Mechanismus der endothelialen Freisetzung von Parathyroidhormon-related Peptide (PTHrP) und seine funktionelle Relevanz

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Juliana Sokolova

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen Betreuer: Prof. Dr. M. Diener

und

dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Mechanismus der endothelialen Freisetzung von Parathyroidhormon-related Peptide (PTHrP) und seine funktionelle Relevanz

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Eingereicht von Juliana Sokolova Tierärztin aus Sofia (Bulgarien)

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation:

26.10.2005

gewidmet an meinem Großvater Prof. Dr. L. Diakov

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	4
1.1 Einführung in die Thematik	4
1.2 Wirkungen von PTHrP im kardiovaskulären System	9
1.3 Fragestellung	11
2 Material	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Antikörper	14
2.3 Geräte und Laborbedarf	15
2.3.1 Zellkultur	15
2.3.2 SDS-Gelelektrophorese	15
2.3.3 Sonstige Geräte	16
2.3.4 Verbrauchsmaterial	16
2.4 Auswertung	17
3 Methoden	18
3.1 Flow-Map-Studie	18
3.1.1 Patienten	18
3.1.2 Durchführung	19
3.2 in vitro Experimente	20
3.2.1 Versuchstiere	20

3.2.2 Präparation und Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus	
dem Rattenherzen (Pieper et al. 1990); Passage der	
mikrovaskulären Endothelzellen	20
3.2.3 Präparation und Kultivierung vaskulärer Glattmuskelzellen aus der	
Kaninchenaorta; Passage der vaskulären Glattmuskelzellen	23
3.2.4 Inkubation, Zellernte und Proteinfällung der Zellüberstände	23
3.2.4.1 Inkubation und Zellernte von Endothelzellen und	
Glattmuskelzellen	23
3.2.4.2 Proteinfällung der Zellüberstände	25
3.2.5 Kernextraktion	26
3.3 Versuche zur PTHrP-Freisetzung an isoliert perfundierten	
Rattenherzen	27
3.4 Analytische Methoden	29
3.4.1 Vorbereitung und Proteinfällung der Plasmaproben	29
3.4.2 SDS-Gelelektrophorese	29
3.4.3 Blotverfahren	32
3.4.3.1 Westernblot	32
3.4.3.2 Dot Blot	33
3.4.4 Immunologischer Nachweis von PTHrP	34
3.5 Statistik	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Druck- und Flußabhängige PTHrP-Freisetzung in vivo (Flow-MAP-	
Studie)	37
4.1.1 Patientencharakteristik und PTHrP-Plasma-Konzentration	37
4.1.2 Subgruppen-Analyse der jungen Patienten mit PHT	40
4.1.3 Systemische und lokale PTHrP-Konzentrationsunterschiede bei	
Responder und Non-Responder	44
4.1.4 Einfluß einer Sauerstoff-Inhalation auf die PTHrP-Freisetzung bei	
Responder-Patienten	47

4.1.	5 Einfluß einer Ilomedin-Therapie auf die PTHrP-Freisetzung bei	
	Responder-Patienten	52
4.1.	6 PTHrP-Freisetzung und Druckverhältnisse in der linken	
	Pulmonalarterie bei Non-Responder-Patienten	54
4.1.	7 Einfluß einer lokalen Acetylcholin-Applikation auf die Flußwerte in	
	der A. pulmonalis und auf die PTHrP-Freisetzung bei Responder	
	und Non-Responder	56
4.2 P	THrP-Freisetzung in vitro	
4.2.	1 Einfluß von Ionomycin auf die PTHrP-Freisetzung aus koronaren	
	Endothelzellen	58
4.2.	2 Einfluß von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung aus koronaren	
	Endothelzellen	59
4.2.	3 Einfluß von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung aus kultivierten	
	Glattmuskelzellen	61
4.2.	4 Einfluß von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung an isoliert	
	perfundierten Rattenherzen	62
4.3 B	eziehung von endothelialer Wachstumsregulation und PTHrP-	
F	reisetzung	64
4.3.	1 Einfluß der p42 MAP-Kinase-Aktivität auf die PTHrP-Freisetzung	
	aus koronaren Endothelzellen	64
4.3.	2 Einfluß von Phenylephrin auf die PTHrP-Freisetzung	65
4.4 P	THrP-Isoformen und deren Verteilung in der koronaren Endothelzelle	67
4.4.	1 PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle	67
4.4.	2 Einfluß eines N-Glykosylierungs-Hemmer (Tunicamycin) auf den	
	Gehalt an PTHrP-Isoformen und deren Verteilung in der koronaren	
	Endothelzelle	68
4.4.	3 Einfluß eines p42 MAP-Kinase-Hemmers (PD98059) auf den	
	Gehalt an PTHrP-Isoformen und deren Verteilung in der koronaren	
	Endothelzelle	71

5 Diskussion

5.1 Hauptbefunde	73
5.2 Mechanosensitive Freisetzung von PTHrP bei Patienten mit	
pulmonaler Hypertonie	74
5.3 Endotheliale Synthese von PTHrP und Regulation seiner Freisetzung	77
5.4 Intrazelluläre Verteilung von PTHrP	79
5.5 Pathophysiologische Relevanz der Befunde	83
6 Zusammenfassung	85
7 Summary	87
8 Literatur	89
9 Danksagung	99
10 Erklärung	100

Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzungen

Volumenprozent
Gewichtsprozent
Acrylamid/Bisacrylamid
Alkalische Phosphatase
Ammoniumpersulfat
Arterial Peak Velocity
Aqua bidestilata
1,2-Bis-(2-aminophenoxyethane)N,N,N,N-
tetraacetic acid
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bovines Serumalbumin
Grad Celsius
zyklisches Adenosinmonophosphat
Koronare Endothelzellen
Zentimeter
Ethylendiamintetraacetat
Fötales Kälberserum
Gramm
Stunden
n-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure

Verzeichnis der Abkürzungen

HR	Herzfrequenz		
IU	Internationale Einheit		
llo	llomedin		
kD	Kilodalton		
I	Liter		
М	Mol		
hâ	Mikrogramm		
μΙ	Mikroliter		
mM	milimolar		
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule		
mg	Milligramm		
min	Minuten		
ml	Milliliter		
MW	Mittelwert		
nm	Nanometer		
nM	Nanomolar		
NBT	Nitro Blue Tetrazolium		
NCS	Neonatales Kälberserum		
n.s.	Nicht signifikant		
O ₂	Sauerstoff		
PA	Pulmonalarterie		
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese		
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung		
PE	Phenylephrin		
рН	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -		

Verzeichnis der Abkürzungen

	Konzentration
PTH	Parathormon
PTH1R	PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1
PTHrP	Parathyroidhormone-related peptide
SA	Systemarterie
SD	Standartabweichung
SDS	Natriumduodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
ТСА	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N – Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/Min	Umdrehungen pro Minute
Ve	Vena cava superior
VS.	versus
VSMC	vaskuläre Glattmuskelzellen

1.1 Einführung in die Thematik

Die Isolierung des Parathormon verwandten Peptids "parathyroid hormone-related peptide" (PTHrP) im Jahr 1987 war das Ergebnis einer langjährigen Suche nach dem Faktor, der für das Krankheitsbild der malignen assozierten Hyperkalzämie (MAH) verantwortlich ist - eines der häufigsten paraneoplastischen Syndrome. Dieses Peptidhormon wurde erstmals aus Tumorgewebe extrahiert und identifiziert (MOSELEY et al. 1987; STREWLER et al.1987; MANGIN et al. 1988; SUVA et al. 1987).

Im Gegensatz zur dem Parathormon, welches ausschließlich von der Nebenschilddrüse gebildet und freigesetzt wird, wird PTHrP unter physiologischen Bedingungen in einer Vielzahl von unterschiedlichen Körperzellen und –geweben expremiert, wie z.B. in der Haut, im Knochenmark, im Hypothalamus, im zentralen Nervensystem oder auch im kardiovaskulären System. Darüber hinaus ist es auch für eine normale Skelettentwicklung von großer Bedeutung (KARAPLIS 1994).

PTHrP und PTH weisen eine signifikante Homologie innerhalb der ersten 13 Aminosäureresten des N-terminalen Abschnittes auf. In der nachfolgenden Region (14-34) sind nur drei Aminosäurereste identisch. Oberhalb diesen Abschnittes sind die Sequenzen vollkommen unterschiedlich. Deswegen ist PTHrP in der Lage viele Wirkungen von PTH, die durch diesen N-terminalen Abschnitt ausgelöst werden, zu imitieren (HORIUCHI et al. 1987; YATES et al. 1988; EVERHART-CAYE et al. 1996).

Die obengenannten PTH-ähnlichen Effekte von PTHrP werden über den klassischen PTH1-Rezeptor (PTH1-R) vermittelt, an den beide Peptidhormone binden und diesen auch aktivieren können. Die Region 15-34 beider Peptide fungiert hierbei als

Bindungsdomäne für den gemeinsamen PTH1-R, obwohl wie oben bereits erwähnt beide Peptide in diesem Abschnitt nur eine geringe Ähnlichkeit aufweisen. Somit kann angenommen werden, daß beide Peptide trotz der unterschiedlichen Bindungsdomänen eine ähnliche Konformation beispielsweise in ihrer Tertiärstruktur in diesem Abschnitt aufweisen. Allerdings scheinen auch die mittregionalen bzw. die C-terminalen Regionen beider Peptide biologische Aktivität zu besitzen, welche allerdings nicht über diesen Rezeptor vermittelt werden (KOVACS et al. 1996; WU et al. 1996; POTTS et al. 1997).

Der PTH1-R gehört zur Gruppe der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem auch die Rezeptoren für Sekretin, Kalzitonin und Glukagon (JUPPNER 1999).

Der gemeinsame PTH1-R wird nicht nur in den klassischen Zielorganen des Parathormons exprimiert (Niere und Knochen), sondern kommt auch in verschiedenen anderen Organen vor, wie beispielsweise am Herzen auf den Kardiomyozyten. Neben dem klassischen PTH1-R wurde noch ein zweiter PTH-Rezeptor identifiziert. Dieser Rezeptor wird speziesabhängig von PTH aber nicht von PTHrP aktiviert (USDIN et al. 1997).

