sylgard 184 Base: Sylgard 184 Curing Agent = 9 : 1, Dow Corning GmbH, Deutschland) beschichtet und das Silikon mittels eines stromführenden Widerstandsdrahtes (Eigenherstellung) gehärtet. Dann wurden in einem letzten Schritt die Pipettenspitzen in einer so genannten Pipettenschmiede (Model MF-830, Narishige, Japan) unter 400facher Vergrößerung durch Annäherung an einen stromführenden Widerstandsdraht poliert.

Die Befüllung der Pipetten mit Pipettenlösung erfolgte unmittelbar vor Messbeginn mit Hilfe eines Pipettenfüllers (Eigenherstellung, s.u.). Nach Fertigstellung und Füllung mit Pipettenlösung betrug der Eigenwiderstand der Pipetten 4,5-7,5 M Ω .

2.7.3 Messung von Einzelkanalströmen

Vor Beginn der Messungen erfolgte die Zellaussaat. Dafür wurden zunächst ca. 400-500 μ l der Zellsuspension in ein Einmal-Petrischälchen (Durchmesser 35 mm; Sarstedt, Newton, NC), welches direkt in eine passende Ausfräsung im Objektisch des Mikroskops gesetzt wurde, pipettiert. Mittels des Spülsystems wurden die Zellen mit Kalium-depolarisierender Badlösung gewaschen (Zufuhrgeschwindigkeit ca. 1-2 ml/min.) und der Flüssigkeitsspiegel im Schälchen auf ca. 2 ml abgesaugt. Die Ag-Ag-Cl-Badelektrode wurde in die Messkammer eingesetzt.

Die Messung der Calciumkanalströme erfolgte in der single channel cell attached- Konfiguration der Patch-Clamp-Technik mit Hilfe des Programms Clampex (PCLamp, Axon Instruments, USA). Eine Pipette wurde mit Hilfe des Pipettenfüllers (Eigenherstellung aus 10 ml Spritze, 0,2 μ m Sterifix-Injektionsfilter (Braun Melsungen AG, Deutschland) und selbst ausgezogenen 100 μ l Eppendorfpipettenspitzen (Sarstedt, Deutschland)) mit Pipettenlösung gefüllt und auf den dafür vorgesehenen Halter des Vorverstärkers gesetzt. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde dann die Pipettenspitze unter dem Mikroskop an den ausgewählten

Kardiomyozyten herangeführt. Dabei wurde der Widerstand im Messkreis mittels eines repetitiven, 50 ms dauernden und 5 mV starken, rechteckförmigen Kommandospannungspulses kontrolliert. Nach Kontaktherstellung zwischen Pipettenspitze und Zelle wurde durch Auslösung von leichtem Unterdruck die Zellmembran behutsam bis zur Bildung eines so genannten Gigaseals in die Pipettenspitze eingesaugt. Der Widerstand zwischen Badelektrode und Pipette stieg dabei auf 15-70 G Ω .

Nun wurden repetitive Spannungsimpulse mit einer Frequenz von 1,66 Hz und einer Dauer von 150 ms ausgelöst, aufgenommen bei 10 kHz Abtastfrequenz und tiefenpaßgefiltert bei 2 kHz (-3 dB, 4-Pol Bessel). Als Ladungsträger dienten die Bariumionen der Pipettenlösung. Es folgte die Prüfung auf Vorhandensein eines L-Typ-Calciumkanals. Dies geschah unter Kontrollbedingungen, ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV und einem Testpotential von +20 mV. Bei diesen Potentialen ist die höchste Verfügbarkeit des Kanals zu erwarten, die Stromamplitude beträgt dabei für eine Öffnung ca. -0,7 pA.

Jeweils 60 Pulsvorgänge des gleichen Pulsprotokolls wurden in einer Datei (Trial) gespeichert und ausgewertet.

Abbildung 4 auf der folgenden Seite zeigt eine schematische Darstellung einer Einzelkanalstrommessung in der cell-attached Konfiguration.

Abbildung 4:

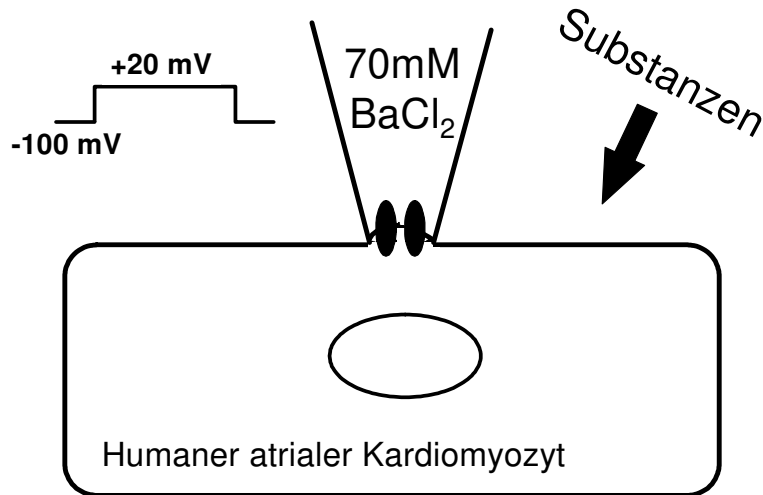


Abb. 4: Schematische Darstellung der Einzelkanalmessung in der cell-attached Konfiguration unter Kontrollbedingungen, ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV und einem Testpotential von $+20\text{ mV}$. Eine mit Pipettenlösung gefüllte Pipette ist dem L-Typ-Calciumkanal übergestülpt, die Zellmembran unter der Pipettenöffnung bleibt intakt. Die Zugabe der eingesetzten Substanzen erfolgt in den Extrazellularraum.

2.8 Auswertung

2.8.1 Erstellen der Ereignislisten

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Fetchan (PCLamp, Axon Instruments, USA). Dabei wurden nur die Kanäle ausgewertet, die über mindestens 120 Depolarisationsdurchläufe (Episoden) zu beobachten waren. Zur Korrektur der Originalregistrierungen um Leckstrom und Kapazitätstransienten wurden die nicht-aktiven Episoden einer Datei gemittelt und die resultierende Kurve von allen Episoden subtrahiert.

Im nächsten Schritt wurden die Registrierungen idealisiert. In einer Episode mit ausreichend langen Kanalöffnungen wurde durch das Legen von zwei Geraden eine Einheitsamplitude festgelegt. Dabei beschrieb die erste Gerade als Basislinie den geschlossenen Zustand des Kanals, während die zweite Gerade durch die Amplitude der längeren Öffnungen bestimmt wurde. Fiel nun die Stromkurve unter eine gedachte Linie auf halber Höhe zwischen Basislinie und Einheitsamplitude ab, so wurde dies als Öffnung angenommen. Ein Anstieg der Stromkurve über diese Linie galt als Kanalschließung. Auf diese Weise wurde das Kanalschaltverhalten über die Zeit registriert und in Ereignislisten archiviert.

2.8.2 Auswertung der Ereignislisten

Die Berechnung und Auswertung der in den Ereignislisten enthaltenen Parameter erfolgte mit Hilfe eigens dafür erstellter Programme. Dabei wurden zur Bestimmung bestimmter Parameter nur Registrierungen einzelner Kanäle herangezogen, für einige Parameter konnten auch die Daten von Doppelkanalaufzeichnungen herangezogen werden. Deren Ergebnisse wurden dafür mit Hilfe bestimmter Formeln korrigiert. Registrierungen von Drei- und Mehrfachkanälen gingen nicht in die Resultate der Ergebnisse ein.

Folgende Parameter ließen sich aus den Ereignislisten ersehen:

Verfügbarkeit [%]: Die Verfügbarkeit bezeichnet den Anteil der Episoden, in denen der Kanal aktiv ist.

Sie errechnet sich durch Division der Episoden mit Kanalaktivität durch die Anzahl aller Episoden der entsprechenden Dateien (Trials).

Bei Doppelkanalaufzeichnungen wurde sie korrigiert mit Hilfe der Formel:

$$\sqrt[n]{1 - \text{Verfügbarkeit}_{\text{(nicht korrigiert)}}} = 1 - \text{Verfügbarkeit}_{\text{(korrigiert)}}$$

Mittlere Offenwahrscheinlichkeit [%]:

Die mittlere Offenwahrscheinlichkeit ist der Anteil der Dauer für die der Kanal bei verfügbaren Episoden geöffnet ist. Sie errechnet sich durch Division der gesamten Offenzeit durch das Produkt aus verfügbaren Episoden und der Zeitdauer einer Episode (150 ms).

Bei Doppelkanalaufzeichnungen wird sie berechnet aus der Formel:

$$\frac{\Sigma \text{Offenzeiten [ms]}}{n \times \text{Verfügbarkeit}_{(\text{korrigiert})} \times \text{Anzahl der Durchläufe} \times 150}$$

Mittlerer Kanalstrom [fA]:

Der mittlere Kanalstrom ist der Strom, der im Mittel pro Episode durch den Kanal fließt. Er errechnet sich durch Division der Summe aller Kanalströme durch die Anzahl aller Episoden der entsprechenden Dateien.

Spitzenstrom [fA]:

Der Spitzenstrom bezeichnet den höchsten Punkt des durchschnittlichen Kanalstromes. Er wurde graphisch ermittelt.

Bei Doppelkanalaufzeichnungen wurde das Ergebnis korrigiert durch Division des abgelesenen Wertes durch zwei.

Inaktivierung [%]:

Die Inaktivierung beschreibt den Anteil, um den der Maximalstrom bis zum Ende der Episoden abnimmt.

Er errechnet sich anhand folgender Formel:

$$\frac{\text{Maximalstrom} - \text{Minimalstrom} \times 100}{\text{Maximalstrom}}$$

Latenzphase [ms]: Unter Latenzphase versteht man die Zeit zwischen Beginn des Depolarisationsimpulses und erster Kanalöffnung.

Mittlere Latenzphase [ms]:

Die mittlere Latenzphase beschreibt die durchschnittliche Dauer vom Beginn einer Episode bis zur ersten Kanalöffnung. Sie berechnet sich durch Division der Summe aller Latenzphasen durch die Anzahl der verfügbaren Episoden.

Offenzeit [ms]: Als Offenzeit bezeichnet man die Dauer einer Kanalöffnung.

Gesamte Offenzeit [ms]:

Unter gesamter Offenzeit versteht sich die Summe der Dauer aller Kanalöffnungen.

Mittlere Offenzeit [ms]:

Als mittlere Offenzeit bezeichnet man die durchschnittliche Dauer der Kanalöffnungen. Sie errechnet sich aus dem Quotienten aus gesamter Offenzeit und der Anzahl aller Kanalöffnungen der entsprechenden Dateien.

Modus 2 [%]:

Unter Modus 2-Schaltverhalten versteht man das Auftreten von Kanalöffnungen mit einer Öffnungsdauer > 4 ms. % Modus 2 beschreibt den Anteil von Episoden mit Öffnungszeiten > 4 ms.

Geschlossenzeit [ms]:

Die Geschlossenzeit ist die Dauer, die der Kanal zwischen zwei Öffnungen geschlossen ist.

Da die Geschlossenzeiten einer biexponentiellen Verteilung folgen und sich in kurze und lange Geschlossenzeiten gliedern, gibt es sowohl eine Konstante für kurze Geschlossenzeiten:

τ kurze Geschlossenzeiten wie auch für lange Geschlossenzeiten: τ lange Geschlossenzeiten.

Berechnet wurde außerdem der Anteil der kurzen Geschlossenzeiten: Proportion kurze Geschlossenzeiten.

Gesamte Geschlossenzeit [ms]:

Die gesamte Geschlossenzeit beschreibt die Summe der Dauer aller Schließungen zwischen zwei Kanalöffnungen über alle Episoden der entsprechenden Dateien.

Mittlere Geschlossenzeit [ms]:

Unter mittlerer Geschlossenzeit versteht man die durchschnittliche Dauer der Kanalschließungen zwischen zwei Öffnungen.

Sie ergibt sich aus dem Quotienten aus gesamter Geschlossenzeit und der Anzahl aller Schließungen der entsprechenden Dateien.

Aktivitätsdauer [ms]: Als Aktivitätsdauer bezeichnet man die durchschnittliche Dauer von Beginn der ersten bis zum Ende der letzten Öffnung der verfügbaren Episoden der entsprechenden Dateien.

Sie wird berechnet aus der Formel:

$$\frac{\Sigma \text{Offenzeiten [ms]} + \Sigma \text{Geschlossenzeiten [ms]}}{\text{Anzahl der aktiven Depolarisationsdurchläufe}}$$

2.9 Mathematische Auswertung und statistische Verfahren

Die L-Typ-Calciumkanal-Registrierungen wurden als unabhängige Beobachtungen angenommen und ausgewertet.

Nichtlineare Regressionsanalysen zur Auswertung von Offen- und Geschlossenzeitdiagrammen und Amplitudenhistogrammen wurden mit dem Programm PStat (PClamp, Axon Instruments, USA) erstellt.

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms InStat (ISI, USA) im ungepaarten oder gepaarten zweiseitigen t-Test.

Zur Auswertung der Versuchsreihen von BIS, bpVanadat, Genistein, Okadasäure, PMA, PP1, PP3, Rp-8-CPT-cAMPs und Staurosporin wurde mit Hilfe des gepaarten zweiseitigen t-Tests gearbeitet, lediglich bei den Versuchen, in denen sequentiell zwei Substanzen gegeben wurden, wurde ein ONE WAY ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test durchgeführt.

Die Mittelwerte sind als arithmetische Mittel, die Abweichungen als Standardfehler (SEM) dargestellt. Signifikante Unterschiede werden angenommen, wenn $p < 0,05$ ist.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Die Daten der eingeschlossenen Patienten sind in der folgenden Tabelle aufgestellt.

