ETH zürich

ETH Library

Electrophysiological effects of protein kinase C inhibitors on hippocampal pyramidal cells of rat brain explant cultures

Doctoral Thesis

Author(s):
Renner, Pius

Publication date:
1989

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000578441

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Diss. ETH No. 8965

Electrophysiological effects of protein kinase C inhibitors on hippocampal pyramidal cells of rat brain explant cultures

A dissertation submittet to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
PIUS RENNER
dipl. nat. sc. S.F.I.T.
born August 7th, 1959
citizen of Hospental, UR

accepted on the recommendation of
Prof. P.G. Waser, examiner
Prof. K. Winterhalter, co-examiner
PD Dr. C.G. Caratsch, co-examiner

1989

Summary

Protein kinase C (PKC), a calcium and phospholipid dependent kinase, plays an important role in the regulation of several cellular processes. This enzyme is activated through the second messenger diacylglycerol (DG) which is one of the products of phosphoinositide hydrolysis. PKC has its highest concentration in the brain. Some of the important physiological functions of PKC in the central nervous system have already been demonstrated. PKC is involved in neuronal processes such as neurotransmitter release, changes in the conductances of cellular membranes, long-term potentiation, etc.

Most of these studies investigating possible functions of PKC have been performed using activators and inhibitors of this enzyme. Tumor promoting phorbol esters have been found to be potent activators of PKC. Inhibitors of PKC are thought to act either by binding to the regulatory site or to the catalytic site of the kinase. In 1984 H-7, a weak inhibitor, and recently some new, more potent inhibitors with K_i-values in the nanomolar range, namely staurosporine, K-252a, K-252b, KT5822 and KT5720, have been identified. However, all these compounds lack specifity for PKC because they also inhibit other kinases such as cAMP-dependent kinase, cGMP-dependent kinase and calcium/calmodulin-dependent kinases.

In the present study we have tested the potency of the mentioned inhibitors of PKC to block effects induced by the phorbol ester TPA on CA3 hippocampal pyramidal cells of organotypic explant cultures. Previous electrophysiological studies have shown that various phorbol esters abolish the slow afterhyperpolarization (slow a.h.p.) which develops during repetitive discharge of hippocampal

neurons. Simultaneously the accommodation of cell discharge, another property of pyramidal cells, which is partly due to the slow a.h.p., is blocked. We have now confirmed that TPA is able to block the slow a.h.p. and the accommodation in our explant culture system.

Furthermore, we have shown that, when applied to the bath solution in the micromolar range, especially H-7 but also staurosporine and the K-252 compounds evoke in hippocampal explant cultures epileptiform activities, which are characterized by long depolarization shifts accompanied with a strong increase in membrane conductance and followed by a long hyperpolarization. These bursts made it impossible to determine any inhibitory action of H-7 on PKC.

Among the other compounds tested, only staurosporine could counteract the activation of PKC by TPA in a satisfactory way. Staurosporine prevented the TPA-induced blockade of the slow a.h.p. already at a concentration of 100 nM. The K-252 compounds used in concentrations that did not evoke epileptiform activities could hardly inhibit TPA actions on the slow a.h.p. TPA effects on the accommodation of cell discharge were biphasic and therefore it was difficult to discriminate between the effects induced by the phorbol ester and those induced by the inhibitors.

From our results and from the finding that the K-252 compounds but not staurosporine compete with the ATP binding site of the PKC we suggest that staurosporine and the K-252 compounds have different mode of actions on the PKC. A high intracellular concentration of ATP may therefore prevent inhibitory actions of the K-252 compounds.

Zusammenfassung

Die Protein Kinase C (PKC) ist eine Kalzium- und Phospholipid-abhängige Kinase. Sie hat eine wichtige Funktion in der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen. Dieses Enzym wird aktiviert durch Diacylglycerol (DG), welches bei der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat entsteht. Einige wichtige Funktionen der PKC im Zentralnervensystem, wo dieses Enzym in den höchsten Konzentrationen vorliegt, wurden bereits nachgewiesen. Die Protein Kinase C ist an neuronalen Funktionen wie Freisetzung von Neurotransmittern, Änderungen der Membranleitfähigkeiten, Lang-Zeit-Potenzierung, usw beteiligt.

Zur Untersuchung der Funktionen der PKC wurden in vielen Studien Aktivatoren und Inhibitoren dieses Enzyms verwendet. Als gut wirksame Aktivatoren der PKC erwiesen sich Substanzen aus der Gruppe der Phorbolester. Unter den Inhibitoren haben vor allem H-7 und später stärker wirksame Substanzen wie Staurosporin, K-252a, K-252b, KT5822 und KT5720 eine gewisse Bedeutung erlangt. All diese Verbindungen hemmen aber auch andere Kinasen: die cAMP-abhängige Kinase, die cGMP-abhängige Kinase und die Kalzium/Calmodulin-abhängige Kinase, d.h. diese Substanzen sind nicht spezifisch für die PKC.

In der vorliegenden Studie haben wir untersucht, inwiefern die oben erwähnten Inhibitoren der PKC fähig sind, Effekte des Phorbolesters TPA auf CA3 Pyramidenzellen des Hippocampus in organotypischen Gewebskulturen zu antagonisieren. Frühere elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass verschiedene Phorbolester die langsame Nachhyperpolarisation und die Akkommodation in Neuronen

des Hippocampus blockieren. Unser Befund ergab, dass TPA auch in unserem Zellkultursystem einen Effekt auf diese beiden Parameter hat.

Zudem konnten wir zeigen, dass, wenn diese Inhibitoren in mikromolaren Konzentrationen verabreicht werden, speziell H-7, aber auch Staurosporin und die K-252-Verbindungen Epilepsie-artige Entladungen der Neuronen verursachen. Diese Zellentladungen waren gekennzeichnet durch eine lange Depolarisation der Neu-rone, welche verbunden war mit einer starken Erhöhung der Membranleitfähigkeit und gefolgt war von einer langen Hyperpolarisation. Die Ableitungen der Neurone wurde durch diese Entladungen derart erschwert, dass es im Falle von H-7 nicht möglich war, inhibitorische Effekte dieser Substanz nachzuweisen. Unter den anderen untersuchten Inhibitoren war nur Staurosporin fähig, TPA-Effekte auf Pyramidenzellen zu blockieren. Staurosporin verhinderte die TPA-induzierte Blockade der langsamen Nachhyperpolarisation bereits in einer Konzentration von 100 nM. In Konzentrationen in denen sie noch keine Epilepsie-artige Entladungen verursachten, konnten die K-252-Verbindungen TPA-Effekte nicht antagonisieren. TPA zeigte einen biphasischen Effekt auf die Akkommodation von CA3 Neuronen. Aus diesem Grunde war es schwierig, die Wirkungen, die durch diesen Phorbolester verursacht wurden, von den Wirkungen zu unterscheiden, die durch die Inhibitoren induziert wurden.

Aus unseren Resultaten und aus dem Befund, dass zwar die K-252-Verbindungen nicht aber Staurosporin sich kompetitiv zu ATP verhalten, schliessen wir, dass die K-252-Verbindungen und Staurosporin unterschiedliche inhibitorische Wirkungsmechanismen an der PKC haben. Die in der Zelle vorhandene hohe Konzentration an ATP könnte nämlich eine Wirkung der K-252-Verbindungen vermindern.