Eine Aktivierung des PTH1-R kann prinzipiell zwei second-messenger Signalwege aktivieren: einmal den Adenylat Zyklase/Protein Kinase A-(AC/PKA)-Signalweg oder aber den Phospholipase C/Protein Kinase C-(PLC-PKC)-Signalweg (SEGRE et al. 1996; POTTS et al. 1997), wobei der AC/PKA-Signalweg über die ersten 7 Aminosäuren beider Peptide an ihrem N-terminalen Ende und der PLC/PKC-Signalweg über die Abschnitte 28-34 (PTH) und 107-111 (PTHrP) aktiviert wird. Welcher von beiden Signalwegen gewählt wird ist von den Zielzellen abhängig.

Der AC/PKA-Signalweg ist von entscheidender Bedeutung für die Kalziumregulation in den klassischen Zielorganen des Parathormons, wie den Knochen und den Nieren, in diesen kann PTHrP die PTH-Effekte imitieren, so kann es beispielsweise die renale tubuläre Rückresorption von Kalzium und die osteoklastische Knochenresorption steigern. Außerdem verstärkt PTHrP in der Niere die Phosphatsekretion durch

Hemmung der tubulären Rückresorption und es erhöht die Aktivität der 1α-Hydroxylase in den renalen Tubuluszellen, welche die Bildung von 1,25-Dihydroxy-(OH)₂-Cholekalziferol aus 25-Hydroxy-(OH)-Cholekalziferol katalysiert (HORIUCHI et al. 1987).

Trotz ihrer N-terminalen Homologie und ihre gemeinsamen kalziotropen Eigenschaften handelt es sich bei PTH und PTHrP um Produkte unterschiedlicher Gene, die sich in ihren Aufbau und chromosomalen Lokalisation deutlich voneinander unterscheiden. Das humane Gen, welches für PTHrP kodiert, ist viel größer und komplexer als das PTH-Gen. Es enthält neun Exons und drei Promotorregionen.

Beim Menschen können je nach Zelltyp durch Modifikation 12 unterschiedlich große initiale Splicevarianten und 3 unterschiedliche Translationsprodukte unterschieden werden (SOUTHBY et al. 1996). Aus den eigentlichen Translationsprodukten entstehen durch proteolytische Spaltung durch Enzyme der Prohormon-Konvertase-Familie und durch Glykosylierung verschiedene biologisch aktive Teilpeptide: ein N-terminales Fragment (PTHrP 1-36), welches eine strukturelle Ähnlichkeit zu PTH aufweist, ein mittregionales (PTHrP 38-94) und ein C-terminales Teilpeptid (PTHrP 107-139; SOIFER et al. 1992, BURTIS et al. 1992, ORLOFF et al. 1993). Jedes Teilpeptid besitzt eigene biologische Eigenschaften und wirkt möglicherweise über unterschiedliche Rezeptoren (siehe oben).

Neben den PTH-ähnlichen Wirkungen auf die Kalziumhomöostase haben die N-terminalen PTHrP-Fragmente auch andere regulatorische Eigenschaften in den einzelnen Organen, die über den PTH1-R vermittelt werden. Gut untersucht ist beispielsweise die Rolle von PTHrP als Entwicklungs-, Differenzierungs- und Wachstumsfaktor in Knochen, Haut und Brustdrüse. Auch in der Entwicklung von der Niere und des kardiovaskulärem System ist PTHrP von entscheidender Bedeutung (DAVICCO et al. 1993, CAMPOS et al. 1991, WYSOLMERSKI et al. 1994 und 1996). Im Knorpel z.B. reguliert PTHrP das enchondrale Wachstum, indem es die

<u>Einleitung</u>

Differenzierung und die Proliferation der Chondrozyten beeinflußt und es beteiligt sich somit an der Ausbildung des Skeletts (KARAPLIS et al. 1994, LANSKE et al. 1996).

Zusätzlich zu seinen klassischen endokrinologischen Funktionen bezüglich der Kalziumregulation hat PTHrP eine stark ausgeprägte relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur von Gefäßen, Uterus, Trachea und des gastrointestinalen Systems. Diese PTHrP-Effekte werden ebenfalls über den PTH1R vermittelt.

PTHrP wird auf verschiedenen Ebenen auch mit dem weiblichen Reproduktionstraktes assoziiert, da es dort in vielen Geweben und Zelltypen zu finden ist, wie z.B. im ovariellen follikulären Fluid, in der Plazenta, im Fötus, im Uterus und in der maternellen Milch (CURTIS et al. 1998; WLODEK et al. 2000).

So vermag PTHrP beispielsweise bei tragenden Schafen die plazentäre Kalziumpumpe zu stimulieren, die für das Bestehen der relativen fötalen Hyperkalzämie während der Trächtigkeit verantwortlich ist. Als Hauptquelle für PTHrP wird die fötale Nebenschilddrüse angesehen, aber auch die Plazenta bildet das Peptid. Dieser Effekt scheint über ein mittregionales Fragment vermittelt zu sein (CARE et al. 1990), das direkt für den plazentären Transport von Kalzium und Magnesium verantwortlich ist.

Eine weitere wichtige Eigenschaft von PTHrP, die über C-terminale Fragmente vermittelt wird, ist die starke Inhibition der osteoklastischen Knochenresorption (FENTON et al. 1991). Die Signaltransduktion in diesen Fall ist anders als bei Calcitonin, da kein Anstieg von cAMP in den Osteoklasten zu finden ist. Der für die Vermittlung dieses Effektes verantwortliche Rezeptor wurde noch nicht identifiziert.

Die Konzentrationen des im Plasma zirkulierenden PTHrP wurden durch Verwendung unterschiedlicher Immunoassays untersucht und es wurde festgestellt, daß diese extrem niedrig sind und im picomolaren Bereich liegen (BURTIS et al. 1992). Dies weist darauf hin, daß die obengenannten Wirkungen von PTHrP autokriner oder parakriner Natur sind.

<u>Einleitung</u>

Außerdem haben Untersuchungen aus den letzten Jahren gezeigt, daß PTHrP nicht nur über den klassischen autokrinen/parakrinen Signalweg wirkt, sondern es auch einen intrakrinen Signalweg aktivieren kann, welcher mit der Translokation des Proteins in den Nukleus verbunden ist. Dafür besitzt PTHrP eine Nukleäre-Lokalisations-Sequenz (NLS) in der Aminosäuren-Region 88-107. Diese NLS besitzt eine große strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Transkriptionsfaktoren, die in Viren oder Säugern zu finden sind. Hierbei konnte gezeigt werden, daß das nukleäre PTHrP unter anderem an der Regulation der Zellproliferation und des apoptotischen Zelltods im Knochengewebe beteiligt ist. So kann es in diesem Gewebe unter apoptotischen Bedingungen die Überlebensrate steigern (HENDERSON et al. 1995). Diese möglichen intrakrinen Wirkungen von PTHrP sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, daß PTHrP viele verschiedene Wirkfelder besitzt, die unterschiedliche Funktionen beinhalten, wie z.B. die Regulation der fötalen Entwicklung und des Zellwachstums, des transepithelialen Kalziumtransfers oder die Relaxation von Glattmuskelzellen.

Obwohl PTHrP ursprünglich als Tumor-assozierter hyperkalzämischer Faktor charakterisiert worden ist, deutet seine ubiquitäre Expression im gesamten Körper auf seine wichtige Rolle bei lokalen Regulationsmechanismen vieler physiologischer Prozesse hin.

1.2 Wirkungen von PTHrP im kardiovaskulären System

PTHrP kann aufgrund seiner großen strukturellen Homologie viele Wirkungen von PTH imitieren. Dies betrifft verschiedene Organsysteme, wie beispielsweise auch das kardiovaskuläre System. In diesem führt die relaxierende Wirkung von PTH auf die Glattmuskelzellen der Gefäße zu einer Vasodilatation und dadurch zu einem hypotensiven Effekt, der sich durch ein Absinken des systemischen Blutdruckes manifestiert (MOK et al. 1989). Obwohl dieser obengenannte Effekt von PTH unbestreitbar ist, wird seine physiologische Relevanz kontrovers diskutiert, weil die zur Vasodilatation notwendigen Konzentrationen von PTH weit über den physiologisch vorkommenden Werten liegen. Außerdem ist bekannt, daß Patienten, die an primärem Hyperparathyroidismus erkrankt sind und entsprechend hohe PTH-Plasmakonzentrationen aufweisen, häufig an Hypertonie leiden, welche sich nach Parathyroidektomie wieder normalisieren läßt.

Darüber hinaus bewirkt PTHrP an isoliert perfundierten Herzen in wesentlich geringeren Konzentrationen als PTH eine Vasodilatation (Nickols et al. 1989). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß unter physiologischen Bedingungen nicht PTH, sondern das para- bzw. autokrin gebildete PTHrP der natürliche Ligand des im kardiovaskulären System expremierten PTH1-R darstellt. Somit würde der oben angesprochene Widerspruch aufgelöst werden (WU et al. 1993).

Das kardiovaskuläre System besitzt drei unterschiedliche Typen von Zielzellen für PTHrP: die Glattmuskelzellen der Gefäße, die Kardiomyozyten und die Schrittmacherzellen. Die mikrovaskulären Endothelzellen im Herzen exprimieren zwar PTHrP, besitzen aber keinen Rezeptor und reagieren deswegen nicht auf das Peptidhormon (RIAN et al. 1994). PTHrP selbst wird sowohl im Herzen als auch in den Gefäßen exprimiert, wobei die höchste Expression im atrialen Myokard und in kardialen Gefäßen zu finden sind (BURTON et al. 1994) und ventrikuläre Myozyten kein PTHrP expremieren (SCHLÜTER et al. 2000).

Die Regulation der Expression von PTHrP wurde bislang nur an vaskulären Glattmuskelzellen untersucht. Eine schnelle Hochregulation der PTHrP-Expression bewirken unter anderem Angiotensin II, Serotonin, Noradrenalin, Bradykinin oder Thrombin (PIROLA et al. 1993). Eine ähnlich gesteigerte Expression von PTHrP konnte auch durch mechanische Stimuli oder die Distension der Rattenaorta per Ballonkatheter erzielt werden (DAIFOTIS et al. 1992).

Zusätzlich zu seiner Wirkung auf den Gefäßtonus agiert PTHrP im Gefäßsystem auch als Wachstumsregulator. So verhindert es die Proliferation der vaskulären Glattmuskelzellen. So vermögen N-terminale Fragmente des Peptids die Serum- und die PDGF (platelet-derived groth factor)-abhängige DNA-Synthese in primären Kulturen arterieller Glattmuskelzellen zu senken (HONGO et al. 1991, JIANG et al.1995). Diese antiproliferativen Effekte werden ebenfalls über den PTH1-R vermittelt. Des weiteren hemmt PTHrP die PDGF-gesteuerte Migration von vaskulären Glattmuskelzellen in vitro (ISHIKAWA et al. 1998). Dies scheint für pathophysiologische Vorgänge im Gefäßsystem von Bedeutung zu sein, da PTHrP bei manchen kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose in den betroffenen Gefäßabschnitten hochreguliert ist (OZEKI et al. 1996).