Tabelle 10:

n=	OP-Datum	Initialen	Geschlecht	Alter	Diagnose ¹	Medikation ²	Rhythmus ³ (Frequenz)	Ejektions-Fraktion ⁴ (%)	Eingesetzte Substanzen ⁵	Gemessene Kanäle ⁶
1	21.09.00	A.H.	m	49	KHK	B, M, N	SR (72)	70	Gen	1 EK
2	22.09.00	K.S.	w	70	KHK, MI		SR (80)	61	Gen	2 DK
3	25.09.00	W.P.	m	56	KHK	A, B, M	SR (60)	i.N.	Gen	1 EK
4	02.10.00	E.H.	w	76	KHK	B, D, M, N, AT	SR (52)	71	Gen	2 EK, 1 DK
5	06.10.00	G.F.	m	80	KHK, AS	D, N	SR (57)	i.N.	8Br, Gen	1 EK
6	16.10.00	H.K.	m	59	KHK, AS	A, B, D, H	SR (70)	40	8Br, Gen	1 EK
7	23.10.00	A.B.	m	49	KHK	A, B	SR (80)	i.N.	8 Br, Gen	2 EK
8	03.11.00	R.K.	m	61	KHK	A, B, D	SR (100)	i.N.	Gen	1 DK
9	08.11.00	H.T.	m	62	KHK		SR (76)	35	Gen	1 EK
10	13.11.00	E.S.	w	59	KHK, AS AI, MI	D	SR (68)	60	8Br, Gen	1 EK
11	15.11.00	E.N.	w	71	AS		SR (55)	70	8 Br, Gen	1 DK
12	12.12.00	E.P.	m	76	AS, AI MI		SR (64)	61	RP, Gen	2 DK
13	20.12.00	H.S.	m	83	KHK	M,N	SR (62)	i.N.	RP, Gen	1 DK
14	05.02.01	F.G.	m	71	KHK	B, M	SR (62)	50	RP, Gen	1 DK
15	09.03.01	A.G.	w	33	AS, AI	A, D	SAR (68)	60	Stauro, Gen	1 DK
16	16.03.01	W.M.	m	78	KHK	A, B, D	SR (47)	i.N.	Stauro, Gen	1 DK
17	21.03.01	P.G.	m	60	KHK	N	SR (70)	50	Stauro, Gen	1 EK
18	03.04.01	L.B.	w	57	KHK	B, N	SR (57)	i.N.	Stauro, Gen	1 EK
19	04.04.01	K.N.	w	63	AA		SR (76)	i.N.	Stauro, Gen	1 EK
20	05.09.01	C.R.	w	84	KHK, AS	A, B, D	SR (88)	i.N.	Gen	1 EK
21	12.09.01	G.-F.L.	m	67	KHK	B, M, N	SR (56)	58	Stauro, Gen	1 EK, 1 DK
22	25.09.01	A.B.	m	66	KHK	N, AT	SR (55)	35	PMA, Gen	1 DK
23	26.09.01	H.H.	m	59	KHK	B	SR (68)	70	PMA, Gen	1 EK
24	27.09.01	G.S.	m	70	KHK	A, B, N	SR (59)	41	PMA, Gen	1 EK
25	28.09.01	H.G.	m	72	KHK	B, N	SR (53)	i.N.	PMA, Gen	2 EK, 1 DK
26	26.10.01	W.H.	m	66	KHK	A, B, M	SR (49)	75	PMA, Gen	1 DK
27	31.10.01	K.H.	m	80	KHK	A, B, D, N	SR (48)	78	PP1	3 DK
28	08.11.01	K.K.	m	60	KHK	A, B, N	SR (63)	70	PP1	2 DK
29	16.11.01	E.S.	m	44	AI		SR (116)	55	PP1	1 EK
30	23.11.01	K.F.	w	59	AS	B	SR (71)	i.N.	PP1	2 EK
31	06.12.01	G.B.	w	73	KHK	A, B, D, M, N	SR (73)	i.N.	OA, Gen	1 DK
32	13.12.01	R.H.	m	55	KHK	B, M, N	SR (54)	59	OA, Gen	1 EK

n=	OP-Datum	Initialen	Geschlecht	Alter	Diagnose ¹	Medikation ²	Rhythmus ³ (Frequenz)	Ejektions-Fraktion ⁴ (%)	Eingesetzte Substanzen ⁵	Gemessene Kanäle ⁶
33	19.12.01	W.E.	m	75	KHK	A, D	SR (67)	i.N.	8Br, Gen	1 EK
34	21.12.01	E.S.	m	75	KHK	A, B, M, N	SR (73)	i.N.	8Br, Gen	1 DK
35	09.01.02	U.R.	m	70	KHK	B	SR (52)	i.N.	OA, Gen	2 DK
36	26.02.02	G.H.	m	73	KHK, AI, AA	A, M, N, H	SR (74)	79	OA, Gen	1 EK
37	27.02.02	W.H.	m	66	AS	A	SR (80)	61	OA, Gen	1 EK, 1 DK
38	29.05.02	W.B.	m	67	KHK	A	SR (63)	63	BIS, Gen	1 EK
39	03.06.02	E.G.	w	68	KHK	A, M, N	SR (67)	75	BIS, Gen	4 EK, 1 DK
40	06.08.02	J.W.	w	86	KHK, AS AI, MI	B, D	SR (52)	i.N.	RP, Gen 8Br, Gen	1 DK 1 EK, 1 DK
41	09.08.02	H.S.	m	62	KHK, AS		SR (71)	55	PP3	1 EK, 1 DK
42	13.08.02	K.H.	m	54	KHK, MI	A, B, D, M	SR (60)	43	PP3, bpV	1 EK, 2 DK 1 EK, 2 DK
43	14.08.02	H.L.	w	87	KHK	B, M, N	SR (65)	80	PP3, bpV	1 EK 1 EK, 2 DK
44	19.08.02	R.S.	m	72	KHK	A, B, D	SR (61)	i.N.	PP3	1 DK
45	21.08.02	W.R.	m	73	AS, AI AA		SR (62)	i.N.	RP, Gen bpV	1 EK 2 DK

Tab. 10: Auflistung der Patientencharakteristika mit jeweiligem OP-Datum, Namensinitialen, Geschlecht, Alter, Diagnose, präoperativer Medikation, Herzrhythmus, Herzfrequenz und Ejektionsfraktion sowie der für die jeweiligen Versuche eingesetzten Substanzen und der Anzahl der Einzel- bzw. Doppelkanäle, deren Aktivität aufgezeichnet werden konnte.

¹ KHK: koronare Herzkrankheit, AS: Aortenklappenstenose, AI: Aortenklappeninsuffizienz, MI: Mitralklappeninsuffizienz, AA: Aortenaneurysma

² A: ACE-Hemmer, B: β -Blocker, D: Diuretikum, M: Molsidomin, N: organische Nitrate, AT: AT2-Rezeptorantagonist, H: Herzglykosid

³ SR: Sinusrhythmus, SAR: Sinusarrhythmie

⁴ i.N.: im Normbereich

⁵ 8Br: 8Br-cAMP, BIS: Bisindolylmaleimid, bpV: bpVanadat, Gen: Genistein, OA: Okadasäure, PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, RP: Rp-8-CPT-cAMPs, Stauro: Staurosporin

⁶ EK: Einzelkanal, DK: Doppelkanal

Wir isolierten die atrialen Kardiomyozyten von insgesamt 45 Patienten. Das Alter der eingeschlossenen Patienten lag im Durchschnitt bei 66,6 Jahren und war im Vergleich zwischen Männern mit $65,9 \pm 1,7$ Jahren und Frauen mit $68,1 \pm 4,1$ Jahren etwa gleich hoch. Ungefähr 2/3 des Kollektives wurde von männlichen Probanden gebildet; im Vergleich der basalen L-Typ-Calciumkanal-Aktivität konnte jedoch für die wichtigsten Parameter Verfügbarkeit (Männer $43,4 \pm 3,0$ %; Frauen $49,9 \pm 4,3$ %) und Offenwahrscheinlichkeit (Männer $5,2 \pm 0,8$ %; Frauen $7,7 \pm 1,0$ %) kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen festgestellt werden.

Zum Ausschluss eines möglichen Einflusses der präoperativen Medikation auf die basale Aktivität des L-Typ-Calcium-Einzelkanals führten wir einen Vergleich zwischen den Kontrollmessungen der Patienten ohne und denjenigen mit Therapie des jeweiligen Medikaments durch. Dabei ergaben sich, wie aus Tabelle 11 ersichtlich, im ungepaarten t-Test keine signifikanten Unterschiede in Offenwahrscheinlichkeit und Verfügbarkeit. Interessanterweise galt dieses auch für die präoperative Therapie mit β -Blockern. Das widerspricht den Ergebnissen von Kreuzberg et al., die in ihren Untersuchungen eine signifikante Aktivitätssteigerung am L-Typ-Calciumkanal unter chronischer β -Blocker-Therapie fanden [12].

Tabelle 11:

	ACE-Hemmer /AT2-Antagonist		β -Blocker		Nitrate	
	ohne, n = 38	mit, n = 38	ohne, n = 29	mit, n = 47	ohne, n = 43	mit, n = 33
Offenwahrscheinlichkeit (%)	$6,3 \pm 0,8$	$5,8 \pm 1,0$	$6,6 \pm 1,1$	$5,7 \pm 0,8$	$6,1 \pm 0,8$	$6 \pm 1,1$
Verfügbarkeit (%)	$47,7 \pm 3,4$	$43,5 \pm 3,6$	49 ± 4	44 ± 3	43 ± 3	49 ± 4

Tab. 11: *Kein signifikanter Einfluss einer Therapie mit ACE-Hemmern, AT2-Antagonisten, β -Blockern oder Nitraten auf das basale Schaltverhalten des L-Typ-Calcium-Einzelkanals in Bezug auf Offenwahrscheinlichkeit und Verfügbarkeit. Mittelwerte \pm SEM; ungepaarter t-Test.*

3.2 Wirkung von Tyrosinkinase auf den L-Typ-Calciumkanal

3.2.1 Versuche mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein

Zunächst wurden unter Kontrollbedingungen (Haltepotential: -100 mV; Testpotential: $+20$ mV; Dauer: 150 ms; Frequenz: $1,66$ Hz) $180-240$ Registrierungen durchgeführt.

Danach erfolgte die Zugabe eines 20 μ l Bolus von $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein auf ca. 2 ml Badlösung. Im Anschluss wurde die Registrierung fortgesetzt.

Die durchschnittliche Genistein-Konzentration lag bei $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Insgesamt wurden zehn Experimente ausgewertet.

In Tabelle 12 (nächste Seite) sind die Ergebnisse der Messungen aufgeführt. Wie man sieht, kam es nach Inhibition von Tyrosinkinase mittels Genistein u.a. zu einem signifikanten Anstieg von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit im Sinne einer Aktivitätssteigerung des L-Typ-Calciumkanals. Der Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit ist dabei einerseits auf eine Steigerung des Modus 2-Schaltverhaltens und andererseits auf eine Zunahme der mittleren Offenzeit zurückzuführen.

Tabelle 12:

Parameter	n	vor Genistein	nach Genistein	Signifikanz (gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	10	5,0 ± 1,4	7,6 ± 2,0	p<0,05
Spitzenstrom (fA)	10	18,4 ± 5,8	30,3 ± 6,5	p<0,05
Verfügbarkeit (%)	10	31,2 ± 6,7	42,9 ± 4,6	p<0,05
Modus 2-Schaltverhalten (%)	10	13,3 ± 3,8	17,5 ± 4,8	p<0,05
Latenzphase (ms)	6	33,1 ± 4,8	26,7 ± 3,5	nicht signifikant
mittlere Offenzeit (ms)	10	0,61 ± 0,06	0,82 ± 0,13	p<0,05
mittlere Geschlossenzeit (ms)	6	8,0 ± 2,0	7,5 ± 1,7	nicht signifikant
τ Offenzeit (ms)	6	0,50 ± 0,14	0,77 ± 0,28	nicht signifikant
Proportion kurze Geschlossenzeit (%)	6	0,54 ± 0,08	0,58 ± 0,08	nicht signifikant
τ kurze Geschlossenzeit (ms)	6	0,63 ± 0,19	0,91 ± 0,23	nicht signifikant
τ lange Geschlossenzeit (ms)	6	16,0 ± 3,1	15,1 ± 2,5	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	10	38,6 ± 8,8	41,8 ± 9,4	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	6	54,6 ± 12,2	58,0 ± 9,9	nicht signifikant

Tab. 12: Zunahme der Aktivität des L-Typ-Calciumkanals nach Gabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 10$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.

Der Anstieg der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Zugabe von Genistein zeigt sich ebenfalls in den Abbildungen 5 und 6 auf den folgenden Seiten.

Abbildung 5:

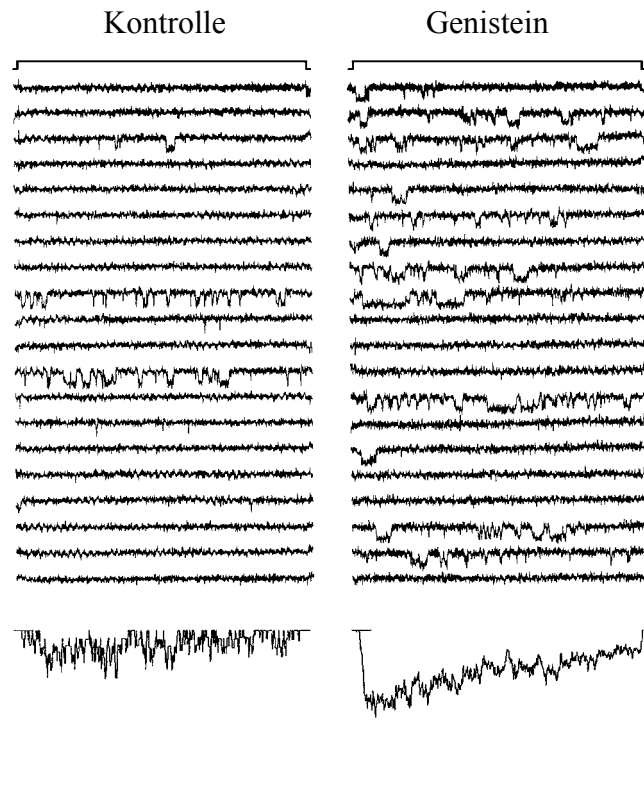


Abb. 5: Repräsentative L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Registrierungen vor und nach Gabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein zeigen eine Aktivitätszunahme.

Oben das Spannungsprotokoll: Das Haltepotential der Zelle betrug -100 mV. Es wurde repetitiv für 150 ms mit einer Frequenz von $1,66$ Hz auf ein Testpotential von $+20$ mV depolarisiert. Mittig jeweils 20 exemplarische Einzelkanalregistrierungen vor und nach Gabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein. Unten ist der durchschnittliche Kanalstrom dargestellt. Die Skalierung unten rechts entspricht 20 ms und 2 pA für die Einzelkanalregistrierung und 20 fA für den durchschnittlichen Einzelkanalstrom.

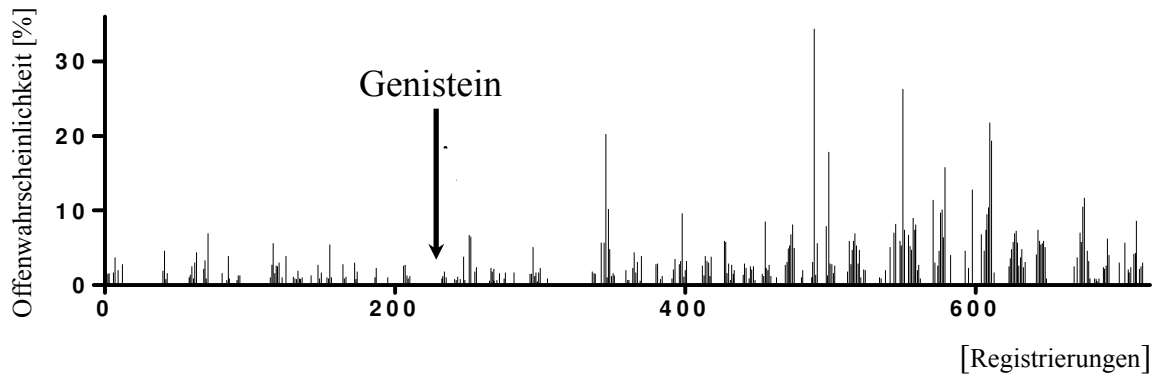
Abbildung 6:

Abb. 6: Exemplarische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Genisteinwirkung auf die Offenwahrscheinlichkeit anhand einer Einzelkanalaufnahme.

