

Carmen Eicher

Dr. med.

Extrazelluläre Wirkung des kalziumbindenden Proteins S100A1 auf den programmierten Zelltod und den Kalziumstoffwechsel in ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte

Geboren am 28.12.1979 in Eberbach

(Staats-)Examen am 26.10.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. H.A. Katus

Hintergrund dieser Arbeit ist die Beobachtung der Freisetzung von S100A1 Protein aus Herzmuskelzellen während des ischämischen Herzinfarktes. Dabei wird eine maximale Serumkonzentration von einem bis zwei Mikromol erreicht. Bisherige Untersuchungen zu S100A1 beschäftigten sich vor allem mit den Effekten der intrazellulären Überexpression. Ob auch extrazelluläres S100A1 eine Wirkung auf Kardiomyozyten ausübt und welcher Mechanismus dem zugrunde liegt, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die in dieser Studie verwendete S100A1 Konzentration orientierte sich dabei an der freigesetzten Menge während eines Myokardinfarktes.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass S100A1 kalziumabhängig über einen endozytotischen Mechanismus in Kardiomyozyten aufgenommen wird. Auch wenn der genaue molekulare Aufnahmemechanismus, sei er rezeptorvermittelt oder pinozytotisch, nicht vollständig geklärt werden konnte, zeigten die Lokalisationsstudien, dass S100A1 Protein Clathrin-vermittelt in das Kompartiment der sog. „early endosomes“ aufgenommen wird. Mit dem endosomalen Kompartiment sind viele Proteine der Rezeptortyrosinkinase- und G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion assoziiert. Durch Fokussierung auf diese Signalproteine, konnte nachgewiesen werden, dass S100A1 spezifisch eine Signalkaskade aktiviert, die über die Phospholipase C (PLC), die Proteinkinase C (PKC), die MAP - Kinase - Kinase 1 (MEK 1) und die extrazellulär regulierte Proteinkinase 1/2 (ERK 1/2) verläuft. Diese ERK 1/2 Aktivierung ließ sich sowohl durch kalziumfreies Medium, als auch durch Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose verhindern. Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass es für die spezifische

Aktivierung der ERK 1/2 Signalkaskade der endozytotische Internalisierung von S100A1 Protein bedarf.

Als funktionelle Parameter der Einflussnahme von S100A1 auf Kardiomyozyten wurden der Kalziumstoffwechsel und die Apoptoserate untersucht. Dass eine Aktivierung von ERK 1/2 über unterschiedliche Signaltransduktionswege einen Schutz vor Apoptose darstellt, ist schon in vielen Veröffentlichungen dargelegt worden. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass extrazelluläres S100A1 eine antiapoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten ausübt. Die Überlebensrate S100A1 behandelter Herzmuskelzellen war nach Zugabe eines Stoffes zur Apoptoseinduktion beträchtlich gesteigert war. Die Bestimmung spezifischer Apoptoseindikatoren wie Cytochrom C, Mitochondriale Dehydrogenase und Caspase 3 untermauerten dieses Ergebnis zusätzlich. Dieser antiapoptotische Effekt konnte durch Inhibition des ERK 1/2 Signaltransduktionsweges verhindert und extrazelluläres S100A1 Protein somit als neuer kardioprotektiver Faktor identifiziert werden. Möglicherweise wird S100A1 während myokardialer Ischämie über einen kalzium- oder tubulin-abhängigen Sekretionsmechanismus freigesetzt, ähnlich wie für andere S100 Proteine bereits beschrieben. Weitere Analysen müssen die Frage einer reinen schädigungsbedingten Freisetzung und/oder einer basalen Sekretion des Proteins klären. Mittlerweile konnten Untersuchungen der Apoptoserate im transgenen Tiermodell zeigen, dass diese nach Infarktinduktion bei S100A1 überexprimierenden Tieren geringer ausfällt als bei Kontrolltieren. Des Weiteren zeigten S100A1 knockout Tiere eine beträchtliche Steigerung der Apoptoserate. Diese Erkenntnisse zeigen erstmals die in vivo Relevanz dieser in vitro durchgeführten Studie.

Zusätzlich zu dem antiapoptotischen Effekt von S100A1 lieferten die Untersuchungen des Kalziumcyclings eine Steigerung der Kalziumamplitude, die durch eine Reduktion des diastolischen Kalziumgehaltes in den Kardiomyozyten erreicht wurde. Dies steht im Gegensatz zu S100A1 überexprimierenden Herzmuskelzellen, die eine Erhöhung der Amplitude durch größere systolische Kalziumwerte erreichen. Unter Blockade der wichtigsten Kanäle der Kalziumhomöostase konnte herausgefunden werden, dass exogen aufgenommenes S100A1 durch Aktivierung des Natrium-kalziumaustauschers den sarkolemmalen Kalziumtransport steigert. Die Signalkaskade über welche S100A1 diesen Effekt vermittelt, konnte auf die Phospholipase C (PLC) und die Proteinkinase C (PKC) eingeschränkt werden. Darüber hinaus zeigten S100A1 behandelte Kardiomyozyten eine regel-mäßigeren und höhere Schlagfrequenz als Kontrollzellen. Diese Effekte können jedoch nicht im herkömmlichen Sinne als positiv chronotrop bezeichnet werden, da im transgenen Tier kein Einfluss von S100A1 auf die Herzfrequenz nachgewiesen werden konnte. Vielmehr

kann postuliert werden, dass dieser Effekt wiederum durch eine Aktivitätssteigerung des Natriumkalziumaustauschers vermittelt wird, da dieser maßgeblich für die Generierung der Eigenfrequenz in neonatalen Kardiomyozyten verantwortlich ist.

Die Daten dieser Arbeit liefern zusammengefasst den ersten Nachweis, dass extrazelluläres S100A1 eine Wirkung auf Kardiomyozyten ausübt. Im Rahmen seiner Internalisierung wirkt es antiapoptotisch und greift modulierend in den Kalziumstoffwechsel ein. Da Kardiomyozyten die basalen kontraktilen Elemente des Herzmuskels darstellen, könnte seine antiapoptotische Wirkung additiv zu seiner intrazellulären positiv inotropen Wirkung sein. Die in vivo Relevanz dieser Hypothese muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden und könnte zeigen, dass neben einer S100A1 Gentherapie auch die Applikation des Proteins therapeutisch wirksam sein könnte.