Der Widerspruch zwischen den antiproliferativen Effekt von PTHrP einerseits und der schon beschriebenen intrakrin vermittelten proliferationssteigerenden Wirkung anderseits bedarf noch weiterer Studien. Des weiteren kann PTHrP auch als Wachstumsfaktor für adulte Kardiomyozyten agieren.

Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten haben gezeigt, daß die C-terminalen Fragmente von PTHrP, über die Aktivierung des PLC/PKC-Signalweges zur Hypertrophie dieser Zellen beitragen. Dieser Effekt basiert auf der unter Einfluß von PTHrP gesteigerten Proteinsynthese und Re-Expression von fötalen Proteinformen (SCHLÜTER et al. 1997).

Wie bereits mehrfach erwähnt, kann PTHrP aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit PTH viele seiner Wirkungen im Körper nachahmen. So besitzen beide Peptidhormone

einen positiv chronotropen Effekt. Dieser Effekt kann sowohl am isoliert perfundierten Rattenherzen als auch in vivo beobachtet werden (NICKHOLS et al. 1989; OGINO et al. 1995).

Manche Effekte im kardiovaskulären System sind aber nur für PTHrP charakteristisch, wie beispielsweise seine positiv inotrope Wirkung auf die Herzfunktion. Dieser Effekt kann sowohl an isoliert perfundierten Rattenherzen als auch an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte beobachtet werden und beruht auf einer Stimulation der Adenylatzyklase (NICKOLS et al. 1989; SCHLÜTER et al. 1997).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß PTHrP eine wichtige regulatorische Wirkung auf die Herzfunktion zu haben scheint. Dafür sprechen seine kardialen Effekte, wie z.B. seine positive Inotropie und Chronotropie, sowie seine Wirkung auf den koronaren Blutfluß. Diese Effekte unterscheiden sich zum Teil von denen die durch PTH hervorgerufen werden. Dies läßt darauf schließen, daß die physiologische Wirkung von PTHrP auf das Herz spezifisch für seine Zielzellen ist und es seine Wirkung hauptsächlich durch parakrine und autokrine Freisetzung entfaltet.

1.3 Fragestellung

Aufgrund der obigen Betrachtungen kann PTHrP als para- bzw. autokriner Faktor im kardiovaskulären System charakterisiert werden, dessen Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie noch relativ unklar ist. So haben beispielsweise Untersuchungen an Patienten mit erworbener Herzinsuffizienz gezeigt, daß diese erhöhte Plasma-PTHrP Werte haben, die mit dem Grad der Dilatation und der kardialen Dysfunktion korrelieren (OGINO et al. 2002). Dies führte zur Annahme, daß die PTHrP-Synthese im Herzen solcher Patienten durch die mechanische Dehnung des linken Ventrikels gesteigert wird. Es ist außerdem bekannt, daß unter akuter Druckbelastung PTHrP aus dem Gefäßsystem primär endothelial freigesetzt wird, während eine chronische

<u>Einleitung</u>

Druckbelastung durch eine eingeschränkte oder fehlende Freisetzung von PTHrP charakterisiert ist (FIASCHI-TAESCH et al. 1998).

Solche pathologisch veränderten Druckverhältnisse im kardiovaskulären System sind z.B. bei der pulmonalen Hypertonie vorhanden. Diese Erkrankung ist durch eine Imbalanz zwischen den vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Faktoren gekennzeichnet, die einen lokal erhöhten Druck in der Arteria pulmonalis zur Folge haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die druckabhängige Freisetzung von PTHrP von Relevanz für Patienten mit pulmonaler Hypertonie ist.

Wie bereits erwähnt, wird PTHrP im kardiovaskulären System von Endothelzellen und Glattmuskelzellen exprimiert obwohl die mikrovaskulären Endothelzellen keinen PTH1-R besitzen. Eventuell agiert PTHrP in diesen Zellen über einen rezeptorunabhängigen intrakrinen Signalweg. Aus diesem Hintergrund heraus untersuchte ich des weiteren Mechanismen der endothelialen Synthese und Freisetzung von PTHrP in vitro.

Hierzu wurden Experimente durchgeführt um die Regulation der PTHrP Freisetzung und seiner intrazellulären Verteilung zu untersuchen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acetylcholin	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
APS	Serva, Heidelberg
ВАРТА	Calbiochem, Bad Soden
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma, Taufkirchen
Carbogen [®]	Messer Griesheim, Krefeld
Deoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Deoxyglukose	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Eigenherstellung der JLU-Gießen
FCS	PAA Laboratories, Colbe
Fungizone	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen
L-NA	Sigma, Taufkirchen
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker	Fluka, Seelze
Molekulargewichtsmarker	Amersham, Freiburg

NBT	Sigma, Taufkirchen
NCS	Invitrogen, Karlsruhe
PD 98059	Sigma, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
SDS	Serva, Heidelberg
ТСА	Merck, Darmstadt
Temed	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCI	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vanadat	Merck, Darmstadt

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Calbiochem (Bad Soden) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Hersteller-Angaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Antikörper

PTHrP Anti Rabbit IgG oncogene, Bad Soden Chemicon Europe, Hofheim Taunus

2.3 Geräte und Laborbedarf

2.3.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg	
Langendorff-Anlage	Eigenbau:	
	Werkstatt Physiologisches Institut,	
	Justus-Liebig-Universität, Gießen	
Gewebehacker	HSE, March-Hugstetten	
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg	
Primaria-Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg	
(Falcon 3803)		
Kulturschalen (Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg	
50 ml Röhrchen (Falcon 2070)	Becton Dickinson, Heidelberg	
Mikroskop TMS-F	Nikon, Düsseldorf	
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld	

2.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Netzgerät	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Dot-Blot Minifold-Kammer	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF-Blotmembran	Millipore, Bedford, MA, USA
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen

2.3.3 Sonstige Geräte

Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn		
Zentrifuge	Heraeus, Hanau		
Schüttler	Biometra, Göttingen		
Wasserbad	Julabo	Labortechnik	GmbH,
	Seelbach		
Sterilbank (Lamin Air [®] HBB 2472)	Heraeus,	Hanau	
Brutschrank (Cytoperm)	Heraeus,	Hanau	
pH-Meter	WTW, Weilheim		
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz,		
	Hamburg		
Vortexer	Heidolph,	Kehlheim	

2.3.4 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz,
	Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz,
	Hamburg
Sterilfilter (Porenweite 0,2 µm)	Millipore, Eschborn
Zellschaber (Falcon 3087)	Becton Dickinson, Heidelberg
Deckgläser	Sigma, Taufkirchen
Kulturschalen (Falcon 3001 + 3004)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Millipore, Eschborn

2.4 Auswertung

Flachbettscanner (Scan jet 4c) Software: Hewlett Packard, Eschborn Image Quant[®]; Molekular Dynamics, Krefeld Microsoft Excel

3 Methoden

3.1 Flow-Map-Studie

3.1.1 Patienten

Es wurden 20 Kinder unterschiedlichen Alters, die unter einem erhöhten pulmonalarteriellen Druck leiden, in die Studie eingeschlossen.

Die Grunderkrankungen, die zum pulmonalarteriellen Hochdruck führen betreffen entweder primär das Gefäßsystem (z.B. die primäre pulmonale Hypertonie) oder das Parenchym der Lunge (z.B. die bronchopulmonale Dysplasie).

Im Rahmen von Untersuchungen in der Kinderklinik der Justus-Liebig Universität Giessen wurde bei allen Kindern ein erhöhter Druck (≥ 25 mmHg) in der linken Pulmonalarterie diagnostiziert, der unterschiedlich ausgeprägt war. Der Gefäßwiderstand war im betroffenen Kreislaufabschnitt auch erhöht.

Der Altersdurchschnitt der 20 Patienten (davon 9 Jungen und 11 Mädchen) lag bei 6,4 Jahren (0,4 bis 16,5 Jahre).

Als Kontrollgruppe wurden Kinder (n=12) einbezogen, die nach Korrektur eines ASD (atrialer Septum Defekt) normale Perfusions- und Druckverhältnisse im untersuchten Gefäß zeigten. Der Druck in der Arteria pulmonalis lag bei diesen Patienten im physiologischen Bereich (≤ 25 mm Hg).

Die Studie umfaßte einen Zeitraum von ca. einem Jahr (von März 2001 bis Januar 2002). Während dieser Zeit wurden die meisten Patienten mehrmalig untersucht. Die Eltern der untersuchten Kinder wurden vor Aufnahme über die Teilnahme an einer

wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung.

<u>Methoden</u>

3.1.2 Durchführung

Bei den Kindern mit pulmonalarteriellem Hochdruck wurden Routine-Untersuchungen in regelmäßigen Abständen in der Kinderklinik des Universitätsklinikums der JLU durchgeführt und dabei hämodynamische Parameter erfaßt. Dies erfolgte über Druckaufnehmer, welche über die Leiste venös bzw. arteriell eingeführt wurden und weiter intravasal bis in das rechte bzw. linke Herz und in die Pulmonalarterie vorgeschoben wurden.

Die Kinder wurden zwecks Reduktion des pulmonalarteriellen Druckes bzw. Gefäßwiderstandes einer Therapie mit inhalativen Sauerstoff (FiO₂ 1,0) und Ilomedin $(0,5 - 1 \mu g/kg)$ unterzogen. Zusätzlich wurde einigen Patienten Acetylcholin per Herzkatheter in die Lunge appliziert. Der Einsatz der pharmakologischen Substanzen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll der Arbeitsgemeinschaft "Pulmonale Hypertonie im Kindes- und Jugendalter" der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie.

Die erforderlichen Blutentnahmen wurden nur im Rahmen einer indizierten invasiven Überprüfung der pulmonalarteriellen Hämodynamik vorgenommen und erfolgten aus der Arteria femoralis und aus der linken Pulmonalarterie, jeweils vor und nach medikamentöser Behandlung.

Die auf dieser Weise gewonnenen Blutproben wurden als Plasmaproben weiterverarbeitet und anschließend konnte deren PTHrP-Gehalt durch Proteinfällung, SDS-Gelelektrophorese und Westernblot (s. 3.4) ermittelt werden.

