

Felix Laube
Dr. med.

Einfluss von S100A1 auf die Funktion der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Patrick Most

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Funktion von S100A1 in Endothelzellen und seiner Regulation durch einen NO-vermittelten Mechanismus.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildeten Studien von Pleger und Desjardins, die zeigten, dass S100A1 in Endothelzellen IP₃R-vermittelte Kalziumströme verstärkt. Dies führt *in vitro* zu einer erhöhten NO-Freisetzung und *in vivo* zu einem hypertensiven Phänotyp bei SKO^{-/-} Mäusen. Die von Most gefundene Kollokalisaiton von S100A1 und eNOS deutet zudem auf eine direkte Modulation der Funktion von eNOS hin.

Da eNOS unter physiologischen Bedingungen das vorherrschende Enzym der endothelialen NO-Freisetzung ist, wurde untersucht, ob S100A1 eNOS durch eine unmittelbare Bindung aktiviert. Außerdem sollte untersucht werden, ob diese Interaktion von S100A1 und eNOS durch NO reguliert wird und ob hohe intrazelluläre NO-Spiegel die Genexpression von S100A1 vermindern.

Diese Fragestellungen wurden anhand eines *in vitro* Modelles isolierter aortaler Endothelzellen der Maus sowie kardialer Endothelzellen der Ratte bearbeitet. Die Eignung beider Zelltypen im Hinblick auf ihre endotheliale Identität und die Expression der zu untersuchenden Proteine wurde durch den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von PECAM-1 (CD31), S100A1 und eNOS gesichert.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass S100A1 die Aktivität von eNOS durch eine unmittelbare molekulare Interaktion steigert. Es konnte eine Kollokalisierung der beiden Proteine in Endothelzellen nachgewiesen werden. Im zellfreien Milieu verstärkte die Zugabe von rekombinantem S100A1 die Aktivität von eNOS in Anwesenheit von CaM, in geringerem Maße auch in dessen Abwesenheit. Die Bindung von S100A1 und eNOS war kalziumabhängig und wurde durch exogenes NO aufgehoben.

Zudem konnte gezeigt werden, dass NO die Genexpression von S100A1 in zeit- und dosisabhängiger Weise verringert. Hierbei wurde eine Suppression von S100A1 mRNA und Protein nach Stimulation mit den synthetischen NO-Donoren GSNO und SNP beobachtet. Gleichzeitig führte die pharmakologische Inhibition der endogenen NO-Freisetzung mit L-NAME zu einer Induktion von S100A1. Dieser Effekt von NO wurde durch die die Inhibition von sGC mit ODQ aufgehoben, jedoch nicht durch die Blockade der Transkription mit AD.

Des Weiteren konnte die Funktion von S100A1 für die NO-Homöostase und damit für die Biologie von Endothelzellen weiter charakterisiert werden. S100A1 verstärkt die NO-Freisetzung von eNOS durch mindestens drei verschiedene Mechanismen: Erstens durch erhöhte IP₃-R-vermittelte Kalziumtransienten, zweitens durch verstärkte Interaktion von CaM mit eNOS und drittens durch eine direkte Aktivierung von eNOS. Zudem konnte eine negative Regulation der Funktion und Genexpression von S100A1 durch NO nachgewiesen werden. Da NO der zentrale Regulator der Endothelzellfunktion ist, tragen die hier vorliegenden Daten zum besseren Verständnis der Molekularbiologie dieses Zelltyps bei. Diese Ergebnisse haben möglicherweise klinische Bedeutung, da die

verminderte Freisetzung von NO aus Endothelzellen mit zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist.

Diese Arbeit liefert damit die Grundlage für weitere Studien, in denen endotheliales S100A1 als Ansatzpunkt für innovative Strategien in Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen evaluiert werden sollte.