

Kristin Silvia Spaich  
Dr. med.

## **S100A1-C-Peptid – ein neuer Ansatz in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz**

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. P. Most

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion der c-terminalen Domäne des kalziumbindenden Proteins S100A1. Vor dem Hintergrund einer verminderten Expression von S100A1 im insuffizienten Myokard und einem daraus resultierenden kompromitierten Kalziumkreislauf im Sinne systolischer und diastolischer Funktionsstörungen des sarkoplasmatischen RYR2 und der Kalziumpumpe SERCA2a, wurde die Hypothese untersucht, ob S100A1<sub>ct</sub> alleine in der Lage ist, die positiv inotropen und antiarrhythmischen Effekt des nativen Proteins S100A1 zu imitieren und als zentraler Regulator korrigierend in die myokardiale Kalziumhomöostase einzugreifen. Um möglichst konkret und präzise auf die definierte Fragestellung eingehen zu können, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten verwendet, die nach einem modifizierten Protokoll von Piper et al. isoliert wurden. Nach einer einheitlichen 2-3 stündigen Ruhephase wurde das synthetisch hergestellte C-Peptid (S100A1<sub>ct</sub>) zu der Zellsuspension in den Kulturschalen hinzugefügt. Ausgangspunkte bildeten die Experimente zur Membranpermeation und zur Dosis-Wirkungsbeziehung von S100A1<sub>ct</sub>. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass S100A1<sub>ct</sub> in nicht gehäutete Herzmuskelzellen penetriert. Bei einer Konzentration von 1µM zeigte S100A1<sub>ct</sub> den stärksten Effekt in Bezug auf die Kalziumtransientenamplitude. Nachdem im Anschluss durch die Analyse einer Zeitreihe ein maximaler Effekt der Kalziumtransientenamplitude durch S100A1<sub>ct</sub> nach 20 Minuten festgestellt werden konnte, definierte man diese Zeitspanne in den folgenden Experimenten als Standard-Inkubationszeit. Mit Hilfe dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Verbesserung der kardialen Funktion durch die extrazelluläre Applikation von S100A1<sub>ct</sub> nachgewiesen werden. Die Inkubation mit S100A1<sub>ct</sub> führte zu einer signifikanten Steigerung der systolischen und diastolischen Funktion gesunder ventrikulärer Herzmuskelzellen. Grundlage für diesen dualen Wirkeffekt von S100A1<sub>ct</sub> war die Steigerung der Kalziumtransientenamplitude, die Steigerung der Kontraktilität im Sinne einer gesteigerten prozentualen lastfreien Verkürzung der Kardiomyozyten und die signifikant reduzierte Kalzium-Spark-Frequenz. Als molekulares Korrelat der erhöhten Kalziumtransientenamplitude konnte schon in früheren Daten eine Modulation des Ryanodin-Rezeptors (RYR2) und eine gesteigerte Aktivität der

sarkoplasmatischen SERCA2a durch den Einfluss von S100A1<sub>ct</sub> identifiziert werden. Somit ist davon auszugehen, dass die gesteigerten Kalziumtransienten die Ursache für den signifikant erhöhten kontraktile Status der Kardiomyozyten sind. In weiterführenden Experimenten konnten ein signifikant erhöhter SR-Ca<sup>2+</sup>-Gehalt gemessen werden, der einerseits mit der kalziumabhängigen Interaktion von S100A1<sub>ct</sub> mit der SERCA2a und andererseits mit dem biphasischen ebenfalls kalziumabhängigen Bindungsverhalten von S100A1<sub>ct</sub> mit dem RYR in Einklang zu bringen ist. Ferner zeigten die entsprechenden Messungen unter Stimulation der ventrikulären Kardiomyozyten mit Isoproterenol, dass die positiv inotrope Wirkung von S100A1<sub>ct</sub> additiv und unabhängig von der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade abläuft. Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe der Western Blot-Technik auf Proteinebene verifiziert werden. Eine verstärkte Phosphorylierung von Zielproteinen des  $\beta$ -adrenergen Systems, wie Phospholamban und Troponin I blieb nach S100A1<sub>ct</sub>-Zugabe aus. Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich detaillierter mit der Struktur-Wirkungsbeziehung des S100A1<sub>ct</sub>. Hierfür wurden bei der Firma Eurogentec einzelne Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Länge synthetisiert, um anschließend das jeweilige Verhalten einer Aminosäuresequenz in der definierten Konzentration von 1  $\mu$ M nach 20-minütiger Inkubation auf die Kalziumtransientenamplitude zu untersuchen. Dieses Vorgehen brachte die Erkenntnis, dass DKDDPP-YVVLVAALTVA (aa 75-85) das therapeutische Profil von S100A1 bzw. S100A1<sub>ct</sub> trägt und den positiv inotropen und antiarrhythmischen Effekt von S100A1 nachahmen kann. Damit stellt dieses Peptid möglicherweise einen Meilenstein in der Entwicklung einer S100A1<sub>ct</sub>-Peptidtherapie dar. Der langfristige Einsatz positiv inotrop wirkender Medikamente, wie die parenterale Applikation von  $\beta$ -AR-Agonisten oder die orale Gabe von PDE-Hemmern, die die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade über cAMP und die PKA maßgeblich beeinflussen, erhöht der aktuellen Studienlage nach die Wahrscheinlichkeit für Ca<sup>2+</sup>-getriggerte ventrikuläre Arrhythmien und bringt damit verbunden eine gesteigerte Mortalitätsrate mit sich (Katz, 1986; Overgaard and Dzavik, 2008). Eine balancierte Kalziumzirkulation, auf der direkten, kalziumabhängigen S100A1-Interaktion mit dem RYR2 und der SERCA2a basierend, sorgt hingegen für eine verbesserte Pumpleistung des Herzmuskels ohne dabei mit schädlichen Effekten einherzugehen. Optimale Versuchsbedingungen müssen nun die Basis für weitere Studien bilden, um die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Aminosäuresequenz genauer analysieren zu können.