Für jeden Patient wurden drei Ansätze durchgeführt.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung wurden gemittelt und es ergab sich eine Intra-Assay-Variabilität von 17%.

<u>Methoden</u>

3.2 in vitro Experimente

3.2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchen wurden adulte männliche Wistar-Ratten verwendet, die einen Körpergewicht von 300-400 g hatten. Die Tiere stammten aus eigener Züchtung des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität, Gießen und hatten im Tierstall freien Zugang zu Wasser und Futter (Standardfutter Altromin[®]).

3.2.2 Präparation und Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen (PIPER et al., 1990); Passage der mikrovaskulären Endothelzellen.

Bei der Isolation der mikrovaskulären Endothelzellen wurde eine Perfusionsanlage nach Langendorff verwendet, die vor Beginn der Präparation mit aqua bidest. gespült und luftblasenfrei mit Powell-Medium gefüllt war. Die Perfusionslösung wurde auf 37°C erwärmt und während der gesamten Präparation temperaturkonstant gehalten. Zudem erfolgte eine durchgehende Begasung des Powell-Mediums mit Carbogen[®].

Powell-Medium

NaCl	110,0 mM
NaHCO₃	25,0 mM
KCI	12,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
Glukose	11,0 mM
$Mg_2SO_4 \times H_2O$	1,2 mM

Methoden

Die Versuchstiere wurden für kurze Zeit (1-2 Minuten) mit Diethylether narkotisiert. Anschließend wurde der Thorax der Ratten eröffnet und das Herz zusammen mit der Lunge abgetrennt und herauspräpariert. Die Organe wurden danach in ein Gefäß mit kalter physiologischer Lösung (4°C) gelegt, und es folgte die feine Präparation der Aorta und die Entfernung von Lunge, Thymus, Trachea und Ösophagus.

Anschließend wurde die Aorta in im Aortenborgen abgetrennt und das Herz mit dieser an die Kanüle der Perfusionsanlage angehängt und mit ca. 40 ml Powell-Medium blutfrei gespült. Im Anschluß erfolgte eine rezirkulierende Perfusion des Herzens mit 50 ml Collagenasepuffer für 25 Minuten bei einer Flußrate von 5 ml/min/Herz.

Collagenasepuffer

Powell-Medium	50,0 ml
Collagenase	20,0 mg
CaCl ₂ -Stammlösung (100 mM)	12,5 µl

Nach Perfusionsende wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt und die Herzen mittels eines Gewebehackers zerkleinert. Als nächster Schritt erfolgte die Nachverdauung des Gewebebreis in 30 ml Collagenasepuffer für 10 Minuten, bei einer Temperatur von 37°C und konstanter Carbogen[®]-Begasung. Parallel dazu erfolgte eine Durchmischung der Zellmasse durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren um den Zellverband besser zu zerstören.

Die entstandene Suspension wurde daraufhin durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und anschließend für 3 Minuten bei 400 U/min zentrifugiert um dabei die intakten Zellen von den Zelltrümmern und dem Collagenasepuffer zutrennen.

Der nach der Zentrifugation gebildete Überstand wurde mit 10 mg Trypsin und 30 μ l einer 100 mM CaCl₂-Lösung versetzt und im Anschluß bei 37°C für 30 Minuten mittels eines elektrischen Rührers durchmischt. Die dadurch entstandene Suspension wurde zuerst in 60 ml M199/CO₂ aufgenommen und anschließend über 10 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert bis sich ein Pellet gebildet hatte, welches wiederum in etwa 10 ml des vorgewärmten (37°C) Endothelzellmediums resuspendiert wurde.

<u>Methoden</u>

<u>M199/CO₂</u>	pH 7,4 sterilfiltriert
Medium 199/Earl's Salts	9,5 g
HEPES	15,0 mM
NaHCO ₃	17,9 mM
Aqua bidest.	ad 1 I

Endothelzellmedium

M199/CO ₂	x ml
mixed serum (NCS/FCS 1:1)	20 % (v/v)
Penicillin-Streptomycin	2 % (v/v)

Nach Auflösen des Pellets entstand eine Zellsuspension, die gleichmäßig in einer bereits mit 20 ml Medium gefüllte 10 cm Falcon Primaria[®] Kulturschale verteilt wurde.

Das Medium wurde bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens alle 2 Tage gewechselt.

Nachdem die kultivierten Endothelzellen das Konfluenzstadium erreicht haben, wurden sie zweifach mit 30-40 ml vorgewärmten (37°C) HEPES/EDTA-Puffer gewaschen und danach mit 5 ml Trypsin-Lösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten bei einer Temperatur von 37°C und unter CO₂-freien Bedingungen, was zur Auflösung des Zellverbandes führte. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension zuerst in 5 ml warmes Endothelzellmedium aufgenommen und danach auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt.

Die Zellzahl wurde mittels einer Zählkammer ermittelt und die damit errechnete Menge Zellsuspension auf die einzelnen, bereits mit Medium beschichteten Kulturschalen verteilt.

Die Endothelzellen wurden in einer Dichte von ca. 200.000 Zellen pro Schale ausplattiert und für weitere 2 bis 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Endothelzellen der ersten Passage für die jeweiligen Versuche verwendet.
EDTA-Puffer	pH 7,4 (sterilfiltriert)
NaCl	125,0 mM
KCI	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 mM
HEPES	10 mM
EDTA-Na ₂	0,5 mM

3.2.3 Präparation und Kultivierung vaskulärer Glattmuskelzellen aus der Kaninchenaorta; Passage der vaskulären Glattmuskelzellen.

Die von mir verwendeten vaskulären Glattmuskelzellen (VSMC) wurden im Max-Planck-Institut in Bad Nauheim aus Kaninchenaorten gewonnen und von Herrn R. Zimmermann zur Verfügung gestellt.

Die Passage der Glattmuskelzellen erfolgte nach einem identischen Protokoll, wie bereits für mikrovaskuläre Endothelzellen unter 3.2.2 beschrieben, erforderte aber eine Inkubation und Kultivierung unter CO₂-freien Bedingungen.

VSMC-Medium

Glattmuskelzell-	
Standardmedium	x ml
mixed serum (NCS/FCS 1:1)	20 % (v/v)
Penicillin-Streptomycin	2 % (v/v)
Fungizone	5 % (v/v)

Methoden

3.2.4 Inkubation, Zellernte und Proteinfällung der Zellüberstände

3.2.4.1 Inkubation und Zellernte von Endothelzellen und Glattmuskelzellen

Die Endothel- und Glattmuskelzellen in der ersten Passage wurden entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll mit verschiedenen Substanzen inkubiert und danach geerntet. Zu Beginn der Zellernte wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit 100 µl Lysispuffer pro Schale versetzt und für ca. 10 min auf einem Schüttler gestellt, was zur Auflösung der Zellmembran führte.

Das im Lysispuffer enthaltene Natriumvanadat bewirkte die Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl Benzonase (50 IU/ml) pro Schale zwecks Verdau der Nukleinsäuren und die Zellen wurden für weitere 10 min kräftig geschüttelt.

<u>Lysispuffer</u>	pH 6,7
Tris/HCI	50 mM
SDS	2 % (w/v)
Natriumvanadat (1 mM)	10 % (v/v)
Mercaptopropandiol	10 % (v/v)

Im Anschluß wurde das Material aus jeder Schale mit einem Zellschaber geerntet, in 20 µl Lämmli-Puffer resuspendiert und bei 95°C für 5 min erhitzt.

Die auf dieser Weise gewonnenen Zellproben wurden entweder sofort mittels Gelelektrophorese weiterverarbeitet oder bei -18°C eingefroren.

<u>Lämmli-Puffer</u>	pH 6,8
Tris/HCI	500 mM
Glycerin	25 % (v/v)
SDS (10%ig)	4 % (w/v)
Mercaptopropandiol	1 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)

3.2.4.2 Proteinfällung der Zellüberstände

Nach der Kultivierung und Stimulation der mikrovaskulären Endothelzellen bzw. Glattmuskelzellen, wurden diese gemäß Versuchsprotokoll für einen bestimmten Zeitraum (zwischen 2 und 12 Stunden) mit 1ml proteinfreiem Medium pro Schale inkubiert. Auf dieser Weise konnten vor der Zellernte die Zellüberstände gewonnen und weiterverwendet werden.

Proteinfreies Zellmedium	1	Perfusionslösung	für	Rattenherzen
--------------------------	---	------------------	-----	--------------

	pH 7,4
NaCl	120 mM
NaHCO ₃	24 mM
KCI	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mM
Glukose	5 mM

Nach der obengenannten Inkubation der Zellen wurden die Zellüberstände entnommen, mit 100 µl 5mM Deoxycholat pro Schale versetzt und für 15 min bei 4°C aufbewahrt. Danach erfolgte eine Proteinfällung der Überstände durch den Zusatz von 100 µl einer 100%igen TCA-Lösung. Nach einer weiteren Aufbewahrung der Proben für 30 min bei 4°C, wurden diese für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Das auf diese Weise entstandene Pellet wurde in 35 µl Lämmli-Puffer und 10 µl Tris/HCI (pH 9,5) aufgenommen und danach bei 95°C für 5 min erhitzt.

3.2.5 Kernextraktion

Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden nach Ende der Kultivierung mit einem Zellschaber abgekratzt und der Inhalt von jeweils 5 Schalen (Typ Falcon 3001) wurde zusammen mit dem Kulturmedium in ein 50 ml Röhrchen überführt. Danach folgte eine Zentrifugation der Proben bei 2000 U/min für 3 min.

Im Anschluß wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet zunächst in 1 ml PBS aufgenommen und danach bei 2000 U/min für 2 min zentrifugiert.

Nach erneutem Absaugen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 200 µl Schwellungspuffer und das Vermischen der entstandenen Suspension mittels Vortexer bis zum endgültigen Auflösen des Pellet. Die Probe wurde für ca. 30 min auf Eis aufbewahrt und anschließend bei 900 U/min für 10 min zentrifugiert. Danach wurden 200 µl Homogenisierungspuffer hinzugefügt und die Probe blieb für 5-7 min auf Eis stehen. Danach folgte eine erneute Zentrifugation der Probe bei 900 U/min für 10 min. Das entstandene Pellet wurde in 20 µl Storagepuffer aufgenommen, gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13000 U/min für 9 min zentrifugiert. Der auf dieser Weise entstandene Überstand. in dem die Zytoplasmafraktion enthalten ist, und das Pellet, das die Zellkerne enthält, wurden entweder bei -80°C eingefroren oder sofort mittels Proteinfällung und Gelelektrophorese weiterverarbeitet

Dafür wurden dem Überstand 50 µl Lämmli-Puffer und 2 µl Benzonase zugesetzt. Das Pellet wurde in 200 µl Lämmli-Puffer und 2 µl Benzonase gelöst. Zum Schluß wurden die fertigen Proben für 5 min bei 95°C erhitzt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt.