3.2.2 Wirkung des Src-Tyrosinkinase-Inhibitors PP1

Wiederum wurden zunächst unter Kontrollbedingungen 180-240 Registrierungen durchgeführt.

Danach erfolgte vor Fortsetzung der Aufnahmen die Zugabe eines 20 μ l Bolus von 10^{-3} M PP1 auf ca. 2 ml Badlösung.

Die durchschnittliche PP1-Konzentration betrug 10^{-5} M.

Es wurden acht Versuche ausgewertet.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 13 aufgeführt. Darin zeigt sich nach Inhibition von Src-Tyrosinkinase mittels PP1 (analog den Ergebnissen nach Tyrosinkinase-Inhibition durch Genistein) eine Steigerung der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität, erkennbar am signifikanten Anstieg von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom, Verfügbarkeit, Modus 2-Schaltverhalten und mittlerer Offenzeit.

Tabelle 13:

Parameter	n	vor PP1	nach PP1	Signifikanz (gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	8	2,1 ± 0,92	4,1 ± 0,98	p<0,05
Spitzenstrom (fA)	8	14,1 ± 3,5	31,7 ± 5,8	p<0,05
Verfügbarkeit (%)	8	56,0 ± 5,8	88,7 ± 3,0	p<0,05
Modus 2-Schaltverhalten (%)	8	1,7 ± 1,4	5,0 ± 0,8	p<0,05
Latenzphase (ms)	3	36,7 ± 7,1	17,0 ± 2,8	nicht signifikant
mittlere Offenzeit (ms)	8	0,43 ± 0,04	0,61 ± 0,05	p<0,05
mittlere Geschlossenzeit (ms)	3	13,4 ± 4,6	8,4 ± 3,3	nicht signifikant
τ Offenzeit (ms)	3	0,48 ± 0,03	0,62 ± 0,05	nicht signifikant
Proportion kurze Geschlossenzeit (%)	3	0,31 ± 0,11	0,35 ± 0,12	nicht signifikant
τ kurze Geschlossenzeit (ms)	3	0,49 ± 0,19	0,89 ± 0,14	nicht signifikant
τ lange Geschlossenzeit (ms)	3	17,0 ± 5,1	11,5 ± 2,6	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	8	47,4 ± 6,5	37,7 ± 6,5	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	3	81,0 ± 15,1	98,2 ± 2,9	nicht signifikant

Tab. 13: Zunahme der Aktivität des L-Typ-Calciumkanals nach Gabe von 10^{-5} M PP1. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 8$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.

Auch in den Abbildungen 7 und 8 auf den nächsten Seiten ist der Anstieg der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach PP1-Applikation dargestellt.

Abbildung 7:

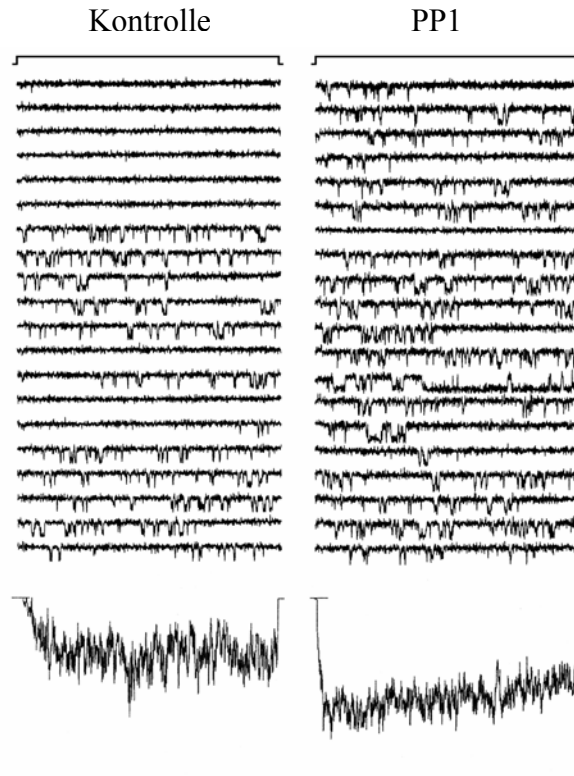


Abb. 7: Repräsentative L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Registrierungen vor und nach Gabe von 10^{-5} M PP1 zeigen eine Aktivitätszunahme.

Oben das Spannungsprotokoll: Das Haltepotential der Zelle betrug -100 mV. Es wurde repetitiv für 150 ms mit einer Frequenz von $1,66$ Hz auf ein Testpotential von $+20$ mV depolarisiert. Mittig jeweils 20 exemplarische Einzelkanalregistrierungen vor und nach Gabe von 10^{-5} M PP1. Unten ist der durchschnittliche Kanalstrom dargestellt. Die Skalierung unten rechts entspricht 20 ms und 2 pA für die Einzelkanalregistrierung und 20 fA für den durchschnittlichen Einzelkanalstrom.

Abbildung 8:

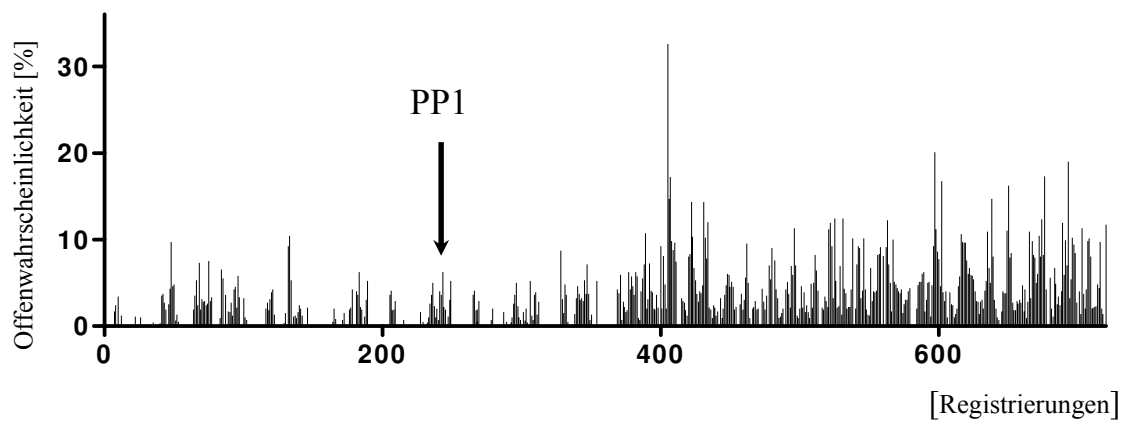


Abb. 8: Exemplarische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Wirkung von 10^{-5} M PPI auf die Offenwahrscheinlichkeit anhand einer Einzelkanalaufnahme.

3.2.3 Vergleich der Effekte von Genistein und PP1

Abbildung 9:

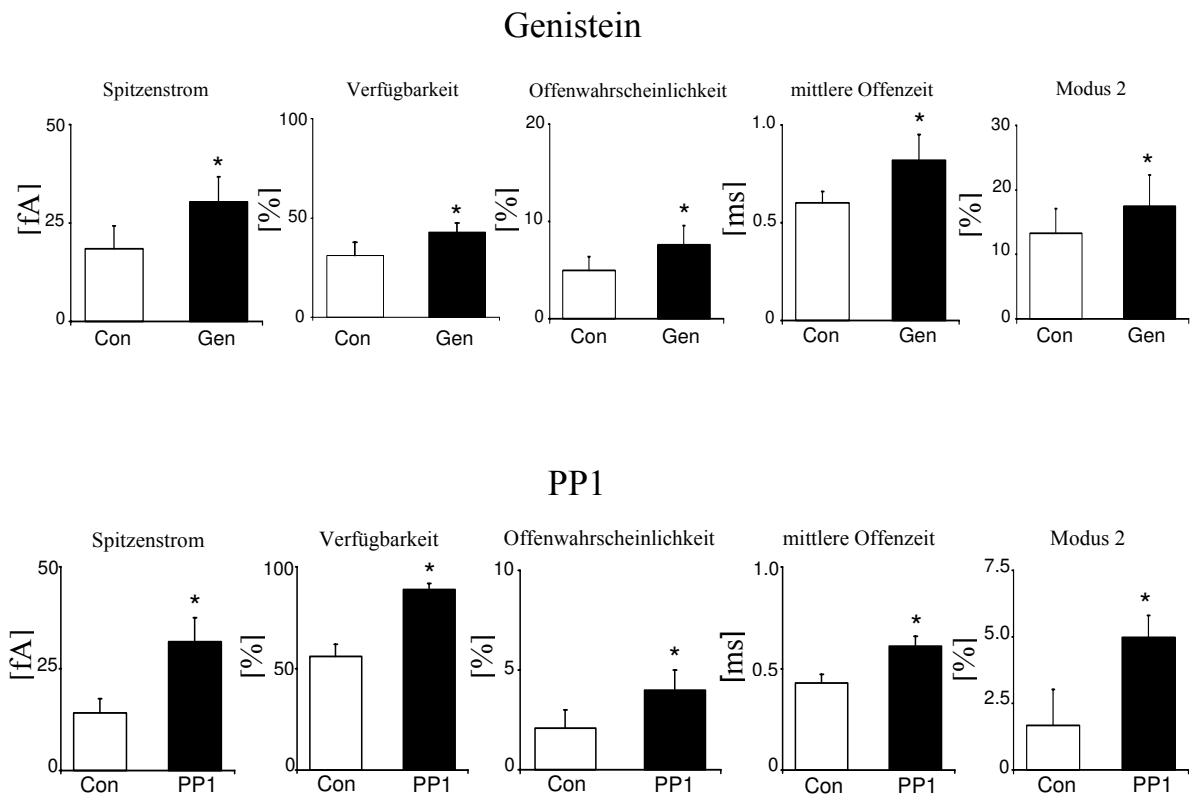


Abb. 9: Aktivierende Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein ($n = 10$) und 10^{-5} M PP1 ($n = 8$) in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit, Offenwahrscheinlichkeit sowie mittlere Offenzeit und Modus 2-Schaltverhalten des L-Typ-Calciumkanals. Mittelwerte \pm SEM. Gepaarter t-Test, * = $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.

Es wird ersichtlich, dass sowohl die Inhibition von Tyrosinkinase durch Genistein als auch die Inhibition von Src-Tyrosinkinase durch PP1, bedingt durch signifikante Steigerungen von Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit, zu einem signifikanten Anstieg des durchschnittlichen L-Typ-Calciumkanal-Spitzenstromes führt. Wie bereits unter Kapitel 3.2.1 erwähnt, erklärt sich der Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit dabei sowohl durch eine Zunahme der mittleren Offenzeit als auch durch eine Steigerung des Modus 2-Schaltverhaltens.

3.2.4 Wirkung des inaktiven PP1-Analogons PP3

Es wurden zunächst unter Kontrollbedingungen 180-240 Registrierungen durchgeführt. Danach erfolgte die Zugabe eines 20 μ l Bolus von 10^{-3} M PP3 auf ca. 2 ml Badlösung. Die durchschnittliche Konzentration von PP3 betrug 10^{-5} M. Es wurden sieben Experimente ausgewertet.

Die folgende Tabelle 14 und Abbildung 10 auf der nächsten Seite zeigen die Ergebnisse der Messungen: Nach Zugabe des inaktiven PP1-Analogons PP3 ergab sich für keinen der betrachteten Parameter eine signifikante Änderung, was auf eine Unwirksamkeit von PP3 in Bezug auf das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten schließen lässt.

Tabelle 14:

Parameter	n	vor PP3	nach PP3	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	7	6,5 \pm 2,3	6,3 \pm 2,1	nicht signifikant
Spitzenstrom (fA)	7	25,7 \pm 6,7	31,0 \pm 9,3	nicht signifikant
Verfügbarkeit (%)	7	48,1 \pm 8,5	51,1 \pm 8,2	nicht signifikant
Latenzphase (ms)	3	23,7 \pm 6,5	27,7 \pm 7,9	nicht signifikant
Mittlere Offenzeit (ms)	7	0,60 \pm 0,09	0,64 \pm 0,09	nicht signifikant
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	3	8,9 \pm 4,6	12,4 \pm 6,2	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	7	36,7 \pm 13,1	50,7 \pm 10,6	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	3	54,5 \pm 19,4	48,2 \pm 18,4	nicht signifikant

Tab. 14: *Es erfolgt keine signifikante Änderung der Aktivität des L-Typ-Calciumkanals nach Applikation von 10^{-5} M PP3. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.*

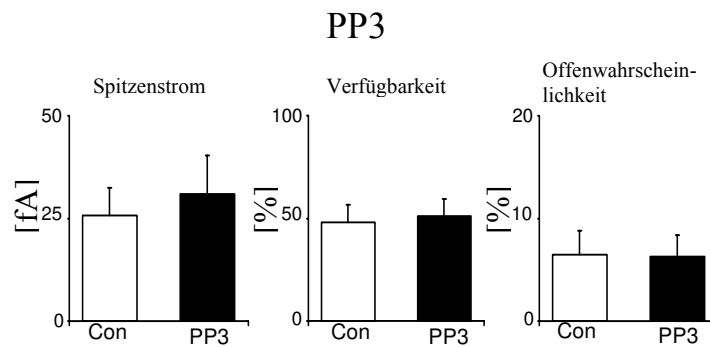
Abbildung 10:

Abb. 10: Keine signifikanten Änderungen im L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit nach Zugabe von 10^{-5} M PP3. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t -Test.

3.2.5 Wirkung des Tyrosinphosphatase-Inhibitors bpVanadat (bpV)

Nach Aufnahme der üblichen Kontrolldateien erfolgte vor Fortsetzung der Registrierungen die Zugabe von $20 \mu\text{l}$ 10^{-5} M bpV als Bolus auf ca. 2 ml Badlösung.

Die durchschnittliche bpV-Konzentration lag bei 10^{-7} M.

Die acht ausgewerteten Versuche sind auf der folgenden Seite in Tabelle 15 und Abbildung 11 dargestellt. Darin zeigt sich eine signifikante Abnahme von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit als Ausdruck einer verminderten L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Hemmung von Tyrosinphosphatase mittels bpVanadat.

Tabelle 15:

Parameter	n	vor bpV	nach bpV	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	8	6,7 ± 1,8	3,9 ± 1,6	p<0,05
Spitzenstrom (fA)	8	29,9 ± 4,9	12,8 ± 3,0	p<0,05
Verfügbarkeit (%)	8	53,3 ± 8,4	26,2 ± 7,0	p<0,05
Latenzphase (ms)	2	17,6 ± 2,3	35,5 ± 1,9	nicht signifikant
Mittlere Offenzeit (ms)	8	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,04	nicht signifikant
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	2	2,7 ± 1,3	5,7 ± 4,2	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	8	45,0 ± 10,4	55,3 ± 11,0	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	2	92,9 ± 9,8	61,9 ± 21,7	nicht signifikant

Tab. 15: Inhibierende Wirkung von 10^{-7} M bpV (bpVanadat) auf die basale Aktivität des L-Typ-Calciumkanals. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 8$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.

