

Catherine Dohet

Dr.med.

Rekonstitution gehäuteter Herzmuskelfasern mit rekombinantem kardialem humanem Troponin I und Troponin C - Zur Bedeutung der Phosphorylierung des Troponin I mittels cAMP-abhängiger Proteinkinase A

Geboren am 19.01.1971 in Bergisch Gladbach

Reifeprüfung am 19.5.1990 in Weinheim an der Bergstraße

Studiengang der Medizin vom WS1990 bis WS1997

Physikum am 08.09.1992 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg/Montpellier

Praktisches Jahr in Brüssel/San Diego/Heidelberg

Staatsexamen am 24.11.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. J.C. Rüegg

Nach Extraktion von Troponin I aus gehäuteten demembraniserten Herzmuskelfasern (sogenannten skinned-fibres) wird dieses durch humanes rekombinantes Troponin I ersetzt, das durch Punktmutationen verändert wurde. Die Rekonstitution mit Wildtyp Proteinen stellt die Ca^{2+} -Sensitivität des Gewebes wieder her. Die Einführung negativer Ladungen mittels Mutation der Serinreste an der Position 22 und 23 des humanen Troponin I zu Aspartat führt zu einer Abnahme der Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktile Strukturen. Dies äußert sich in einer charakteristischen Veränderung der Beziehung zwischen Ca^{2+} -Konzentration und Kraft in gehäuteten Fasern mit ATP als einziger Energiequelle. Es werden fast doppelt so hohe Ca^{2+} -Konzentrationen benötigt, um die Fasern halbmaximal zu aktivieren. Dieser Effekt tritt jedoch nur auf, wenn beide Serinreste im kardiospezifischen N-Terminus von Troponin I durch Aspartat ersetzt werden. Durch Einführung negativer Ladungen mittels Mutation der Serinreste in Aspartat kann die Phosphorylierung des Troponin I an dieser Stelle imitiert werden, denn Phosphorylierung der entsprechenden Serinreste durch Proteinkinase A senkt bekanntermaßen die Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktile Proteine. Die Mutation nur eines

Serinreste in Aspartat oder beider Serinreste in Alanin zeigt keinen Effekt. Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung zweier negativer Ladungen und somit der Phosphorylierung beider Serinreste in dieser Domäne des Troponin I-Moleküls für die Veränderung der Ca^{2+} -Sensitivität im dünnen Filament. Im Wesentlichen scheint die Ca^{2+} -Sensitivitätsänderung sowohl durch Phosphorylierung als auch durch Mutation in negativ geladene Aspartatreste durch einen elektrostatischen Effekt bedingt zu sein. Diese Ladungsänderung könnte weiterhin die Konformation der kardiospezifischen N-terminalen Extension des Troponin I verändern und somit zu einer Abschwächung Interaktion von Troponin I und Troponin C führen. Gleichzeitig kann gezeigt werden, daß diese Ca^{2+} -Sensitivitätsänderung unabhängig von der Phosphorylierung des C-Proteins auftritt. Dies unterstreicht die Bedeutsamkeit der Troponin I Phosphorylierung im Rahmen der β -adrenergen Stimulation. Sie soll zu einer beschleunigten Relaxation beitragen. Verantwortlich hierfür sind sowohl die Erhöhung der Ca^{2+} -Off-Rate als auch die Erniedrigung der Ca^{2+} -Sensitivität, da für die Relaxation so die Ca^{2+} -Konzentration geringfügiger gesenkt werden muß.