<u>Schwellungspuffer</u>	pH 7,9
Tris/HCI	10 mM
KCI	10 mM
MgCl ₂	1 mM
DTT	1 mM

Homogenisierungspuffer	pH 7,9 / 4°C
Tris	10 mM
Saccharose	300 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,3 %
Storagepuffer	pH 7,5
Hepes	10 mM
KCI	90 mM
NaCl	300 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Gylcerin	20 %

3.3 Versuche zur PTHrP-Freisetzung an isoliert perfundierten Rattenherzen

Die für diese Reihe von Experimenten benötigten Rattenherzen wurden wie bereits unter 3.2.2 beschrieben aus normotensiven männlichen Wistar-Ratten entnommen und gemäß Protokoll präpariert.

Nach der Präparation wurden die Herzen mit der Aorta ascendens an die Kanüle einer Langendorff-Perfusionsanlage angehängt und druckkonstant (50 mm Hg) perfundiert. Die verwendete Perfusionslösung (abgewandelte Tyrode-Lösung) befand sich in einem Pufferreservoir oberhalb des Herzens und wurde aus diesem dem Herzen zugeführt.

Methoden

Während des gesamten Versuches erfolgte die ständige Begasung der Perfusionslösung (pH 7,4) mit Carbogen[®] und eine Temperierung der Lösung auf 37°C durch einen Wärmetauscher.

Das Herz befand sich während des Versuchs in einer temperierten, feuchten Kammer (37°C). Die Flüssigkeitszufuhr zum Organ konnte durch einen zwischengeschalteten Zweiwegehahn reguliert werden.

Aufgrund der retrograden Perfusion des Herzens kam es zu einem Schluß der Aortenklappen und einer Durchströmung der linken und rechten Koronararterie, welche direkt oberhalb der Aortenklappen beginnen. Der Abfluß des Perfusats erfolgte über den Sinus coronarius im rechten Vorhof.

Die verwendete Perfusionslösung wurde nach dem Rezept wie bereits unter 3.2.4.2 beschrieben hergestellt.

Die PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen wurde unter druckkonstanten Bedingungen untersucht.

In der Versuchsreihe wurden 3 Durchgänge pro Herz durchgeführt:

Im ersten Durchgang wurde das Rattenherz unter Kontrollbedingungen perfundiert.

Im zweiten und dritten Durchgang wurde der Perfusionslösung Acetylcholin in einer Konzentration von 10 nM bzw. 100 nM (für den zweiten bzw. dritten Durchgang) zugesetzt.

Das Auffangen des Effluates erfolgte minütlich und gleichzeitig dazu wurde auch die Flußrate pro min bestimmt. Die aufgefangenen Effluat-Proben hatten jeweils ein Volumen von 1ml. Mit diesen Proben wurde anschließend eine Proteinfällung durchgeführt, wie bereits unter 3.1.4.2 beschrieben. Danach erfolgte der Transfer der Proteine mittels Dot Blot auf eine PVDF-Membran (s. 3.4.3.2) und diese wurde mit polyklonalem PTHrP-Antikörper entwickelt (s. 3.4.4).

Zum Schluß wurden eine densitometrische Auswertung der Banden und die Quantifizierung der Freisetzung durchgeführt.

28

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Vorbereitung und Proteinfällung der Plasmaproben

Die Plasmaproben wurden vor Beginn der Proteinfällung im Verhältnis 1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

Nach der Aufbereitung erfolgte der Zusatz von 10% (v/v) einer 5mM Deoxycholat-Lösung und die Aufbewahrung der Proben bei 4°C für 20 min. Anschließend wurden die Proben mittels Vortexer gut gemischt und 10% (v/v) einer 100%-igen (w/v) TCA-Lösung zur Proteinfällung zugesetzt.

Nach einer weiteren Aufbewahrung bei 4°C für 30 min erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 13000 U/min für 5 min.

Das so entstandene Pellet wurde in 35 µl Lämmli-Puffer und 10 µl Tris/HCl (pH 9,5) resuspendiert. Die Probe wurde dann im Anschluß bei 95°C für 5 min erhitzt.

3.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Es wurde eine Gelelektrophorese in Form einer SDS-PAGE durchgeführt.

Dafür wurden spezielle Gelkammern verwendet, die zunächst zusammengebaut werden mußten. Hierzu wurde folgendes Zubehör benötigt: zwei rechteckige Glasplatten (eine mit und eine ohne Ausschnitt), zwei Spacer (Dicke 1mm) und ein Silikonschlauch entsprechender Dicke. Die aufgelisteten Materialien wurden jeweils zur Herstellung eines Polyacrylamidgels benötigt.

Die gereinigten und entfetteten Glasplatten wurden aneinander gelegt und gleichzeitig mittels Spacer und Silikonschlauch räumlich getrennt um das Gießen des Geles zu ermöglichen. Die Glasplatten wurden so mit Klammern an der Gelkammer befestigt, daß die Glasplatte mit Ausschnitt an dem Pufferbehälter der Kammer anlag.

Im Anschluß wurde das Trenngel zwischen den Glasplatten gegossen und das Gel mit Wasser überschichtet um eine Polymerisation unter Luftausschluß zu gewährleisten. Danach härtete das Gel bei Raumtemperatur für zwei Stunden aus.

Nach Entfernen des Wassers wurde das Sammelgel gegossen und sofort der Profilformer für die Taschen eingesetzt. Nach weiteren 30 min konnte der Silikonschlauch entfernt werden. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer in einem mit Laufpuffer gefüllten Behälter gesetzt und die SDS-Gelelektrophorese bei 200 V für 3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die SDS-PAGE wurden 12,5%ige, 1 mm dicke Polyacrylamidgele benötigt.

<u>4× Trenngelpuffer</u>	
Tris/HCI	1,5 M (pH 8,8)
SDS 10% (w/v)	0,4% (w/v)
Sammelgelpuffer	
Tris/HCI	0,5 M (pH 6,8)
SDS 10% (w/v)	0,4% (w/v)
Trenngel	
AA/BA (30:1)	12,5 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml
Aqua bidest.	10 ml
APS 10% (w/v)	200 µl
TEMED	25 µl
SDS 10% (w/v)	300 µl

<u>Sammelgel</u>	
AA/BA (30:1)	2,4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
Aqua bidest.	12,8 ml
APS 10% (w/v)	200 µl
TEMED	24 µl
SDS 10% (w/v)	100 µl
Laufpuffer	
Glycin	1,4% (w/v)
Tris/HCl	0,3% (w/v)

SDS

Die Mengenangaben beziehen sich auf das Gießen von 2 (beim Trenngel) bzw. 4 Gelen (beim Sammelgel).

0,1% (w/v)

Für die Beladung des Polyacrylamidgels wurden Proben verwendet, die aus dem Effluat, dem Plasma, den Zellüberständen, den lysierten Zellen oder der Kernextraktion gewonnen worden sind und bei denen zuvor eine Proteinfällung durchgeführt worden war. Die Menge der eingesetzten Probe pro Geltasche betrug 20 µl bei den Plasmaproben, 30 µl bei den Proben aus der Zellernte und der Kernextraktion (Zytoplasmafraktion) und 50 µl bei den Effluat-, Überstands- und Kernfraktions-Proben. Zur Orientierung lief während der SDS-Gelelektrophorese ein Molekulargewichtsmarker mit einem Spektrum zwischen 250 kD und 10 kD mit.

3.4.3 Blotverfahren

3.4.3.1 Westernblot

Nach der Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese wurden diese im "semidry-blotting-Verfahren" elektrophoretisch nach KYHSE-ANDERSEN (1984) auf einer PVDF-Membran transferiert.

Zwischen der Anode und Kathode der Blotkammer wurden Filterpapiere, die in verschiedenen Puffer getränkt waren, positioniert. Hierbei wurden folgende Puffer verwendet:

pH 10,4
300 mM
20% (v/v)
pH 10,4
30 mM
20% (v/v)
pH 9,4
25 mM
40 mM
20% (v/v)

Vor Beginn des Blot-Verfahrens wurde die Größe der benötigten Filterpapiere und der PVDF-Membran an die der Blotkammer angepaßt. Danach wurden jeweils 4 Filterpapiere im konzentrierten bzw. nicht-konzentrierten Anodenpuffer luftblasenfrei getränkt und auf die Anode der Blotkammer gelegt.

Anschließend erfolgte die Positionierung der zuvor mit 100%-igem Methanol und nichtkonzentriertem Anodenpuffer benetzten PVDF-Membran auf die obengenannten Filterpapiere.

Methoden

Nach Entfernung des Sammelgels wurde das Polyacrylamidgel vorsichtig auf die Blotmembran aufgelegt – ebenfalls luftblasenfrei. Im Anschluß wurden noch weitere 4 Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt und auf die schon aufgelisteten Schichten aufgelegt und abschließend die Kathode der Blotkammer aufgesetzt.

Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 90 mA (entspricht 0,8 mA/cm²) für einen Zeitraum von 2 Stunden.

3.4.3.2 Dot Blot

Für dieses Blot-Verfahren wurde eine Minifold-Kammer verwendet. Durch das Anlegen eines Vakuums, welches mittels einer Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, wurden die Proteine direkt auf eine PVDF-Membran transferiert.

Zu Beginn der Arbeit mit der Dot Blotkammer wurden auch hier das benötigte Filterpapier und die Blotmembran zurechtgeschnitten. Die PVDF-Membran wurde zuerst in 70% igen Methanol, dann in nicht-konzentrierten Anodenpuffer getränkt und anschließend luftblasenfrei auf das mit dem gleichen Anodenpuffer durchfeuchtete Filterpapier aufgelegt.

Danach wurde der Deckel der Blotkammer aufgesetzt und diese an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen.

Die Proben wurden mit einer Pipette in die Vertiefungen der Dot Blotkammer aufgebracht. Nach der Beladung der PVDF-Membran wurde in die einzelnen Vertiefungen nicht-konzentrierter Anodenpuffer pipettiert, dieser wurde in der gleichen Menge aufgetragen wie zuvor die Proben. Anschließend wurde die Kammer für ca. 5 min an der Wasserstrahlpumpe angeschlossen.