Abbildung 11:

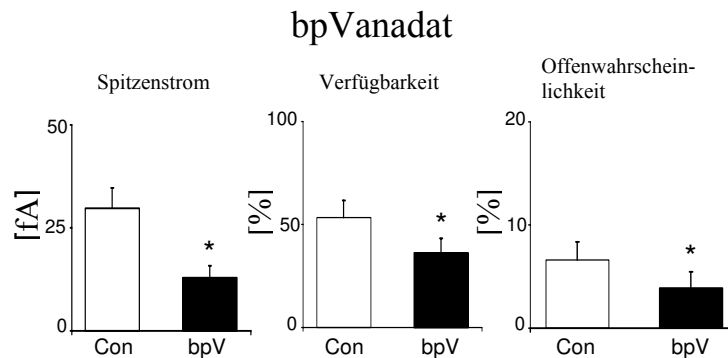


Abb. 11: Hemmende Wirkung von 10^{-7} M bpV (bpVanadat) in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calciumkanals. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 8$ Experimenten; gepaarter t-Test, * = $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.

3.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Tyrosinkinasen

3.3.1 Wirkung des Proteinkinase A-Aktivators 8Br-cAMP und Interaktion mit Genistein

Es wurden unter Kontrollbedingungen 180-240 Registrierungen durchgeführt.

Dann wurden zunächst 20 μl einer 10^{-1} M Lösung 8Br-cAMP als Bolus in ca. 2 ml Badlösung gegeben. Daraufhin folgte eine Fortführung der Aufzeichnung über mindestens 180 Registrierungen, bevor eine weitere Boluszugabe von diesmal 20 μl $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein ins Bad erfolgte. Im Anschluss wurde die Registrierung erneut fortgesetzt.

Die durchschnittliche Konzentration lag für 8Br-cAMP bei 10^{-3} M, für Genistein bei $5 \cdot 10^{-5}$ M. Insgesamt wurden zehn Versuche ausgewertet.

Die Ergebnisse der Messungen zeigt Tabelle 16 auf der nächsten Seite: Nach Proteinkinase A-Aktivierung mittels 8Br-cAMP kam es zunächst zu einem signifikanten Anstieg von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit. Zusätzliche Tyrosinkinase-Inhibition durch Applikation von Genistein führte darüber hinaus zu einer weiteren, wiederum signifikanten Zunahme von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit im Sinne einer weiteren Aktivitätssteigerung des L-Typ-Calciumkanals.

Tabelle 16:

Parameter	n	vor Substanz	nach 8Br-cAMP	nach Genistein
Offenwahrscheinlichkeit (%)	10	6,7 ± 2,0	8,6 ± 2,4 *	11,7 ± 3,0 * §
Spitzenstrom (fA)	10	25,3 ± 6,6	40,2 ± 12,4 *	63,5 ± 18,4 * §
Verfügbarkeit (%)	10	32,4 ± 5,4	47,2 ± 6,9 *	61,3 ± 8,6 * §
Latenzphase (ms)	7	39,0 ± 4,7	37,1 ± 6,6	30,5 ± 5,8
Mittlere Offenzeit (ms)	7	0,64 ± 0,07	0,68 ± 0,07	0,9 ± 0,16 *
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	7	11,8 ± 2,4	10,0 ± 1,9	7,4 ± 1,4
Inaktivierung (%)	10	44,8 ± 6,2	41,2 ± 7,4	40,7 ± 7,9
Aktivitätsdauer (ms)	7	54,8 ± 10,7	68,3 ± 13,2	69,7 ± 9,9

Tab. 16: Steigernde Wirkung von 10^{-3} M 8Br-cAMP auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität und weitere Zunahme der Aktivität des L-Typ-Calciumkanals nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 10$ Experimenten; Unterschiede wurden analysiert durch ONE WAY ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test, * = $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen, § = $p < 0,05$ vs. 10^{-3} M 8Br-cAMP.

In den folgenden Abbildungen 12 und 13 ist die Steigerung der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Applikation von 8Br-cAMP und nach zusätzlicher Gabe von Genistein dargestellt.

Abbildung 12:

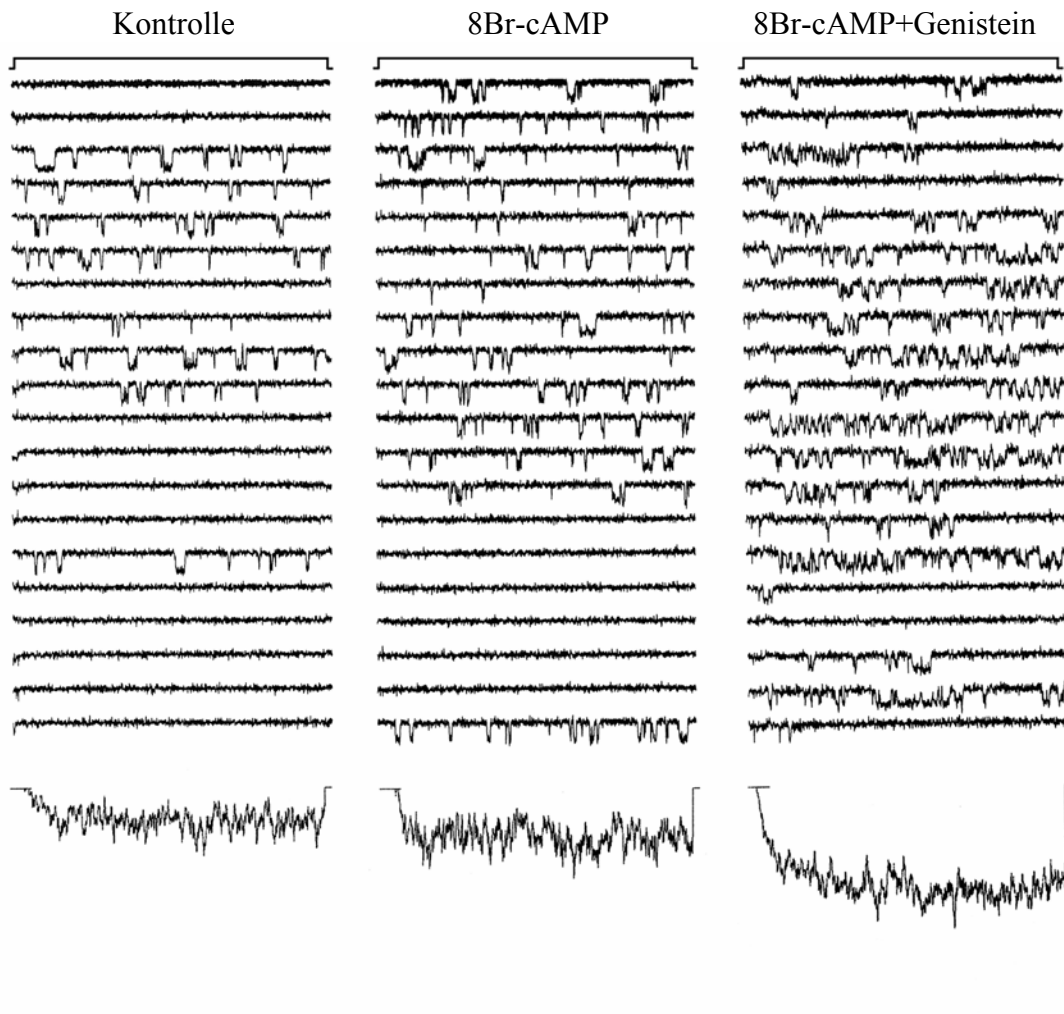


Abb. 12: Repräsentative L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Registrierungen vor und nach Applikation von zunächst 10^{-3} M 8Br-cAMP und dann zusätzlich $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein zeigen eine Aktivitätszunahme.

Oben das Spannungsprotokoll: Das Haltepotential der Zelle betrug -100 mV. Es wurde repetitiv für 150 ms mit einer Frequenz von $1,66$ Hz auf ein Testpotential von $+20$ mV depolarisiert. Mittig jeweils 20 exemplarische Einzelkanalregistrierungen vor Substanzgabe, nach 10^{-3} M 8Br-cAMP und nach $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein. Unten ist der durchschnittliche Kanalstrom dargestellt. Die Skalierung rechts unten entspricht 20 ms und 2 pA für die Einzelkanalregistrierung und 50 fA für den durchschnittlichen Einzelkanalstrom.

Abbildung 13:

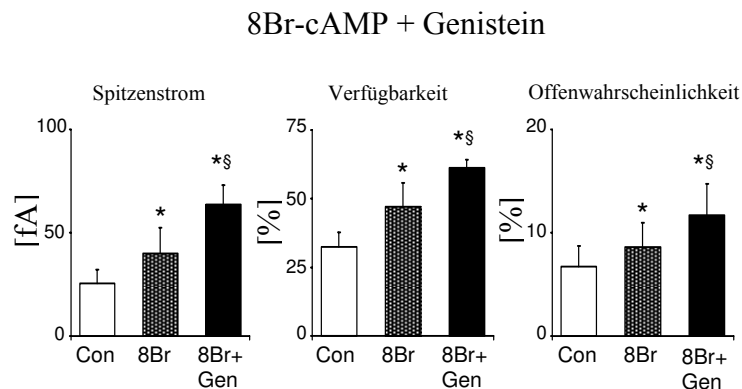


Abb. 13: Einzelkanalschaltverhalten unter Kontrollbedingungen, nach Applikation von 10^{-3} M 8Br-cAMP und nach zusätzlicher Gabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit. Die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität steigt jeweils signifikant an. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 10$ Experimenten; Unterschiede wurden analysiert durch ONE WAY ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, § = $p < 0,05$ vs. 8Br-cAMP.

3.3.2 Wirkung von Genistein nach Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem Proteinkinase A-Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPs

Vor Beginn der Messungen wurden $200 \mu\text{l}$ 10^{-3} M Rp-8-CPT-cAMPs als Bolus in ca. 20 ml Zellsuspension gegeben, d.h. es lag ca. 10^{-5} M verdünnt in der Zellsuspension vor. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min. wurde mit den Messungen begonnen.

Dazu wurden zunächst unter Kontrollbedingungen 180-240 Registrierungen durchgeführt. Danach folgte die Zugabe eines $20 \mu\text{l}$ Bolus $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein auf ca. 2 ml Badlösung. Die Registrierung wurde fortgesetzt.

Die durchschnittliche Konzentration für Genistein lag bei $5,3 \cdot 10^{-5}$ M.

Insgesamt wurden sechs Experimente ausgewertet.

In Tabelle 17 und Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Messungen aufgeführt. Wie man sieht, kam es nach Zugabe von Genistein ungeachtet der vorausgegangenen Proteinkinase A-Hemmung mittels Rp-8-CPT-cAMPs zu einer signifikanten Zunahme von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit im Sinne eines Anstiegs der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität.

Tabelle 17:

Parameter	n	vor Genistein	nach Genistein	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	6	4,5 ± 1,2	7,6 ± 1,2	p<0,05
Spitzenstrom (fA)	6	20,5 ± 6,4	48,8 ± 8,9	p<0,05
Verfügbarkeit (%)	6	43,3 ± 9,9	67,4 ± 6,8	p<0,05
Inaktivierung (%)	6	41,8 ± 10,3	40,5 ± 11,1	nicht signifikant

Tab. 17: Anstieg der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Gabe von Genistein trotz vorheriger Inhibition von Proteinkinase A mittels 10^{-5} M Rp-8-CPT-cAMPs. Mittelwerte ± SEM aus n = 6 Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. 10^{-5} M Rp-8-CPT-cAMPs allein.

Abbildung 14:

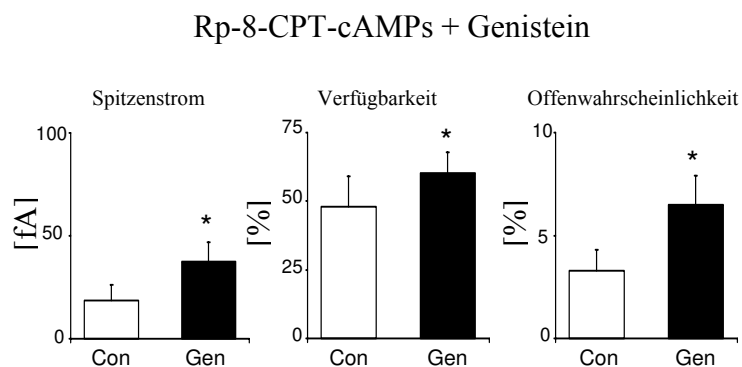


Abb. 14: Kanalaktivierende Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit nach Präinkubation mit 10^{-5} M Rp-8-CPT-cAMPs. Mittelwerte ± SEM aus n = 6 Experimenten; gepaarter t-Test, * = $p < 0,05$ vs. 10^{-5} M Rp-8-CPT-cAMPs allein.

3.3.3 Wirkung von Genistein nach Präinkubation mit dem Proteinphosphatase-Inhibitor Okadasäure

Vor Beginn der Messungen wurden 200 μl 10^{-4} M Okadasäure als Bolus in ca. 20 ml Zellsuspension gegeben, d.h. es lag ca. 10^{-6} M verdünnt in der Zellsuspension vor. Die Inkubationszeit betrug ca. 15 min., dann wurde mit den Messungen begonnen.

Nach Aufnahme der üblichen Kontrolldateien wurde vor Fortsetzung der Registrierungen ein 20 μl Bolus $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein auf ca. 2 ml Badlösung gegeben.

Die durchschnittliche Genistein-Konzentration lag bei $5,1 \cdot 10^{-5}$ M

Die ausgewerteten sieben Experimente sind in Tabelle 18 und Abbildung 15 dargestellt: Auch nach vorheriger Proteinphosphatase-Inhibition mit Hilfe von Okadasäure führte eine Tyrosinkinase-Hemmung mittels Genistein zu einem Anstieg der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität mit signifikanter Zunahme von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit.

Tabelle 18:

Parameter	n	vor Genistein	nach Genistein	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	7	10,0 \pm 3,3	11,5 \pm 3,3	p<0,05
Spitzenstrom (fA)	7	43,2 \pm 15,7	72,8 \pm 17,2	p<0,05
Verfügbarkeit (%)	7	51,5 \pm 7,1	78,4 \pm 3,1	p<0,05
Latenzphase (ms)	3	30,9 \pm 10,9	24,1 \pm 12,1	p<0,05
Mittlere Offenzeit (ms)	3	1,3 \pm 0,41	1,4 \pm 0,41	nicht signifikant
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	3	7,8 \pm 4,5	7,5 \pm 4,7	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	7	28,6 \pm 10,0	36,7 \pm 6,3	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	3	85,7 \pm 14,2	82,5 \pm 10,7	nicht signifikant

Tab. 18: Zunahme der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Applikation von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein unter Proteinphosphatase-Inhibition durch 10^{-6} M Okadasäure. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. 10^{-6} M Okadasäure allein.

