

Stefan Lichte  
Dr. med.

## **Phosphorylierung der Proteinkinase C in der akuten Myokardischämie**

Geboren am 19.11.1967 in Tübingen  
Reifeprüfung am 02.06.1987 in Tübingen  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90 bis SS 1998  
Physikum am 13.09.1991 an der Universität Tübingen  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 12.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktormutter: Prof.Dr.med. Ruth H. Strasser

Myokardiale Ischämie bewirkt Veränderungen der Signaltransduktion, die äußere Reize ins Innere der Zelle übersetzt. Dabei spielt die Enzymfamilie Proteinkinase C (PKC) eine herausragende Rolle: Sie moduliert im Herzen über Ionenkanäle elektrophysiologische Abläufe, beeinflusst den kontraktilem Apparat und beschleunigt Genexpression. Sie ist zentraler Bestandteil verschiedener Rezeptorsysteme und Signaltransduktionskaskaden .

In der akuten Myokardischämie (1 Minute) kommt es zur reversiblen Translokation der PKC-Isozyme  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , und  $\zeta$  vom Zytosol an die Membran. Sie gilt als indirekter Parameter einer PKC-Aktivierung. Nach 30 Minuten Myokardischämie befinden sich PKC- $\alpha$  und  $\zeta$  in Zytosol und Membran auf Kontrollniveau, während PKC- $\delta$  und PKC- $\epsilon$  eine spezifische Zunahme im Zytosol zeigen. Dabei steigt auch deren Genexpression an. Die Mechanismen für diese differentielle Regulation sind unbekannt.

PKC-Phosphorylierung gilt als direkter Parameter einer PKC-Aktivität und führt zu Veränderungen der Membranaffinität. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine PKC-(Auto)Phosphorylierung stattfindet.

Als Modell dienten isoliert perfundierte Rattenherzen. Sie wurden zunächst mit freiem radioaktivem  $^{32}\text{P}$  Phosphat perfundiert, um den intrazellulären ATP-Pool zu markieren. Anschließend wurden sie entweder einer Ischämie ausgesetzt oder mit PKC-aktivierendem Phorbolster perfundiert. Aus den Plasmamembranen wurde das entsprechende PKC-Isozym mit spezifischen Antikörpern durch Immunpräzipitation aufgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Dieser Blot konnte dann sowohl autoradiographisch, als auch mit Hilfe spezifischer Antikörpern in einer Westernblot-Analyse ausgewertet werden. Alle Untersuchungen erfolgten unter strengen Kautelen des radioaktiven Arbeitens mit möglichst hoher Phosphataktivität.

Im Rahmen der Vorarbeiten für diese Experimente wurde zunächst gezeigt, daß radioaktiv phosphorylierte PKC mit spezifischen Antikörpern in der Westernblotanalyse als Protein detektabel bleibt. Dabei gelang in-vitro der Nachweis einer Autophosphorylierung rekombinanter PKC- $\alpha$  nach PKC-Aktivierung durch Phorbolster. Die spezifische PKC-Immunpräzipitation konnte dann an C<sub>6</sub>-Zellen erprobt werden. Es gelang damit erstmals, radioaktiv phosphorylierte PKC aus der Plasmamembran spezifisch mittels Immunpräzipitation zu isolieren und im Westernblot darzustellen.

Um PKC-Phosphorylierungsstellen durch spezielle Antikörper gegen die möglichen phosphorylierten Aminosäuren Threonin, Serin oder Tyrosin differenzieren zu können, war in weiteren Vorarbeiten die Konstruktion von Positivkontrollen notwendig. Dazu wurden die entsprechenden synthetisch phosphorylierten Aminosäuren mit Hilfe eines Esterbindungsverfahrens an Albumin gekoppelt. Die Evaluation der Phospho-Antikörper mit diesen Positivkontrollen erbrachte eine gute Trennschärfe.

Die Experimente mit isoliert perfundierten Rattenherzen zeigten nach PKC-Aktivierung (Phorbolster für 10 Minuten) in der Plasmamembran insbesondere eine PKC- $\delta$  - Phosphorylierung. Deshalb konzentrierten sich die weiteren Versuche auf PKC- $\delta$ . Insgesamt findet sich nach PKC-Aktivierung eine Zunahme der Phosphorylierung um den Faktor 12 (n=9).

Nach 5 Minuten Ischämie findet sich in der Plasmamembran isoliert perfundierter Rattenherzen ein signifikanter Zuwachs der PKC- $\delta$  - Phosphorylierung um +83% (n=3), der nach 30 Minuten ein hohes Plateau erreicht (+219%/ n=9) und nach 45 Minuten auf das Kontrollniveau zurückfällt (+27%/ n=3).

Die Phosphorylierungszunahme gilt als direkter Parameter der Aktivierung. Dies paßt zum Mengenzuwachs von PKC- $\delta$  in der Plasmamembran, der als indirektes Zeichen für eine Aktivitätszunahme gewertet wird. Ferner wird allgemein eine Abnahme der Membranaffinität nach PKC-Phosphorylierung beschrieben. Damit liefert die PKC-Phosphorylierung, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, eine mögliche Erklärung für den Rückgang der translozierten PKC- $\delta$  in der prolongierten Ischämie und die zytosolische Mengenzunahme der PKC- $\delta$  nach 30 Minuten Myokardischämie.

Die Differenzierung der Phosphorylierungsstellen mit Phospho-Antikörpern glückte aus technischen Gründen nur bei *einem* Versuch mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Tyrosin. Dort zeigte sich eine basale Tyrosin-Phosphorylierung der PKC- $\delta$ , die nach 5 Minuten Ischämie zunimmt und nach 30 bzw. 45 Minuten wieder abfällt. Nach Phorbolster-Stimulation findet sich nur ein leichter Tyrosin-

Phosphorylierungsanstieg. Damit gibt diese Arbeit Hinweise für eine PKC-Regulation in den ersten 5 Minuten der Myokardischämie durch eine unbekannte Tyrosinkinase.

Erstmals konnte also im intakten Organ eine PKC-Phosphorylierung beobachtet werden. Zusätzlich ist dies die erste PKC-Phosphorylierung, die im Rahmen der Myokardischämie gezeigt wurde.