33

3.4.4 Immunologischer Nachweis von PTHrP

Der Nachweis von PTHrP erfolgte mittels spezifischer Antikörper nach Durchführung des Proteintransfers (3.4.3).

Hierfür wurde die PVDF-Membran zuerst bei Raumtemperatur für 2 Stunden in einer 2%-igen (w/v) BSA-Lösung (in TBS gelöst) gelegt - zwecks Absättigung unspezifischer Bindungsstellen - und danach zweimal für 5 min mit TBS gewaschen.

<u>TBS (10x)</u>	pH 7,4
Tris/HCI	10 mM
NaCl	150 mM

Es folgte jeweils eine zweistündige Inkubation der Blotmembran bei Raumtemperatur zunächst mit dem ersten gegen PTHrP gerichteten Antikörper und dann mit dem Zweitantikörper. Zwischendurch wurde die Membran dreimal für 5 min mit 0,1% (v/v) Triton in TBS (1x) gewaschen.

Für die Inkubation der Blotmembran wurden folgende zwei Antikörper verwendet:

Zuerst konnten durch den Einsatz eines polyklonalen PTHrP-Antikörpers (hergestellt aus Kaninchen-Serum) die gesuchten Proteine identifiziert und als Komplexe gebunden werden.

Danach wurde anti-Kaninchen IgG, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert war als Zweitantikörper eingesetzt um die Antigen-Antikörper-Komplexe zu markieren.

Im Anschluß an die Inkubation der Blotmembran mit dem Zweitantikörper wurde diese zweimal für 5 min mit 0,5% (v/v) Triton in TBS gewaschen um so überschüssiges Konjungat von der Membran zu entfernen.

Die beiden eingesetzten Antikörper wurden vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:1000 mit Tris Puffer verdünnt.

<u>Tris Puffer</u>	pH 7,4
Tris/HCI	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
BSA	2% (w/v)

Die Antigen-Antikörper Komplexe wurden mittels einer Entwicklerlösung sichtbar gemacht, die Nitro Blue Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) enthielt. Das BCIP wurde durch die alkalische Phosphatase des Zweitantikörpers dephosphoryliert. Gleichzeitig erfolgte eine Reduktion des NBT, wodurch ein blau-violettes Präzipitat entstand.

<u>Entwicklerlösung</u>

AP-Puffer	40 ml
BCIP	5,2 mg
NBT	13,2 mg

Alkalischer Phosphatasepuffer (AP-Puffer)	
	pH 9,5
Tris/HCI	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

Die Färbung der Blotmembran dauerte abhängig von der Reaktionsintensität 1 bis 20 min. Danach wurde der Vorgang durch H₂O gestoppt und die im Wasser gewaschene Membran getrocknet.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden als Mittelwert (x) ± dem Standardfehler (SE) angegeben. Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurden Varianzanalysen (ANOVA) und der Student-Neuman-Keul-Test als Post-hoc Test angewandt.

Beim Vergleich zwischen zwei unterschiedlichen Gruppen wurde der T-Test verwendet. Als statistisch signifikant galten Differenzen mit einem Signifikanzniveau von p<0,05.

4.1 Druck- und Flußabhängige PTHrP-Freisetzung in vivo (Flow-MAP-Studie)

4.1.1 Patientencharakteristik und PTHrP-Plasma-Konzentration

In der "Flow-MAP-Studie" wurden von 20 jungen Patienten mit pulmonaler Hypertension (PHT) Druckwerte der Pulmonalaorta und Daten über die PTHrP-Spiegel in verschiedenen Kreislaufabschnitten erfaßt. Definitionsgemäß lagen bei diesen Patienten die Drücke in der linken Pulmonalarterie (PA) vor Therapie-Beginn deutlich über den Normalwert. Das Kontrollkollektiv bestand aus jungen Patienten mit Vorhof-Septum-Defekt (ASD). Die Entnahme aller Plasmaproben, die medikamentöse Behandlung der Patienten und die Erfassung der Druckwerte erfolgten durch das Ärzteteam der Kinderkardiologie. Die Auswertung der Daten und die Bestimmung der PTHrP-Konzentrationen, sowie ihre Zuordnung zueinander wurde retrospektiv im Physiologischen Institut durchgeführt.

Ein Vergleich der Druckwerte in der A. pulmonalis bei beiden Patienten-Gruppen (Abb. 4.1) zeigt, daß diese bei Kindern mit pulmonalem Hochdruck mehrfach höher lagen (69±20 mmHg, p<0,05) als bei den Patienten der Kontrollgruppe (13±2 mmHg).

Beim Vergleich der beiden Patienten-Gruppen bezüglich deren PTHrP-Spiegel in der linken Pulmonalarterie ergaben sich über alle Patienten gemittelt keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.2). Bei den PHT-Patienten lag die Freisetzung von PTHrP bei 121±29% (linke Pulmonalarterie vs. Systemarteriell). Bei den Patienten der Kontrollgruppe waren es 101±21% an PTHrP-Freisetzung. Zum Ausschließen intraindividueller Variabilität wurde jede Probe auf den PTHrP-Gehalt einer systemischen Probe des gleichen Patienten normiert.

37

Als PTHrP-Freisetzung im druckbelasteten Gefäßabschnitt wurde der Konzentrationsgradient an PTHrP zwischen der linken A. pulmonalis (Pulmonalarterie) und der A. femoralis (Systemarterie) gewertet.



Abb. 4.1 Druckwerte in der A. pulmonalis bei jungen Patienten mit pulmonaler Hypertension (PHT) und aus der Kontrollgruppe (K)

Dargestellt ist der mittlere Druck in der linken Pulmonalarterie (PAP) jeweils in mmHg.

Die Daten sind \overline{X} ±SE aus je 20 Patienten; * p<0,05 vs. Kontrollgruppe.



Abb. 4.2 PTHrP-Freisetzung bei Kindern mit pulmonaler Hypertension (PHT) und Patienten aus der Kontrollgruppe (K)

Dargestellt sind die PTHrP-Freisetzungen als Prozent PTHrP in der linken Pulmonalarterie relativ zur Systemarterie bei jungen Patienten mit pulmonaler Hypertension (PHT; weißer Balken) und bei jungen Patienten der Kontrollgruppe (K; schwarzer Balken). Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus je 20 Patienten.

4.1.2 Subgruppen-Analyse der jungen Patienten mit PHT

In den Plasmaproben aus der linken Pulmonalarterie bezogen auf die individuellen Werte in der Systemarterie von 11 der 20 untersuchten PHT-Patienten (55 %) war die PTHrP-Konzentration höher als die intra-assay Variabilität (17%, ermittelt aus dreifacher Auswertung einer Probe). Dies veranlaßte zu einer Subgruppenanalyse, wobei die Kinder mit einer erhöhten PTHrP-Konzentration in der Pulmonalarterie relativ zur Systemarterie als "Responder" eingestuft wurden und die Kinder mit nicht erhöhten Werten als "Non-Responder" bezeichnet wurden.

Der Vergleich bezüglich der PTHrP-Freisetzung zwischen beiden Patientengruppen ist auf Abb. 4.3 dargestellt. Es ergab sich, daß die Freisetzung von PTHrP bei der Responder-Gruppe signifikant höher lag (143,4±20,3%) als bei der Non-Responder-Gruppe (93,5±5,9%).

Ein weiterer Vergleich zeigt, daß Responder-Gruppe und Non-Responder-Gruppe sich in ihren pulmonalarteriellen Druckwerten (PAP) nicht wesentlich von einander unterscheiden (Abb. 4.4). Der mittlere Druck in der A. pulmonalis betrug 76,7±16,6 mmHg für die Responder-Gruppe und 58,5±19,9 mmHg für die Non-Responder-Gruppe. Das Alter der Patienten in beiden Gruppen variiert stark (Gesamtstreuung: 0,4 bis 16,5 Jahre), aber die Responder-Gruppe war im Schnitt älter als die Non-Responder-Gruppe (Abb. 4.5). Es ergab sich einen Altersdurchschnitt von 8,4±4,6 Jahre für die Responder- und 4,0±3,7 Jahre für die Non-Responder-Gruppe.



Abb. 4.3 PTHrP-Freisetzung der Responder- und Non-Responder-Gruppe

Dargestellt ist die Freisetzung von PTHrP im druckbelasteten Gefäß als % der PTHrP-Konzentration in der linken Pulmonalarterie relativ zur Konzentration in der Systemarterie. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 11 Responder und 9 Non-Responder-Patienten, * p<0,05 vs. Non-Responder.



Abb. 4.4 Druckwerte in der A. pulmonalis für die Responder- und Non-Responder-Gruppe

Die Abbildung zeigt den mittleren Druck in der linken Pulmonalarterie (PAP) bei Kindern aus der Gruppe der Responder oder der Gruppe der Non-Responder jeweils in mmHg. Die Daten sind \overline{X} ±SE aus 11 Patienten der Responder-Gruppe und 9 Patienten der Non-Responder-Patienten.



Abb. 4.5 Altersunterschiede zwischen Responder und Non-Responder

Dargestellt ist das Alter der Kinder aus der Responder-Gruppe (n=11) und der Non-Responder-Gruppe (n=9) jeweils in Jahren. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$, * p<0,05 vs. Responder.

4.1.3 Systemische und lokale PTHrP-Konzentrationsunterschiede bei Responder und Non-Responder

Zur weiteren Analyse der untersuchten Plasmaproben wurden diese mittels eines Ko-Auftragens einer Standardkonzentration von PTHrP(1-84) in absoluter Konzentration in ng/ml quantifiziert. Dabei fand sich, dass die PTHrP-Konzentration bei Responder-Patienten sowohl lokal (in der linken Pulmonalarterie), als auch systemisch (in der A. femoralis) signifikant erhöht ist im Vergleich zur Non-Responder-Gruppe.

Die systemischen PTHrP-Konzentrationsdaten sind in der Abb. 4.6 dargestellt und liegen mit 42,9±14,7 ng/ml bei Responder-Patienten deutlich höher als bei Non-Responder (17,3±3,5 ng/ml). Ein Vergleich der aus der linken Pulmonalarterie entnommenen Proben bei Respondern bzw. Non-Respondern ergab, dass die Konzentration an PTHrP bei Patienten der ersten Gruppe auch lokal höher lag (61,5±8,7 ng/ml) als bei Vertreter der Non-Responder (13,7±1,1 ng/ml) (Abb.4.7).