Abbildung 15:

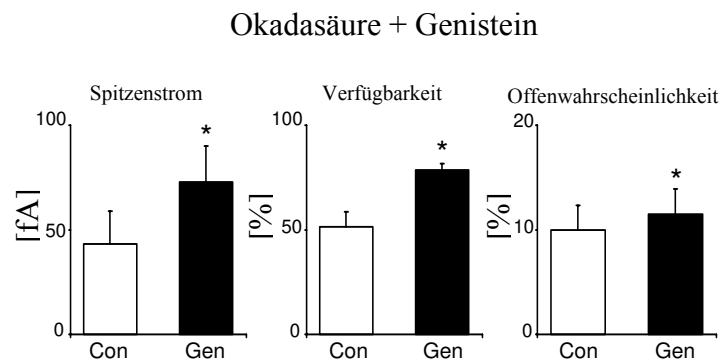


Abb. 15: Stimulierende Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein auf das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit nach vorheriger Präinkubation der Kardiomyozyten mit 10^{-6} M Okadasäure. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t -Test, * = $p < 0,05$ vs. 10^{-6} M Okadasäure allein.

3.3.4 Genisteinwirkung nach Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem Proteinkinase C-Aktivatoren PMA

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Präinkubation der Kardiomyozyten durch Zugabe von $200 \mu\text{l}$ 10^{-3} M PMA als Bolus in ca. 200 ml Zellsuspension, was in dieser eine PMA-Konzentration von ca. 10^{-5} M ergab. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min. wurde mit den Messungen begonnen und unter Kontrollbedingungen zunächst 180-240 Registrierungen durchgeführt. Dann wurden im nächsten Schritt $20 \mu\text{l}$ $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein auf ca. 2 ml Badlösung gegeben, und die Registrierung wurde fortgesetzt.

Die durchschnittliche Konzentration für Genistein lag bei $5,1 \cdot 10^{-5}$ M.

Es wurden insgesamt sieben Experimente ausgewertet.

Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Messungen. Daraus lässt sich ersehen, dass es bei vorausgegangener Präinkubation der untersuchten Zellen mit PMA nach Genistein-Gabe weiterhin zu einem signifikanten Anstieg von Offenwahrscheinlichkeit, Spitzenstrom und Verfügbarkeit als Ausdruck einer Aktivierung des L-Typ-Calciumkanals kam.

Tabelle 19:

Parameter	n	vor Genistein	nach Genistein	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	7	2,8 ± 0,8	5,9 ± 1,8	p<0,05
Spitzenstrom (fA)	7	20,2 ± 5,8	43,7 ± 9,8	p<0,05
Verfügbarkeit (%)	7	43,3 ± 9,8	67,8 ± 7,9	p<0,05
Latenzphase (ms)	4	41,7 ± 8,5	27,9 ± 6,2	nicht signifikant
Mittlere Offenzeit (ms)	4	0,76 ± 0,13	1,0 ± 0,18	nicht signifikant
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	4	13,1 ± 3,2	9,9 ± 3,0	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	7	54,6 ± 6,3	39,0 ± 8,5	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	4	65,9 ± 15,5	79,5 ± 9,9	nicht signifikant

Tab. 19: Anstieg der Aktivität des L-Typ-Calciumkanals durch $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein nach Aktivierung von Proteinkinase C mittels 10^{-5} M PMA. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. 10^{-5} M PMA allein.

Auch in den Abbildungen 16 und 17 auf den folgenden Seiten ist die Zunahme der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Tyrosinkinase-Inhibition durch Genistein-Applikation bei zuvor erfolgter Proteinkinase C-Aktivierung mittels PMA dargestellt.

Abbildung 16:

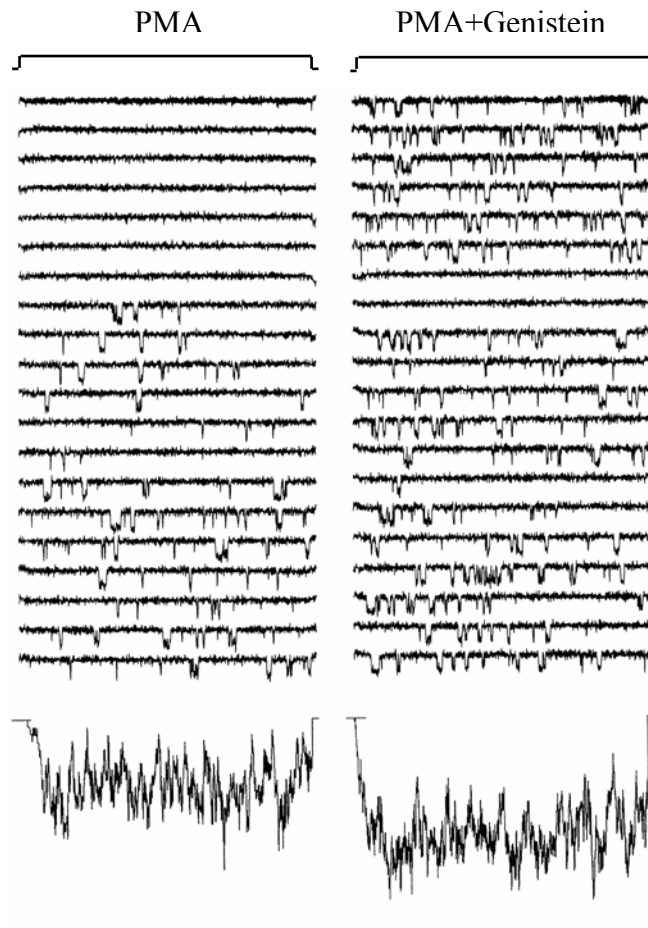


Abb. 16: Repräsentative L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Registrierungen vor und nach Gabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein unter Proteinkinase C-Aktivierung mittels 10^{-5} M PMA zeigen eine Aktivitätszunahme.

Oben das Spannungsprotokoll: Das Haltepotential der Zelle betrug -100 mV. Es wurde repetitiv für 150 ms mit einer Frequenz von $1,66$ Hz auf ein Testpotential von $+20$ mV depolarisiert. Mittig jeweils 20 exemplarische Einzelkanalregistrierungen vor und nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein bei Präinkubation mit 10^{-5} M PMA. Unten ist der durchschnittliche Kanalstrom dargestellt. Die Skalierung unten rechts entspricht 20 ms und 2 pA für die Einzelkanalregistrierung und 20 fA für den durchschnittlichen Einzelkanalstrom.

Abbildung 17:

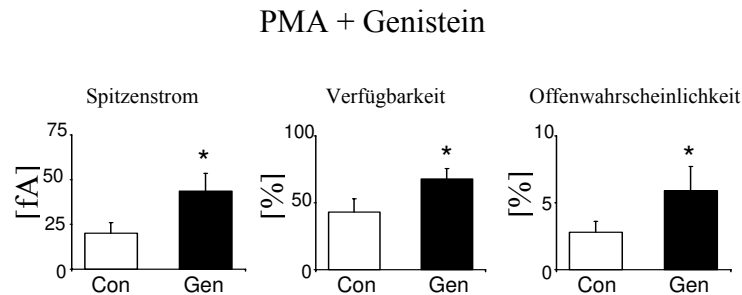


Abb. 17: Steigernde Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit des L-Typ-Calciumkanals nach 10^{-5} M PMA-Präinkubation. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t -Test, * = $p < 0,05$ vs. 10^{-5} M PMA allein.

3.3.5 Wirkung von Genistein nach Präinkubation mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Staurosporin

Vor Beginn der Messungen wurden $200 \mu\text{l}$ 10^{-5} M Staurosporin als Bolus in ca. 20 ml Zellsuspension gegeben, d.h. es lag eine Konzentration von ca. 10^{-7} M in der Zellsuspension vor. Die Inkubationszeit betrug ca. 15 min., dann wurde mit den Messungen begonnen.

Es wurden zunächst unter Kontrollbedingungen 180-240 Registrierungen durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde ein $20 \mu\text{l}$ Bolus $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein auf ca. 2 ml Badlösung gegeben. Im Anschluss wurde die Registrierung fortgeführt.

Die Genisteinkonzentration lag im Durchschnitt bei $5,3 \cdot 10^{-5}$ M.

Die sieben ausgewerteten Versuche sind in Tabelle 20 (nächste Seite) dargestellt. Bei vorausgegangener Proteinkinase C-Hemmung mittels Staurosporin zeigten sich nach Zugabe des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein keine signifikanten Änderungen im Schaltverhalten des L-Typ-Calciumkanals.

Tabelle 20:

Parameter	n	vor Genistein	nach Genistein	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	7	9,2 ± 2,2	7,0 ± 2,5	nicht signifikant
Spitzenstrom (fA)	7	42,5 ± 5,7	28,6 ± 8,0	nicht signifikant
Verfügbarkeit (%)	7	47,9 ± 7,5	37,5 ± 2,9	nicht signifikant
Latenzphase (ms)	4	22,9 ± 3,1	32,0 ± 6,7	nicht signifikant
Mittlere Offenzeit (ms)	4	1,6 ± 0,40	1,6 ± 0,45	nicht signifikant
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	4	7,2 ± 1,2	7,0 ± 2,4	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	7	43,1 ± 11,1	59,4 ± 6,2	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	4	82,4 ± 8,1	56,5 ± 6,9	nicht signifikant

Tab. 20: Ausbleibende Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität unter Proteinkinase C-Inhibition mittels 10^{-7} M Staurosporin. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. 10^{-7} M Staurosporin allein.

Die Abbildungen 18 und 19 auf den folgenden Seiten zeigen ebenfalls das unveränderte Aktivitätsniveau des L-Typ-Calciumkanals nach Gabe von Genistein unter Inhibition von Proteinkinase C mit Hilfe von Staurosporin.

Abbildung 18:

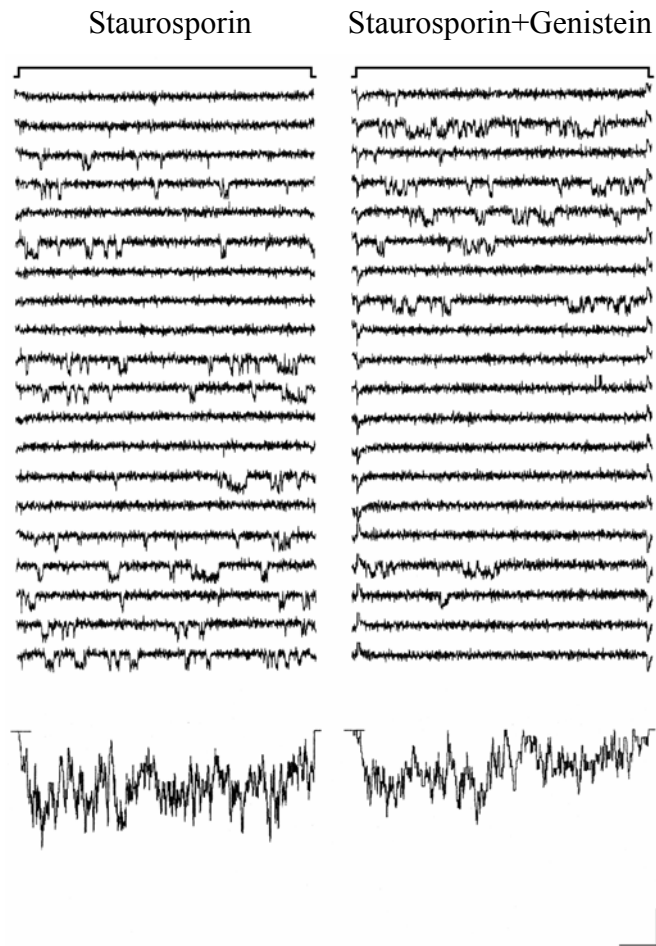


Abb. 18: Repräsentative L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Registrierungen vor und nach Gabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein unter Proteinkinase C-Inhibition mittels 10^{-7} M Staurosporin zeigen keine signifikanten Veränderungen im Schaltverhalten.

Oben das Spannungsprotokoll: Das Haltepotential der Zelle betrug -100 mV. Es wurde repetitiv für 150 ms mit einer Frequenz von $1,66$ Hz auf ein Testpotential von $+20$ mV depolarisiert. Mittig jeweils 20 exemplarische Einzelkanalregistrierungen vor und nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein bei Präinkubation mit 10^{-7} M Staurosporin. Unten ist der durchschnittliche Kanalstrom dargestellt. Die Skalierung rechts unten entspricht 20 ms und 2 pA für die Einzelkanalregistrierung und 20 fA für den durchschnittlichen Einzelkanalstrom.

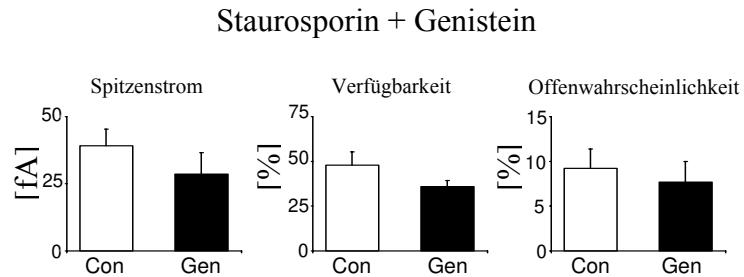
Abbildung 19:

Abb. 19: Nach Applikation von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein resultiert unter Präinkubation mit 10^{-7} M Staurosporin keine signifikante Änderung des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 7$ Experimenten; gepaarter t -Test.

3.3.6 Wirkung von Genistein nach Präinkubation mit dem Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIS)

Es wurden zunächst $200 \mu\text{l}$ 10^{-4} M BIS als Bolus in ca. 20 ml Zellsuspension gegeben, d.h. es lag in ca. 10^{-6} M Verdünnung in der Zellsuspension vor. Nach Verstreichen einer Inkubationszeit von ca. 15 min. wurde mit den Messungen begonnen.

Dabei wurden zunächst 180-240 Registrierungen unter Kontrollbedingungen aufgenommen. Nun folgte die Zugabe eines $2 \mu\text{l}$ Bolus $5 \cdot 10^{-3}$ M Genistein auf ca. 2 ml Badlösung. Danach wurde die Registrierung fortgesetzt.

Die durchschnittliche Konzentration von Genistein lag bei $5,1 \cdot 10^{-5}$ M.

Es wurden sechs Experimente ausgewertet.

Die Messergebnisse sind in Tabelle 21 und Abbildung 20 auf der nächsten Seite dargestellt. Auch hier führte eine Tyrosinkinase-Inhibition mittels Genistein, nach vorheriger Proteinkinase C-Hemmung in diesem Falle durch BIS, nicht zu einer signifikanten Änderung des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens.

Tabelle 21:

Parameter	n	vor Genistein	nach Genistein	Signifikanz(gepaarter t-Test)
Offenwahrscheinlichkeit (%)	6	7,6 ± 2,7	6,2 ± 2,8	nicht signifikant
Spitzenstrom (fA)	6	47,0 ± 21,3	37,9 ± 21,2	nicht signifikant
Verfügbarkeit (%)	6	60,2 ± 6,9	55,1 ± 7,1	nicht signifikant
Latenzphase (ms)	5	24,2 ± 7,4	26,9 ± 5,0	nicht signifikant
Mittlere Offenzeit (ms)	5	0,62 ± 0,08	0,69 ± 0,12	nicht signifikant
Mittlere Geschlossenzeit (ms)	5	9,0 ± 4,2	8,2 ± 2,9	nicht signifikant
Inaktivierung (%)	6	42,8 ± 12,6	63,1 ± 9,4	nicht signifikant
Aktivitätsdauer (ms)	5	78,7 ± 14,7	69,1 ± 12,0	nicht signifikant

Tab. 21: Unveränderte L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein unter Inhibition von Proteinkinase C mittels 10^{-6} M BIS. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 6$ Experimenten; gepaarter t-Test, Signifikanz besteht bei $p < 0,05$ vs. 10^{-6} M BIS allein.