Abb. 4.6 Systemische Konzentrationsunterschiede zwischen Responder und Non-Responder

Dargestellt ist die systemische PTHrP-Konzentration (SA) für Responder (n=11) und Non-Responder (n=9) jeweils in ng/ml. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$, * p<0,05 vs. Non-Responder.



Abb. 4.7 Lokale Konzentrationsunterschiede zwischen Responder und Non-Responder

Dargestellt ist die lokale PTHrP-Konzentration (PA) der Responder (n=11) und der Non-

Responder (n=9) jeweils in ng/ml. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$, * p<0,05 vs. Non-Responder.

4.1.4 Einfluß einer Sauerstoff-Inhalation auf die PTHrP-Freisetzung bei Responder-Patienten

Eine Sauerstoff-Inhalation erfolgte zur akuten Druckminderung im kleinen Kreislauf bei den PHT-Patienten. In die Analyse gingen nur solche Patienten ein, die in den oben beschriebenen Verfahren als Responder eingestuft worden waren. Aus technischen und klinischen Gründen konnte nicht bei allen Kindern eine solche Sauerstoffinhalation durchgeführt werden. Die durch den Sauerstoff bedingte Senkung des Druckes in der A. pulmonalis verursachte eine posttherapeutisch signifikant verringerte lokale PTHrP-Freisetzung.

Wie in Abb. 4.8 dargestellt, ergab ein Vergleich des mittleren Druckes in der linken Pulmonalarterie nach Sauerstoff-Inhalation einen signifikant Abfall gegenüber der Ausgangslage (79±13mm Hg vs. 100±mm Hg). Dieser ging mit einer mit einer Abnahme der lokalen PTHrP-Freisetzung einher. Das Verhältnis der lokalen PTHrP-Konzentration reduzierte sich von 149±27% auf 102±17%) unter Drucksenkung.

Die Abbildung 4.8.a. zeigt zwei Western-Blots, die repräsentativ für die Unterschiede in der PTHrP-Konzentration im Plasma sind.



Abb. 4.8 Druckwerte in der A. pulmonalis und PTHrP-Freisetzung vor und nach O₂-Inhalation bei Responder <u>mit</u> Druckminderung

Dargestellt sind oben der mittlere Druck in der linken A. pulmonalis (PAP, in mm Hg) und unten die PTHrP-Freisetzung (als % PTHrP in der linken Pulmonalarterie bezogen auf die Systemarterie) bei Responder-Patienten jeweils vor (weißer Balken) und nach

(schwarzer Balken) Sauerstoff-Inhalation. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 5 Patienten, * p<0,05 vs. vor O₂-Inhalation.



Abb. 4.8.aPTHrP-Gehalt in der A.femoralis und in der linken Pulmonalarterie vor und nach O₂-Inhalation bei Responder <u>mit</u> Druckminderung

Gezeigt sind zwei repräsentative Westernblots des Auftrages der Plasmaproben zur Ermittlung des PTHrP-Gehaltes. Die Banden zeigen den Gehalt an PTHrP in der linken Pulmonalarterie und in die A. femoralis vor- (PA_v und SA_v) bzw. nach Sauerstoff-Inhalation (PA_n und SA_n).

Die Sauerstoff-Inhalation führte nicht bei allen als Responder im Sinne einer druckabhängigen PTHrP-Freisetzung eingestuften Patienten zu einer Minderung des pulmonalen arteriellen Drucks. Bei zwei Patienten führte die Inhalation zu keiner Druckminderung in der A. pulmonalis. Hier ließ sich auch keine Minderung in der PTHrP-Freisetzung nachweisen (Abb.4.9).

Bei diesen Patienten stiegen die Druckwerte in der linken Pulmonalarterie während der Inhalation um 20±19 % an. Die dazugehörige PTHrP-Freisetzung betrug 150±0 % vor- bzw. 136±6% nach der Sauerstoff-Inhalation (siehe Abb. 4.9.).



Abb. 4.9 Druckwerte in der A. pulmonalis und PTHrP-Freisetzung vor und nach O₂-Inhalation bei Responder <u>ohne</u> Druckminderung

Die Abbildung zeigt oben den mittleren Druck in der linken A. pulmonalis (PAP, in % vom Basalwert) und unten die lokale PTHrP-Freisetzung (in % der Systemarterie) bei Responder-Patienten jeweils vor (weißer Balken) und nach (schwarzer Balken) Sauerstoff-Inhalation. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 2 Patienten.

4.1.5 Einfluß einer Ilomedin-Therapie auf die PTHrP-Freisetzung bei Responder-Patienten

Ähnlich dem vorgenannten Vorgehen zur Sauerstoff-Inhalation wurde auch untersucht, ob eine Ansprechbarkeit gegenüber Ilomedin-Aerosolen vorliegt. Als Wirkstoff wurde das Prostazyklin-Analog Iloprost eingesetzt. Die Responder-Patienten, die mit einer Drucksenkung in der A. pulmonalis auf die Ilomedin-Verabreichung reagiert haben, zeigten eine dementsprechende Abnahme der lokalen PTHrP-Freisetzung.

Dies ist in der Abbildung 4.10 dargestellt. Der mittlere pulmonalarterielle Druck sank um 22±16mm Hg nach der Ilomedin-Inhalation. Die PTHrP-Freisetzungswerte lagen vor der Gabe von Ilomedin bei 151±21% und danach bei 88±16% (siehe Abb. 4.10.).

Festgestellt wurde außerdem, daß die 2 Responder-Patienten, die auf die Sauerstoff-Therapie ohne Druckminderung reagiert haben (s. 4.1.4), unter Ilomedin-Inhalation eine deutliche Abnahme des Druckes in der linken Pulmonalarterie zeigen:prätherapeutisch lag der pulmonalarterieller Druck bei 67,5 mmHg ; nach Ilomedin-Gabe sank der Druck auf 55,0 mmHg. Die dazugehörige PTHrP-Freisetzung in der A.pulmonalis betrug dementsprechend 150% vor- bzw. 79% nach Ilomedin-Therapie.





Dargestellt sind oben der mittlere Druck in der linken A. pulmonalis (PAP, in %) und unten die PTHrP-Freisetzung (in % der Systemarterie) bei Responder-Patienten jeweils

vor und nach Ilomedin-Inhalation. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 8 Patienten, * p<0,05 vs.

vor Ilo-Inhalation.

4.1.6 PTHrP-Freisetzung und Druckverhältnisse in der linken Pulmonalarterie bei Non-Responder-Patienten

Die Therapie mit Sauerstoff und die Ilomedin-Inhalation führten zwar bei Non-Responder zu einer Senkung des Druckes in der A. pulmonalis, allerdings gab es eine große Streuung zwischen den einzelnen Werten. Es wurden auch keine signifikanten PTHrP-Konzentrationsänderungen in der Pulmonalarterie festgestellt trotz Veränderungen im Druck. Wie in Abb. 4.11 dargestellt, ergab ein Vergleich der pulmonalarteriellen Druckwerte vor und nach Gabe von Sauerstoff bzw. Ilomedin eine Drucksenkung von 16±15% für Sauerstoff und 10±12% für Ilomedin (nicht signifikant). Die PTHrP-Freisetzungswerte (Abb. 4.11 unten) zeigten keine signifikanten Änderungen: die Werte lagen bei 92±2% vor Inhalation und bei 110±9% nach Sauerstoff-Inhalation und bei 95±16% nach Ilomedin-Inhalation.



Abb. 4.11 Druckwerte in der A.pulmonalis und PTHrP-Freisetzung bei Non-Respondern vor und nach Inhalation mit O₂ bzw. llomedin

Dargestellt sind oben der mittlere Druck in der linken A. pulmonalis (PAP, in %) und unten die PTHrP-Freisetzung (in % der Systemarterie) bei Non-Respondern jeweils vor Inhalation und nach O₂-bzw. Ilomedin-Inhalation. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 5 Patienten.

4.1.7 Einfluß einer lokalen Acetylcholin-Applikation auf die Flußwerte in der A. pulmonalis und auf die PTHrP-Freisetzung bei Responder und Non-Responder

Ein weiteres Verfahren zur akuten Drucksenkung bestand in der lokalen Applikation von Acetylcholin zur endothelabhängigen Vasodilatation. Obwohl sich die Responder und Non-Responder in ihren pulmonalarteriellen Druckwerten nicht wesentlich von einander unterscheiden (Abb. 4.4), ergab der Vergleich der Flußwerte in der A. pulmonalis, daß diese bei Patienten aus der ersten Gruppe nach Acetylcholin-Gabe wesentlich erhöht waren (APV 1,6±0,15 vs. 1,1±0,1 bei Non-Responder; Abb. 4.12). Als Fluß-Parameter für die Pulmonalarterie wurde das APV benutzt und gemessen.



Responder Non-Responder

Abb. 4.12 Flußwerte in der A.pulmonalis nach Acetylcholin-Applikation bei Responder und Non-Responder

Dargestellt ist das APV in der linken A.pulmonalis bei Responder (weißer Balken) und bei Non-Responder (schwarzer Balken) nach Acetylcholin-Gabe bezogen auf die prätherapeutischen Werten. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 11 Patienten.

Ein vergleichbarer Effekt des Acetylcholins wurde auch bei den lokalen PTHrP-Freisetzungswerten beobachtet, diese waren in der Responder-Gruppe nach Acetylcholin-Applikation massiv gestiegen (1,48±0,11 vs. 0,96±0,13 bei Non-Responder; Abb. 4.13).



Abb. 4.13 PTHrP-Freisetzung nach Acetylcholin-Applikation bei Responder und Non-Responder

Die Abbildung zeigt die PTHrP-Freisetzung für Responder und bei Non-Responder jeweils als x-faches der Konzentration der Systemarterie. Die Daten sind $\overline{X} \pm SE$ aus 11 Patienten.

4.2 PTHrP-Freisetzung in vitro

4.2.1 Einfluß von Ionomycin auf die PTHrP-Freisetzung aus koronaren Endothelzellen

Die unter 4.1. beschriebenen Experimente belegen eine druckabhängige PTHrP-Freisetzung in vivo. Um mechanistisch die druckabhängige Freisetzung von PTHrP zu untersuchen wurden im folgenden Versuche an isolierten koronaren Endothelzellen der Ratte durchgeführt. Zunächst wurde die Hypothese untersucht, daß eine Druckbelastung durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration einen Trigger für die Freisetzung von PTHrP darstellt. Dafür wurden die koronaren Endothelzellen am zweiten Wachstumstag zuerst mit Ionomycin inkubiert, was zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration und der PTHrP-Freisetzung führte. Die zusätzliche Inkubation der Endothelzellen mit einem Kalzium-Chelator (BAPTA) hatte eine Senkung der PTHrP-Freisetzung zur Folge (Abb. 4.14). Die PTHrP-Freisetzungsrate betrug 0,0±0,1% für die Kontroll-Schalen und 5,5±1,7% nach Inkubation mit Ionomycin, bzw. 2,2±1,1% nach Inkubation mit BAPTA.