Abbildung 20:

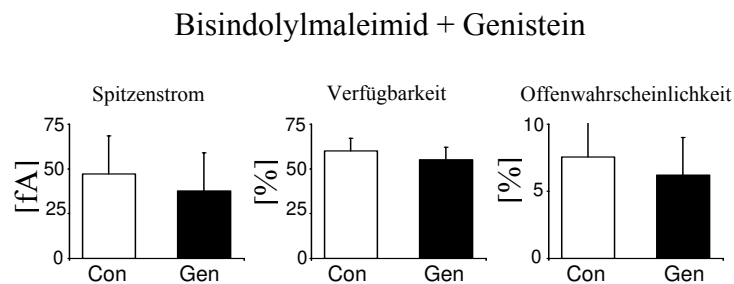


Abb. 20: Ausbleibende Wirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ M Genistein auf das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in Bezug auf Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit nach Präinkubation der Kardiomyozyten mit 10^{-6} M BIS. Mittelwerte \pm SEM aus $n = 6$ Experimenten; gepaarter t-Test.

4 Diskussion

4.1 Versuche zur Wirkung von Tyrosinkinasen auf die Aktivität des L-Typ-Calciumkanals

Es wurden zwei pharmakologische Tyrosinkinase-Inhibitoren in unserer Studie verwendet: Das Isoflavon Genistein ist ein unspezifischer Inhibitor für Tyrosinkinasen, hat aber nur eine geringe Wirkung auf die Aktivität von Serin-Threonin-Kinasen und andere ATP-abhängige Enzyme. Es wirkt als kompetitiver Inhibitor von ATP in der Kinasereaktion und nicht-kompetitiv mit einem Phosphatakzeptor [50]. Die inhibitorische Genisteinwirkung kommt in vitro im Konzentrationsbereich zwischen 50-100 μM zum Tragen [40]. Genistein ist in der in unserer Studie verwendeten Konzentration ein allgemein akzeptierter Tyrosinkinase-Hemmer [50]. Allerdings könnte es auch Veränderungen am Zytoskelett hervorrufen, da die Enzyme, die in die Beeinflussung des Zytoskeletts involviert sind, durch Tyrosinkinasen reguliert werden [41]. Wir können nicht ausschließen, dass diese Zytoskelettveränderungen das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten beeinflussen. Der schnelle Zeitverlauf des Effektes in unseren Versuchen innerhalb von 2-3 min. spricht aber gegen diese Möglichkeit und lässt eine Regulation auf der Ebene des L-Typ-Calciumkanals, direkt oder indirekt über ein Regulatorprotein, annehmen.

In vorausgegangenen Arbeiten zur Regulation des L-Typ-Calciumkanal-Stromes auf Ganzzelebene mit Genistein wurde aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen bei Verwendung des Tyrosinkinase-Inhibitors Lavendustein A [51] und dem eigentlich inaktiven Genisteinanalogen Daidzein [29, 33] postuliert, dass die inhibitorische Genisteinwirkung auf den Kanalstrom nicht Tyrosinkinase-vermittelt, sondern eine unspezifische Kanalblockade ist. Andere fanden in vergleichbaren Experimenten eine im Vergleich zu Genistein geringere Wirksamkeit des inaktiven Daidzeins und stellten die Hypothese auf, dass Genistein möglicherweise sowohl Tyrosinkinase-unabhängige als auch -abhängige Effekte aufweist [31]. Basierend auf der Beobachtung, dass Inkubation mit Genistein den Kanalstrom auf Ganzzelebene vermindert, wurde angenommen, dass Tyrosinkinasen die Aktivität von L-Typ-Calciumkanälen erhöhen [29-31, 41]. Diese Berichte müssen allerdings mit Vorsicht betrachtet werden. Tatsäch-

lich kann Genistein den L-Typ-Calciumkanal durch direkte Bindung an seine extrazelluläre Oberfläche hemmen und so die genannten Versuche möglicherweise entsprechend beeinflusst haben [51, 52]. In unserer Arbeit kann dieser unspezifische kanalblockierende Effekt von Genistein keine Rolle spielen, denn die von uns verwendete cell-attached Patch-Clamp-Konfiguration verhindert den Zugang von Teststoffverbindungen zum L-Typ-Calciumkanal aus dem Extrazellularraum.

Zur Untermauerung der mit Genistein gewonnenen Ergebnisse führten wir eine zusätzliche Versuchsreihe mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PP1 durch. PP1 ist in der von uns verwendeten Konzentration ein im Vergleich mit Genistein potenterer und zudem selektiver Inhibitor von Tyrosinkinasen der Src-Familie, allerdings wird auch die Aktivität anderer Tyrosinkinasen, z.B. die der EGFR, reduziert [53]. Wichtig ist, dass PP3, ein strukturell verwandtes aber inaktives PP1-Analogon, keinen Effekt auf das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten erkennen ließ.

Sowohl Genistein als auch PP1 führten zu einem signifikanten Anstieg des durchschnittlichen Maximalstromes des L-Typ-Calciumkanals, bedingt durch signifikante Steigerungen von Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit. Dabei war der Anstieg der Offenwahrscheinlichkeit einerseits auf eine Verlängerung der Offenzeiten und damit eine Zunahme der mittleren Offenzeit und andererseits auf eine Steigerung des Modus 2-Schaltverhaltens zurückzuführen. Bemerkenswert ist, dass Modus 2-Schaltverhalten in humanen ventrikulären Kardiomyozyten nur selten beobachtet wurde [49]. Dies weist darauf hin, dass ein beträchtlicher Unterschied in der Feinabstimmung der Einzel-L-Typ-Calciumkanal-Schalteigenschaften zwischen humanen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten besteht.

Obwohl von uns unspezifische Effekte von Genistein und PP1 auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität nicht ausgeschlossen werden können, erscheint dieses jedoch unwahrscheinlich, denn beide Stoffe hatten trotz unterschiedlicher Strukturen vergleichbare Effekte auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität. Dies legt einen gemeinsamen Aktionsmechanismus nahe [32, 40, 50]. Ein weiteres Argument ist, dass die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in Versuchen mit PP3, einem strukturverwandten, jedoch inaktiven PP1-Analogon, nicht beeinflusst wird. Die

beobachteten Ergebnisse mit Genistein und PP1 liegen wahrscheinlich an ihren Tyrosinkinase-inhibierenden Wirkungen, und es lässt sich daher schlussfolgern, dass Tyrosinkinasen zu einer Hemmung der Aktivität von L-Typ-Calciumkanälen führen, und zwar durch eine Kombination von inhibitorischen Effekten auf Offenwahrscheinlichkeit und Verfügbarkeit.

Es stellte sich die Frage, ob der inhibitorischen Wirkung von Tyrosinkinasen auf den L-Typ-Calciumkanal möglicherweise ein stimulatorischer Effekt von Tyrosinphosphatasen im Sinne eines Regelkreises entgegensteht.

Zur Beantwortung dieser Frage benutzten wir bpVanadat. Peroxovanadatverbindungen sind die potentesten zurzeit bekannten Phosphotyrosinphosphatase-Inhibitoren [54] und zeigten beachtliche inhibitorische Effekte auf die Tyrosinphosphatase in Rinderherzen [55]. In unseren Untersuchungen wurde die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität durch den Tyrosinphosphatase-Inhibitor bpVanadat gemindert, was das Konzept einer reziproken Regulation der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in humanen atrialen Kardiomyozyten durch Tyrosinphosphatasen und Tyrosinkinasen der Src-Familie unterstützt.

Die in unseren Experimenten gewonnenen Daten weisen zum ersten Mal darauf hin, dass Tyrosinkinasen der Src-Familie das Schaltverhalten von Einzel-L-Typ-Calciumkanälen in humanen atrialen Kardiomyozyten inhibieren.

4.2 Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen, durch die Tyrosinkinasen der Src-Familie das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in humanen atrialen Kardiomyozyten regulieren

Es wurde gezeigt, dass Tyrosinkinasen den L-Typ-Calciumkanal-Strom in Neuronen durch Phosphorylierung von Tyrosin, wie es z.B. in der α_1 -Untereinheit des Kanals vorkommt, modulieren [56]. Es ist vorstellbar, dass solch eine direkte Regulation des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens auch in kardialen Myozyten stattfindet. Zusätzlich interferieren Tyrosinkinasen möglicherweise mit in die Regulation des L-Typ-Calciumkanal-Stroms einbezogenen Signaltransduktionswegen.

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die aktivitätssteigernden Effekte von Genistein und PP1 auf das Einzel-L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in unseren Versuchen ähnlich den Effekten sind, welche nach Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) [22, 26, 27] oder Inhibition von Serin-/Threonin-Phosphatasen in ventrikulären Kardiomyozyten von Meerschweinchen [21] zu beobachten waren. Es kann also die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Tyrosinkinasen der Src-Familie die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in menschlichen Vorhofherzzellen durch Interaktion mit PKA- oder Phosphatase Typ 1 und 2a- regulierten Signalwegen inhibieren.

Um dieser Frage nachzugehen, analysierten wir zunächst die Auswirkungen einer PKA-Hemmung bzw. einer PKA-Aktivierung auf die Genisteineffekte am L-Typ-Calcium-Einzelkanal. Dabei führte Genistein trotz Präinkubation der Vorhofmyozyten mit dem PKA-Inhibitor Rp-8-CPT-cAMPs zu einer Aktivitätssteigerung am Einzel-L-Typ-Calciumkanal mit signifikanten Anstiegen von Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit. Daraus schließen wir, dass eine Hemmung von PKA nicht wesentlich zur Suppression der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität durch Tyrosinkinasen beiträgt. Erwartungsgemäß [22, 49] kam es durch Anwendung von 8Br-cAMP zu einem signifikanten Anstieg der Kanalaktivität. Darüber hinaus führte zusätzliche Applikation von Genistein zu einer weiteren signifikanten Aktivitätssteigerung mit Zunahme von Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit.

Die Genisteineffekte wurden also durch gleichzeitige Stimulation oder Hemmung von PKA nicht berührt. Folglich bedeuten unsere Daten, dass Tyrosinkinasen das Schaltverhalten von L-Typ-Calciumkanälen in humanen atrialen Kardiomyozyten PKA-unabhängig modulieren. Natürlich schließen diese Ergebnisse nicht die Möglichkeit aus, dass Tyrosinkinasen durch Erhöhung der Sensitivität ungeblockter Kanäle auf β -adrenerge Stimulation eine wichtige Rolle in der Regulation der β -adrenergen Empfindlichkeit des Herzens spielen [33, 34].

Das von marinen Dinoflagellaten produzierte Toxin Okadasäure ist ein Proteinphosphatase-Inhibitor mit erhöhter Selektivität für die Phosphatase Typ 2a [24]. Um einen eventuell bestehenden Zusammenhang zwischen Tyrosinkinasewirkung und Serin-/Threonin-Phosphatase-regulierten Signalwegen zu untersuchen, analysierten wir die Wirkung von Genistein an mit Okadasäure präinkubierten humanen atrialen Kardiomyozyten. Dabei verwendeten wir Okadasäure in einer Konzentration von 10^{-6} M, für welche eine hemmende Wirkung auf die Proteinphosphatasen Typ 1 und 2a nachgewiesen ist [24]. Trotz dieser Hemmung kam es nach Gabe von Genistein zu einer signifikanten Steigerung von Maximalstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit gegenüber den Kontrollmessungen.

Es ist daher anzunehmen, dass die inhibitorischen Tyrosinkinasewirkungen auch nicht durch eine Interaktion zwischen Tyrosinkinasen und Serin-/Threonin-Phosphatasen zustande kommen.

In der jüngeren Zeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei der Regulation des Ganzzell-L-Typ-Calciumkanal-Stromes in humanen atrialen Kardiomyozyten eine Kooperation von Tyrosinkinasen und Proteinkinase C (PKC) bestehen könnte [32].

Um die Rolle von PKC bei der Regulation des Einzel-L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens durch Tyrosinkinasen näher zu beleuchten, untersuchten wir daher zunächst die Auswirkungen einer Aktivierung mit dem unspezifischen PKC-Stimulator PMA. Bei den Kardiomyozyten mit PKC-Aktivierung durch Präinkubation mit PMA kam es dabei nach Genisteingabe weiterhin zu einem signifikanten Anstieg von Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrscheinlichkeit. Durch dieses Ergebnis wird eine Interaktion zwischen PKC und Tyrosinkinasen bei der L-Typ-Calciumkanal-Regulation allerdings weder widerlegt noch bestätigt.

PMA wird weithin als direkter unspezifischer PKC-Aktivator verwendet [57, 58]. Außerdem induziert PMA die Expression von iNOS und aktiviert die Calcium-ATPase in Rattenlebern [59]. Die Aktivierung der Calcium-ATPase könnte die intrazelluläre Calciumhomöostase durch Calcium-abhängige Inaktivierung der L-Typ-Calciumkanäle beeinflussen. Dagegen spricht, dass in unserer Studie die Zellen mit BAPTA-AM, einem Chelator von intrazellulärem Calcium, inkubiert wurden. Ferner wurde Barium als Ladungsträger des L-Typ-Calciumkanals benutzt. Für alle Effekte von PMA auf die Calcium-ATPase-Aktivität und die intrazelluläre Calciumhomöostase müsste eine Beeinflussung der Kontrollaufnahmen, genauso wie die der Aufnahmen nach Tyrosinkinase-Hemmung, erwartet werden.

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion von Tyrosinkinase und PKC betrachteten wir die Genisteineffekte auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in humanen Vorhofherzzellen nach vorheriger PKC-Hemmung mittels Staurosporin. Staurosporin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Indolocarbazole. Bemerkenswerterweise unterblieb in Gegenwart des Staurosporins in einer Konzentration von 10^{-7} M nach Genisteingabe die erwartete Steigerung der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in Form eines Anstieges von Maximalstrom, Verfügbarkeit oder Offenwahrscheinlichkeit. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir nach Inhibition von PKC mittels 10^{-6} M Bisindolylmaleimid (BIS), auch hier kam es nach Genisteingabe zu keinem Anstieg der Aktivität.

Diese Ergebnisse sind konform mit den Beobachtungen von Boixel et al. an humanen atrialen Kardiomyozyten [32]. Untersuchungen an Herzvorhofzellen der Katze durch Wang und Lipsius hingegen zeigten keinen Einfluss einer PKC-Inhibition auf den Genisteineffekt auf den Calciumkanal-Strom [28]. Dies liegt möglicherweise an einer Regulation des Calciumkanal-Stroms durch in humanen und feline Kardiomyozyten unterschiedliche Tyrosinkinase-Isoformen. In Rattenastrozyten destabilisiert Staurosporin das auf Aktin/Myosin basierende Zytoskelett [60]. Es ist möglich, dass das die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität reduziert und die β -adrenerge L-Typ-Calciumkanal-Stimulationsfähigkeit vermindert [61]. In einer früheren Untersuchung an humanen atrialen Kardiomyozyten wurde der stimulatorische Effekt von Isoproterenol auf den L-Typ-Calciumkanal-Strom durch Staurosporin nicht reduziert [32]. Auch eine mögliche Hemmung des Genisteineffekts statt durch Staurosporin über einen Ge-

nisteineffekt auf PKC ist unwahrscheinlich, da die verwendete Genisteinkonzentration weit unter der für eine PKC-Blockade nötigen Konzentration ($ID_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$) liegt [50].

Zusätzlich zu Staurosporin haben wir als anderen PKC-Inhibitor BIS benutzt. In der von uns eingesetzten Konzentration ist BIS ein potenter Hemmstoff verschiedener PKC-Subtypen [62]. BIS hemmt nicht Tyrosinkinasen, könnte aber einen inhibitorischen Effekt auf PKA haben [63]. Wir konnten aber in unserer Studie zeigen, dass PKA nicht zur Modulation der Tyrosinkinase-Effekte beiträgt.

Insgesamt liegt es daher nahe anzunehmen, dass die PKC für die inhibitorischen Effekte von Tyrosinkinasen auf das Schaltverhalten des Einzel-L-Typ-Calciumkanals erforderlich ist.

Unsere Studie war nicht darauf ausgerichtet zu erklären an welcher Stelle genau diese Interaktion besteht. Bereits in früheren Studien wurde vermutet, dass zwischen der Src-Familie der Tyrosinkinasen und PKC ein komplexer Zusammenhang besteht [64-67]. PKCs werden nach ihrer molekularen Struktur und dem Aktivationsmodus in „konventionelle“ (alpha α , beta β_{1+2} , gamma γ), „neuartige“ (delta δ , epsilon ϵ , mu μ , theta θ , eta η) und „atypische“ (zeta ζ , tau τ /lambda λ) PKCs eingeteilt [68]. Ping et al. fanden zwei Mitglieder der Src-Familie der Tyrosinkinasen, Lck und Src, als Ziele von PKC- ϵ [69]. Es wurde berichtet, dass PKC- ϵ in Herzmuskelzellen mit den Src-Familienmitgliedern Lck bzw. Src interagiert, sie phosphoryliert und aktiviert. PKC- ϵ und Lck bzw. Src bilden dabei eine funktionelle Einheit, die möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Wirksamkeit verschiedener kardioprotektiver Mechanismen am Herzen spielt. [64, 65, 67]. Auf der anderen Seite wurde von Crosby und Poole gezeigt, dass bestimmte PKC-Isoformen wie PKC- δ , PKC- ϵ oder PKC- λ an Tyrosinresiduen phosphoryliert werden, wobei z.B. die Aktivierung von PKC- δ von der Fyn-Src-Tyrosinkinasen-Aktivierung abhängt [66].

Nach Untersuchungen von Torsoni et al. an Rattenkardiomyozyten vereinen sich Src-Kinasen mit fokaler Adhäsionskinase (FAK) als Teil eines Multiproteinsignalkomplexes [70]. Ein FAK/Src-Kinase-Signalkomplex ist möglicherweise an der Regulation des L-Typ-Calciumkanals glatter Muscularis mucosae-Zellen des Kaninchencolons beteiligt [41]. PKC- ϵ aktiviert eventuell zusätzlich FAK in ventrikulären Rattenherzmuskelzellen [71].

Zukünftige Studien sollten die Interaktionen zwischen Tyrosinkinasen der Src-Familie, PKC und FAK auf molekularer Basis untersuchen und ihre Rolle in der Regulation des L-Typ-Calciumkanals genauer bestimmen.

Es ist nicht auszuschließen, dass die in unserer Studie eingesetzten Substanzen unspezifische Effekte auf Tyrosinkinase-Hemmung oder PKC-Aktivierung/-Inhibition ausüben. Um dieses Problem anzugehen, verwendeten wir eine weite Palette von Aktivatoren und Inhibitoren. So benutzten wir Genistein, PP1, bpVanadat und PP3, um die Rolle von Tyrosinkinasen zu erkunden. PMA, Staurosporin und BIS setzten wir zur Untersuchung der Rolle von PKC ein. Die experimentellen Daten, die wir mit diesen verschiedenen Substanzen erhielten, stimmten überein. Daher ist es unwahrscheinlich, dass nicht-spezifische Effekte zu unseren Ergebnissen und Schlussfolgerungen beigetragen haben.

Alle eingesetzten Substanzen wurden in Wasser oder DMSO gelöst, wobei die DMSO-Konzentration in der Badlösung 1,1 % nicht überschritt. In sechs von uns durchgeführten Experimenten zum möglichen Einfluss von 1,1 %igem DMSO auf die L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Aktivität ergaben sich dabei für die wichtigsten Parameter Verfügbarkeit (Kontrolle $67,0 \pm 8,5$ %; DMSO $66,3 \pm 8,5$ %) und Offenwahrscheinlichkeit (Kontrolle $5,1 \pm 1,4$ %; DMSO $5,1 \pm 1,5$ %) keine signifikanten Unterschiede.

Zum Erhalt eines optimalen Signal-Rausch-Verhältnisses erfolgte in unseren Versuchen die Zugabe von Genistein, PP1, PP3, bpVanadat und 8Br-cAMP in die Badlösung jeweils als Bolus. Folglich sind die Konzentrationen dieser Stoffe auf dem zellulären Level nicht exakt zu bestimmen. Allerdings wurde bisher auch in anderen Studien [14, 26, 72, 73] immer eine niedrige Varianz des Effekts auf das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten beobachtet, weshalb angenommen werden kann, dass sich in den einzelnen Experimenten die Konzentrationen der Testsubstanzen auf zellulärer Ebene nicht biologisch signifikant unterschieden. Überdies schätzten wir durch die Benutzung eines Diffusionsmodells [74] die Zeit, die eine Substanz braucht, um die Zielkonzentration auf dem zellulären Level zu erreichen, welche im Bereich von Minuten liegt.

Die Diagnosen Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern galten als Ausschlusskriterien, da beide Erkrankungen sowohl mit einer Abnahme des Calciumganzzellstromes als auch mit Verände-

rungen des Einzel-L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens einhergehen [8-11, 13]. Zur Verifizierung dieser Diagnosen richteten wir uns nach den Ergebnissen von Herzechokardiographie und/oder Herzkatheteruntersuchung bzw. der dort ermittelten kardialen Auswurffraktion und EKG. Für die Diagnose KHK war kein Einfluss auf die Messungen zu erwarten, bei Klappenvitien kann dies jedoch aufgrund von hämodynamisch bedingten Veränderungen am Myokard nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Leider war es nicht immer möglich eine lückenlose Anamnese zu erheben. Auch kann, im Gegensatz zu Experimenten am Tiermodell, bei Versuchen an humanen Geweben unmöglich eine Konstanzhaltung aller Parameter bis auf den einen zu variierenden Faktor gewährleistet werden. Beeinflussungen der Messungen durch unbekannte Faktoren sind daher nicht ausgeschlossen.

4.3 Klinische Bedeutung

Sowohl bei der Herzinsuffizienz als auch bei chronischem Vorhofflimmern weist der kardiale L-Typ-Calciumkanal eine pathologische Aktivität auf [8-11, 13]. Genaueres Wissen über die intrazelluläre Modulation des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens führt daher zu einem besseren Verständnis von Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern und könnte in Zukunft möglicherweise zu einer neuen medikamentösen Therapieoption dieser Erkrankungen in Form von Tyrosinkinase-Modulatoren führen.

5 Zusammenfassung

Der L-Typ-Calciumkanal spielt eine wichtige Rolle bei der Erregungs-Kontraktions-Kopplung und bei der Aktivierung von Calcium-abhängigen Signalübertragungswegen zum Wachstum und Überleben von Herzmuskelzellen [3, 75, 76]. Veränderungen des L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhaltens in humanen atrialen Kardiomyozyten wurden bei verschiedenen pathologischen Zuständen beobachtet. Beispiele hierfür sind neben der latenten Hyperthyreose [12] auch Vorhofflimmern [8-11] und chronische Herzinsuffizienz [49]. Daher ist es wichtig, die Regelkreisläufe, durch die die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in humanen atrialen Kardiomyozyten kontrolliert wird, zu entschlüsseln.

Der Effekt von Tyrosinkinasen auf das Schaltverhalten des L-Typ-Calciumkanals in intakten humanen atrialen Kardiomyozyten war vor Beginn der vorliegenden Arbeit nicht geklärt.

Frühere Studien über die Rolle von Tyrosinkinasen bei der Kontrolle von L-Typ-Calciumkanal-Aktivität in Herzmuskelzellen führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Basierend auf diesen, in Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen aus tierischem Gewebe gewonnenen Daten war es nicht möglich, Vorhersagen über die Rolle von Tyrosinkinasen bei der Kontrolle der Aktivität von L-Typ-Calcium-Einzelkanälen in humanen atrialen Kardiomyozyten zu treffen.

In unserer Studie verwendeten wir die cell-attached Einzelkanal-Patch-Clamp-Technik an humanen atrialen Kardiomyozyten von Patienten mit Operationen am offenen Herzen, um die Rolle von Tyrosinkinasen in der Kontrolle der L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Aktivität zu untersuchen, um Untergruppen von Tyrosinkinasen zu identifizieren, die die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität kontrollieren, und um potentielle Zusammenhänge zwischen Tyrosinkinasen und Proteinphosphatasen, Proteinkinase A und Proteinkinase C zu erforschen.

Wir kamen dabei zu folgenden Ergebnissen:

Der unspezifische Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein und der Src-Familien-selektive Tyrosinkinase-Inhibitor PP1 steigerten signifikant Spitzenstrom, Verfügbarkeit und Offenwahrschein-

lichkeit, wobei letzteres auf einen signifikanten Anstieg von mittlerer Offenzeit und Modus 2-Schaltverhalten zurückzuführen war. Umgekehrt führte der Tyrosinphosphatase-Inhibitor bpVanadat zu einer Hemmung der L-Typ-Calciumkanal-Aktivität, was die Vermutung nahe legt, dass das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in humanen atrialen Kardiomyozyten reziprok durch Tyrosinkinasen und -phosphatasen kontrolliert wird. Proteinkinase A-Stimulation durch 8Br-cAMP oder -Inhibition mittels Rp-8-CPT-cAMPs oder auch Inhibition der Serin-/Threonin-Phosphatasen Typ 1 und 2a durch Okadasäure zeigten keinen Einfluss auf die Effekte von Genistein auf die L-Typ-Calciumkanal-Aktivität. Dieses lässt den Schluss zu, dass Tyrosinkinasen das L-Typ-Calciumkanal-Schaltverhalten in humanen atrialen Kardiomyozyten unabhängig von Proteinkinase A und Proteinphosphatase Typ 1 und 2a hemmen.

Inhibition von Proteinkinase C mit Hilfe von Staurosporin oder Bisindolylmaleimid dagegen verhinderte die stimulatorischen Genisteineffekte auf den L-Typ-Calciumkanal, was auf einen Bedarf an Proteinkinase C für die inhibitorischen Effekte von Tyrosinkinasen auf die L-Typ-Calcium-Einzelkanal-Aktivität schließen lässt.

Tyrosinkinasen der Src-Familie inhibieren also die Aktivität von Einzel-L-Typ-Calciumkanälen in humanen atrialen Kardiomyozyten über Proteinkinase C-abhängige, aber Proteinkinase A- und Proteinphosphatase Typ 1 und 2a-unabhängige, molekulare Wege.

6 Literaturverzeichnis

1. Catterall W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Calcium channels*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: 521-55
2. Catterall W.A., Striessnig J., Snutch T.P., Perez-Reyes E., *International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: Calcium channels*. Pharmacol Rev, 2003. **55**: 579-81
3. Kamp T.J., Hell J.W., *Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C*. Circ Res 2000. **87**: 1095-102
4. Mc Donald T.F., Pelzer S., Trautwein W., Pelzer D.J., *Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells*. Physiol Rev, 1994. **74**: 365-507
5. Hatem S.N., Benardeau A., Rücker-Martin C., Marty I., de Chamisso P., Villaz M., et al., *Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes*. Circ Res 1997. **80**: 345-53
6. Li G.R., Nattel S., *Properties of human atrial I_{Ca} at physiological temperatures and relevance to action potential*. Am J Physiol 1997. **272**: H227-35
7. Lipscombe D., *L-type calcium channels: Highs and new lows*. Circ Res 2002. **90**: 933-35
8. Bosch R.F., Zeng X., Grammer J.B., Popovic K., Mewis C., Kühlkamp V., *Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation*. Cardiovasc Res 1999. **44**: 121-31
9. Nattel S., *Ionic determinants of atrial fibrillation and Ca²⁺- channel abnormalities. Cause, consequence, or innocent bystander?* Circ Res 1999. **85**: 473-6
10. Van Wagoner D.R., Pond A.L., Lamorgese M., Rossie S.S., McCarthy P.M., Nerbonne J.M., *Atrial L-type Ca²⁺- currents and human atrial fibrillation*. Circ Res 1999. **85**: 428-36
11. Klein G., Schröder F., Vogler D., Schaefer A., Haverich A., Schiefer B., et al., *Increased open probability of single cardiac L-type calcium channels in patients with chronic atrial fibrillation: role of Phosphatase 2A*. Cardiovasc Res 2003. **59**: 37-45
12. Kreuzberg U., Theissen P., Schicha H., Schröder F., Mehlhorn U., de Vivie E.R., et al., *Single-channel activity and expression of atrial L-type Ca²⁺- channels in patients with latent hyperthyroidism*. Am J Physiol 2000. **278**: H723-30
13. Le Grand B., Hatem S., Deroubaix E., Couetil J.P., Coraboeuf E., *Depressed transient outward and calcium currents in dilated human atria*. Cardiovasc Res 1994. **28**: 548-56
14. Chen-Izu Y., Xiao R.P., Izu L.T., Cheng H., Kuschel M., Spurgeon H., et al., *G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca²⁺- channels*. Biophys J 2000. **79**: 2547-56
15. Zhao H., Matsuoka S., Fujioka Y., Noma A., *Effects of dopamine on L-type Ca²⁺ current in single atrial and ventricular myocytes of the rat*. Br J Pharmacol 1997. **121**: 1247-54

16. Weiss S., Doan T., Bernstein K.E., Dascal N., *Modulation of cardiac Ca²⁺ channel by G_q-activating neurotransmitters reconstituted in Xenopus oocytes.* J Biol Chem 2004. **279**: 12503-10
17. Wellner-Kienitz M.C., Bender K., Meyer T., Pott L., *Coupling to G_s and G_(q/11) of histamine H₂ receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes.* Biochim Biophys Acta 2003. **1642**: 67-77
18. Liu S., Schreuer K.D., *G protein-mediated suppression of L-type Ca²⁺ current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes.* Am J Physiol 1995. **268**: C339-49
19. Takahashi E., Fukuda K., Miyoshi S., Muruta M., Kato T., Ita M., et al., *Leukemia inhibitory factor activates cardiac L-Type Ca²⁺ channels via phosphorylation of serine 1829 in the rabbit Cav1.2 subunit.* Circ Res 2004. **94**: 1242-8
20. Abernethy D.R., Schwartz J.B., *Calcium-antagonist drugs.* N Engl J Med 1999. **341**: 1447-57
21. Wiechen K., Yue D.T., Herzig S., *Two distinct functional effects of protein phosphatase inhibitors on guinea-pig cardiac L-type Ca²⁺- channels.* J Physiol 1995. **484**: 583-92
22. Klein G., Drexler H., Schröder F., *Protein kinase G reverses all isoproterenol induced changes of cardiac single L-type calcium channel gating.* Cardiovasc Res 2000. **48**: 367-74
23. Schröder F., Klein G., Fiedler B., Bastein M., Schnasse N., Hillmer A., et al., *Single L-type Ca⁽²⁺⁾ channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKG I transgenic mice.* Cardiovasc Res 2003. **60**: 268-77
24. Herzig S., Meier A., Pfeiffer M., Neumann J., *Stimulation of protein phosphatases as a mechanism of the muscarinic-receptor-mediated inhibition of cardiac L-type Ca²⁺- channels.* Pflügers Arch 1995. **429**: 531-8
25. Sims C., Chiu J., Harvey R.D., *Tyrosine phosphatase inhibitors selectively antagonize β-adrenergic receptor-dependent regulation of cardiac ion channels.* Mol Pharmacol 2000. **58**: 1213-21
26. Yue D.T., Herzig S., Marban E., *β-Adrenergic stimulation of calcium channels occurs by potentiation of high-activity gating modes.* Proc Natl Acad Sci USA 1990. **87**: 753-7
27. Schröder F., Herzig S., *Effects of β₂-adrenergic stimulation on single-channel gating of rat cardiac L-type calcium channels.* Am J Physiol 1999. **276**: H834-43
28. Wang Y.G., Lipsius S.L., *Genistein elicits biphasic effects on L-type Ca²⁺- current in feline atrial myocytes.* Am J Physiol 1998. **275**: H204-12
29. Yokoshiki H., Sumii K., Sperelakis N., *Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analogon daidzein.* J Mol Cell Cardiol 1996. **28**: 807-14
30. Katsube Y., Yokoshiki H., Nguyen L., Yamamoto M., Sperelakis N., *Inhibition of Ca²⁺- current in neonatal and adult rat ventricular myocytes by the tyrosine kinase inhibitor, genistein.* Eur J Pharmacol 1998. **345**: 309-14
31. Ogura T., Shuba L.M., McDonald T.F., *L-type Ca²⁺- current in guinea pig ventricular myocytes treated with modulators of tyrosine phosphorylation.* Am J Physiol 1999. **276**: H1 724-33

32. Boixel C., Tessier S., Pansard Y., Lang-Lazdunski L., Mercadier J.J., Hatem S.N., *Tyrosine kinase and protein kinase C regulate L-type Ca²⁺- current cooperatively in human atrial myocytes*. Am J Physiol 2000. **278**: H670-6
33. Hool L.C., Middleton L.M., Harvey R.D., *Genistein increases the sensitivity of cardiac ion channels to β -adrenergic receptor stimulation*. Circ Res 1998. **83**: 33-42
34. Belevych A.E., Nulton-Persson A., Sims C., Harvey R.D., *Role of tyrosine kinase activity in α -adrenergic inhibition of the β -adrenergically regulated L-type Ca²⁺- current in guinea-pig ventricular myocytes*. J Physiol 2001. **537**: 779-92
35. Robinson D.R., Wu Y.-M., Lin S.-F., *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. Oncogene 2000. **19**: 5548-57
36. Dell'Era P., Ronca R., Coco L., Nicoli S., Metra M., *Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development*. Circ Res 2003. **93**: 414-20
37. Detillieux K.A., Sheikh F., Kardami E., Cattini P.A., *Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium*. Cardiovasc Res 2003. **57**: 8-19
38. Giovannone B., Lee E., Laviola L., Giorgino F., Clevel K.A., Smith R.J., *Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-1) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-1 signaling*. J Biol Chem 2003. **278**: 1564-73
39. Yin G., Yan C., Berk B.C., *Angiotensin II signalling pathways mediated by tyrosine kinases*. Int J Biochem Cell Biol 2003. **35**: 780-3
40. Levitzki A., Gazit A., *Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development*. Science 1995. **267**: 1782-8
41. Hu X.Q., Singh N., Mukhopadhyay D., Akbarali H.I., *Modulation of voltage-dependent Ca²⁺- channels in rabbit colonic smooth muscle cells by c-Src and focal adhesion kinase*. J Biol Chem 1998. **273**: 5337-42
42. Strauss O., Mergler S., Wiederholt M., *Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells*. FASEB J 1997. **11**: 859-67
43. Puri T.S., Gerhardstein B.L., Zhao X.L., Ladner M.B., Hosey M.M., *Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C- mediated phosphorylation of L-type calcium channels*. Biochemistry 1997. **36**: 9605-15
44. Black S.C., Fagbemi S.O., Chi L., Friedrichs G.S., Lucchesi B.R., *Phorbol ester-induced ventricular fibrillation in the Langendorff-perfused rabbit heart: antagonism by staurosporine and glibenclamide*. J Mol Cell Cardiol 1993. **25**: 1427-38
45. Jalili T., Takeishi Y., Song G., Ball N.A., Howles G., Walsh R.A., *PKC translocation without changes in Galphaq and PLC-beta protein abundance in cardiac hypertrophy and failure*. Am J Physiol 1999. **277**: H2298-304
46. Takeishi Y., Ping P., Bolli R., Kirkpatrick D.L., Hoit B.D., Walsh R.A., *Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy*. Circ Res 2000. **86**: 1218-23
47. Fryer R.M., Schultz J.E.J., Hsu A.K., Gross G.J., *Pretreatment with tyrosine kinase inhibitors partially attenuates ischemic preconditioning in rat hearts*. Am J Physiol 1998. **275**: H2009-15
48. Numberger M., Draguhn A., *Patch-Clamp-Technik*. Spektrum Akademischer Verlag 1996. ISBN 3827400236

49. Schröder F., Handrock R., Beuckelmann D.J., Hirt S., Hullin R., Priebe L., et al., *Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle*. *Circulation* 1998. **98**: 969-76
50. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., et al., *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. *J Biol Chem* 1987. **262**: 5592-5
51. Belevych A.E., Warriar S., Harvey R.D., *Genistein inhibits cardiac L-type Ca²⁺-channel activity by a tyrosine kinase-independent mechanism*. *Mol Pharmacol* 2002. **62**: 554-65
52. Chiang C. E., Chen S.A., Chang M.S., Lin C.I., Luk H.N., *Genistein directly inhibits L-type calcium currents but potentiates cAMP-dependent chloride currents in cardiomyocytes*. *Biochem Biophys Res Commun* 1996. **223**: 598-603
53. Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer E.J., et al., *Discovery of a novel, potent, and Src family -selective tyrosine kinase inhibitor*. *J Biol Chem* 1996. **271**: 695-701
54. Posner B.I., Faure R., Burgess J.W., Bevan A.P., Lachance D., Zhang-Sun G., et al., *Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics*. *J Biol Chem* 1994. **269**: 4596-604
55. Zhou X.W., Chen Z., Chen Q.X., Ye J.L., Huang P.Q., Wu Q.Y., *Inhibition effects of some bioactive peroxovanadium complexes on the tyrosine phosphatase*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2000. **32**: 133-8
56. Bence-Hanulec K.K., Marshall J., Blair L.A., *Potentiation of neuronal L calcium channels by IGF-1 requires phosphorylation of the $\alpha 1$ subunit on a specific tyrosine residue*. *Neuron* 2000. **27**: 121-31
57. Xiao G.Q., Mochly-Rosen D., Boutjdir M., *PKC isozyme selective regulation of cloned human cardiac delayed slow rectifier K current*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003. **306**: 1019-25
58. Porter M.J., Heidkamp M.C., Scully B.T., Patel N., Martin J.L., Samarel A.M., *Isoenzyme-selective regulation of SERCA2 gene expression by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes*. *Am J Physiol* 2003. **285**: C39-47
59. Oishi K., Yamaguchi M., *Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate on Ca²⁺-ATPase activity in rat liver nuclei*. *J Cell Biochem* 1994. **55**: 168-72
60. Mobley P.L., Hedberg K., Bonin L., chen B., Griffith O.H., *Decreased phosphorylation of four 20-kDa proteins precedes staurosporine-induced disruption of the actin/myosincytoskeleton in rat astrocytes*. *Exp Cell Res* 1994. **214**: 55-66
61. Malan D., Gallo M.P., Bedendi I., Biasin C., Levi R.C., Alloatti G., *Microtubules mobility affects the modulation of L-type I(Ca) by muscarinic and beta-adrenergic agonists in guinea-pig cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol* 2003. **35**: 195-206
62. Martiny-Baron G., Kazanietz M.G., Mischak H., Blumberg P.M., Kochs G., Hug H., et al., *Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976*. *J Biol Chem* 1993. **268**: 9194-7
63. Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., et al., *The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C*. *J Biol Chem* 1991. **266**: 15771-81

64. Ping P., Song C., Zhang J., Guo Y., Cao X., Li R.C., et al., *Formation of protein kinase C(epsilon)-Lck signaling modules confers cardioprotection*. J Clin Invest 2002. **109**: 499-507
65. Vondriska T.M., Zhang J., Song C., Tang X.L., Cao X., et al., *Protein kinase C ϵ -Src modules direct signal transduction in nitric oxide-induced cardioprotection*. Circ Res 2001. **88**: 1306-13
66. Crosby D., Poole A.W., *Physical and functional interaction between protein kinase C delta and Fyn tyrosine kinase in human platelets*. J Biol Chem 2003. **278**: 24533-41
67. Song C., Vondriska T.M., Wang G.W., Klein J.B., Cao X., Zhang J., et al., *Molecular conformation dictates signaling module formation: example of PKC ϵ and Src tyrosine kinase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002. **282**: H1166-71
68. Kato M., Yamaguchi T., Tachibana A., Kimura H., *Differential role of an atypical protein kinase C, PKC zeta, in regulation of human eosinophil and neutrophil functions*. Int Arch Allergy Immunol 2005. **1**: 27-34
69. Ping P., Zhang J., Zheng Y.T., Li R.C.X., Dawn B., Tang X.-L., et al., *Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits*. Circ Res 1999. **85**: 542-50
70. Torsoni A.S., Constancio S.S., Nadruz Jr. W., Hanks S.K., Franchini K.G., *Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes*. Circ Res 2003. **93**: 140-7
71. Heidkamp M.C., Bayer A.L., Scully B.T., Eble D.M., Samarel A.M., *Activation of focal adhesion kinase by protein kinase C epsilon in neonatal rat ventricular myocytes*. Am J Physiol 2003. **285**: H1684-96
72. Groner F., Rubio M., Schulte-Euler P., Matthes J., Khan I.F., Bodi I., et al., *Single-channel gating and regulation of human L-type calcium channels in cardiomyocytes of transgenic mice*. Biochem Biophys Res Commun 2004. **314**: 878-84
73. Matthes J., Jager A., Handrock R., Groner F., Mehlhorn U., Schwinger R.H., et al., *Ca²⁺-dependent modulation of single human cardiac L-type calcium channels by the calcineurin inhibitor cyclosporine*. J Mol Cell Cardiol 2004. **36**: 241-55
74. Crank J., *The mathematics of diffusion*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1975
75. Frey N., McKinsey T.A., Olson E.N., *Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function*. Nat Med 2000. **6**: 1221-7
76. Fiedler B., Lohmann S.M., Smolenski A., Linnemuller S., Pieske B., Schröder F., et al., *Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 2002. **99**: 11363-8

Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. Frank Schröder danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung während der Entstehung der vorliegenden Dissertation und den stets freundlichen Beistand bei der Lösung auftretender Fragen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Gunnar Klein für den konstruktiven Dialog und die freundliche Unterstützung während der gesamten Arbeitsphase.

Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Wolf-Georg Forssmann danke ich für die akademische Hilfestellung sowie Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit zur Mitnutzung anderer Einrichtungen.

Des Weiteren danke ich besonders Herrn Professor Dr. med. Helmut Drexler für die Bereitstellung der Mittel und die Gelegenheit zur Durchführung meiner Arbeit in der Klinik für Kardiologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Der größte Dank gilt meinen Eltern.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Tanja Kim Frank
Geburtsdatum	14.12.1977
Geburtsort	Göttingen

Schulische Ausbildung:

1984	Manfred-Kyber-Grundschule in Löwenstein
1984-1988	Grundschule Deichhorst in Delmenhorst
1988-1990	Orientierungsstufe West in Delmenhorst
1990-1997	Gymnasium an der Max-Planck-Straße in Delmenhorst
06/1997	Abschluss der Schulzeit mit Abitur

Studium Humanmedizin:

10/1997	Beginn des Studiums an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
09/1999	Ärztlich Vorprüfung Wechsel an die Medizinische Hochschule Hannover
09/2000	Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
03/2003	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
06/2004	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Ausbildung:

07-09/2004	ÄiP an der Klinik für Anästhesiologie, op. Intensivmedizin und spez. Schmerztherapie; Klinikum Bremen-Mitte gGmbH
seit 10/2004	Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie, op. Intensivmedizin und spez. Schmerztherapie; Klinikum Bremen-Mitte gGmbH

Hannover, den 24.06.2007

Publikationen

Originalarbeiten

1. Schröder F, Klein G, Frank T, Bastein M, Indris S, Karck M, Drexler H, Wollert KC.
Src family tyrosine kinases inhibit single L-type-Ca²⁺ channel activity in human atrial myocytes.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2004; 37(3): 735-745

Poster/ Vorträge

1. Frank T, Schröder F, Klein G, Vogler D, Harringer W, Drexler H.
Inhibition of tyrosine kinases increases single L-type calcium channel activity in isolated human atrial myocytes.
25st Meeting of the European Working Group on Cardiac Cellular Electrophysiology. Dresden, Germany 2001
2. Schröder F, Klein G, Frank T, Vogler D, Karck M, Tebbenjohanns J, Drexler H.
Tyrosinkinasen hemmen die Aktivität einzelner L-Typ-Calciumkanäle humaner atrialer Kardiomyozyten.
Z Kardiol 2002; 91 (Suppl.): 1/142
3. Schröder F, Klein G, Frank T, Bastein M, Drexler H.
Tyrosine kinases inhibit availability and open probability of single L-type calcium channels in human atrial myocytes.
J Am Coll Cardiol 2003; 41: 90A

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Tyrosinkinase der Src-Familie inhibieren die Aktivität von L-Typ-Calciumkanälen in humanen atrialen Kardiomyozyten“ in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie im Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Privatdozent Dr. med. F. Schröder ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2004; 37(3): 735-745.

Hannover, den 24.06.2007

Tanja Kim Frank