Abb. 4.14 PTHrP-Freisetzung durch koronare Endothelzellen unter Einfluß von Ionomycin und BAPTA

Dargestellt ist die PTHrP-Freisetzung von kultivierten koronaren Endothelzellen der Ratte unter Kontrollbedingungen (C), nach Inkubation mit 10 µmol/l lonomycin (IONO) bzw.10 µmol/l BAPTA mit lono pro Schale. Die PTHrP-Konzentration im Überstand und in den Zellen wurde bestimmt und die Freisetzung als Anteil des PTHrP im Überstand bezogen auf den Gesamtgehalt der Schalen definiert. Die Daten sind \overline{X} ±SD aus 6

Versuchsreihen, * p<0,05 vs. C und IONO+BAPTA.

4.2.2 Einfluß von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung aus koronaren Endothelzellen

Die unter 4.1.7 beschriebene Wirkung von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung bei PHT-Patienten wurde auf zellulärem Niveau weiter verfolgt. Hierfür wurden die koronaren Endothelzellen mit Acetylcholin inkubiert. Die PTHrP-Freisetzung wurde dadurch nicht gesteigert, dafür aber der Ionomycin-induzierte Effekt signifikant

reduziert. Die Abbildung 4.15 zeigt, daß die Präinkubation der kultivierten koronaren Endothelzellen mit Acetylcholin keinen Einfluß auf die PTHrP-Freisetzung ausübt (- $0,8\pm1,7\%$ vs. $-0,02\pm1,5\%$ bei Kontrollbedingungen) und den Effekt von Ionomycin reduzierte ($6,0\pm1,7\%$ vs. $10,5\pm1,1\%$ bei IONO).



Abb. 4.15 PTHrP-Freisetzung durch koronare Endothelzellen unter Einfluß von Acetylcholin und Ionomycin

Dargestellt ist die PTHrP-Freisetzung von kultivierten koronaren Endothelzellen der Ratte unter Kontrollbedingungen (C), nach Inkubation mit 10 µmol/l Acetylcholin (ACh) bzw.10 µmol/l Ionomycin (IONO) pro Schale, oder nach Ko-Aktivierung mit ACh und IONO). Die Freisetzungsrate wurde wie unter Abb. 4.14 beschrieben kalkuliert. Die

Daten sind \overline{X} ±SD aus 6 Versuchsreihen, * und *# p<0,05 vs. C und Ach.

4.2.3 Einfluß von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung aus kultivierten Glattmuskelzellen

Das unter 4.2.2 beschriebene Experiment steht nicht im Einklang mit der unter 4.1. gefundenen vermehrten Freisetzung von PTHrP in vivo unter Acetylcholin. Deshalb wurde das Experiment mit kultivierten Glattmuskelzellen erneut durchgeführt, da diese als zusätzliche Quelle für die Freisetzung von PTHrP im Gefäßbett in Frage kommen können. Die Glattmuskelzellen wurden entsprechend dem Versuchsprotokoll jeweils mit Acetylcholin und Ionomycin oder in Kombination mit beiden Substanzen präinkubiert. Acetylcholin alleine zeigte keine Wirkung auf die PTHrP-Freisetzung und auch der Ionomycin-induzierte Effekt wurde nicht beeinflußt (Abb. 4.16). Die PTHrP-Freisetzung betrug 0,0±1,1% bei den Kontroll-Schalen, -2,2±6,4% nach Inkubation mit Acetylcholin, bzw. 26,8±2,3% nach Inkubation mit Ionomycin. Die Wirkung von beiden Substanzen zusammen führte zu einer PTHrP-Freisetzung von 28,2±2,4% (siehe Abb. 4.16).



Abb. 4.16 PTHrP-Freisetzung durch kultivierten Glattmuskelzellen unter Einfluß von Acetylcholin und Ionomycin

Die Abbildung zeigt die PTHrP-Freisetzung von kultivierten Glattmuskelzellen unter Kontrollbedingungen (C), nach Inkubation mit 10 μ mol/l Acetylcholin (ACh) bzw.10 μ mol/l Ionomycin (IONO) pro Schale und nach Ach und IONO. Die PTHrP-Freisetzung wurde wieder wie unter Abb. 4.14 beschrieben ermittelt. Die Daten sind $\overline{X} \pm$ SD aus 6

Versuchsreihen, * p<0,05 vs. C und Ach.

4.2.4 Einfluß von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung an isoliert perfundierten Rattenherzen

Als nächstes wurde die Wirkung von Acetylcholin auf die PTHrP-Freisetzung des gesamten Organs (Herz) untersucht. In diesem Experiment wurden Rattenherzen druckkonstant (50 mm Hg) salin perfundiert nach Langendorff und zur Ermittelung der PTHrP-Freisetzung die Konzentration des Peptids im Effluat gemessen. Unter diesen Bedingungen führte die Gabe von Acetylcholin (0,1 µmol/l) 3 min nach

Perfusionsbeginn zu einer signifikanten Abnahme der PTHrP-Freisetzung (Abb. 4.17). Eine höhere Konzentration an Acetylcholin führte zu Vasospasmen und konnte deshalb nicht verwendet werden.



Abb. 4.17 PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen unter Einfluß von Acetylcholin

Die Herzen wurden bei konstantem Perfusionsdruck (50 mm Hg) für 10 min perfundiert. Nach 3 min wurde Acetylcholin (0,1 μ M) zugegeben. Die einzelnen Punkte im Diagramm zeigen die Veränderungen in der PTHrP-Freisetzung (gemessen als willkürlich gewählte Einheiten, AU) während der gesamten Versuchsdauer. Die PTHrP-Freisetzung lag zu Beginn des Experiments bei 352,5±6,5 AU und erreichte nach Zugabe von Acetylcholin 256,3±5,8 AU nach 4 min bzw. 208±15,5 AU nach 9 min. Die

Daten sind X ±SD aus n=5 Experimenten;* p<0,05 vs. 0-3'.

<u>Ergebnisse</u>

4.3 Beziehung von endothelialer Wachstumsregulation und PTHrP-Freisetzung

4.3.1 Einfluß der p42 MAP-Kinase-Aktivität auf die PTHrP-Freisetzung aus koronaren Endothelzellen

Es stellte sich nunmehr die Frage nach weiteren, die PTHrP-Freisetzung aus Endothelzellen beeinflussenden Faktoren. Da es in der Literatur unterschiedliche Angaben darüber gibt, ob es eine rein mechanische oder eine basale Freisetzung gibt, wurde postuliert, daß die Differenzierung der Endothelzelle selbst eine Einflußgröße darstellt. Die Proliferation der Endothelzellen ist eine Funktion der Aktivität der p42 MAP-Kinase, die in kultivierten Endothelzellen eine recht hohe Basalaktivität hat. Es wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob eine Hemmung dieser Kinase eine Veränderung im Freisetzungsverhalten nach sich zieht.

Die Inkubation von koronaren Endothelzellen mit einem Inhibitor der p42 MAP-Kinase-Phosphorylierung (in diesem Fall PD98059, 20 μ mol/l) führte zu einem signifikanten Anstieg der PTHrP-Freisetzung um ca. 10% (8,1±1,67% vs. -1,4±1,12% bei der Kontrolle). Eine vergleichbare Wirkung auf die PTHrP-Freisetzung zeigte auch Ionomycin (8,4±2,11% vs. C). Die Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen hatte einen Anstieg der Freisetzung des Proteins um 21,8±4,28% zur Folge(siehe Abb. 4.18).



Abb. 4.18 Einfluß von PD 98059 auf die PTHrP-Freisetzung

Dargestellt ist die PTHrP-Freisetzung von kultivierten koronaren Endothelzellen der Ratte unter Kontrollbedingungen (C), nach Inkubation mit PD98059 (PD, 20 Mmol/I)) bzw. mit Ionomycin (IONO, 10 µmol/I) oder PD und IONO. Die Freisetzung von PTHrP wurde wie unter Abb. 4.18 beschrieben berechnet. Die Daten sind \overline{X} ±SD aus 6 Versuchsreihen à 20 Schalen,* p<0,05 vs. C;*# p<0,05 vs. PD und Iono.

4.3.2 Einfluß von Phenylephrin auf die PTHrP-Freisetzung

Um den Einfluß von Phenylephrin, einem α -adrenergen Agonisten, auf die Freisetzung von PTHrP zu untersuchen wurden koronare Endothelzellen mit Phenylephrin (1 µmol/l) inkubiert. Zum Vergleich wurde auch eine parallele oder gleichzeitige Inkubation mit Ionomycin und/oder PD 98059 durchgeführt (Abb. 4.19). Die Inkubation mit Phenylephrin alleine hatte keine Auswirkung auf die PTHrP-Freisetzung der koronaren Endothelzellen (1,9±1,3% vs. 0,0% bei der Kontrolle), aber bei gleichzeitiger Hemmung der p42 MAP-Kinase-Aktivierung durch PD98058 kam es zu

einem signifikanten Anstieg der Freisetzung (4,2 \pm 1,5% vs. C). Dieser Effekt konnte durch die Gabe von lonomycin nicht weiter gesteigert werden (3,5 \pm 0,6% vs. C).



Abb. 4.19 Einfluß von Phenylephrin auf die PTHrP-Freisetzung

Die Abbildung zeigt die PTHrP-Freisetzung unter Kontrollbedingungen (C), nach Inkubation mit Ionomycin (IONO, 10 µmol/I), Phenylephrin (PE, 1 Mmol/I) alleine oder gleichzeitig (PE/IONO), sowie die Freisetzung unter Einfluß von PE und PD98059 (PD, 20 µmol/I) zusammen und PE+PD+IONO. Die PTHrP-Freisetzung wurde wie unter 4.14

beschrieben bestimmt. Die Daten sind \overline{X} ±SD aus 6 Versuchsreihen à 24 Schalen,* p<0,05 vs. C.

<u>Ergebnisse</u>

4.4. PTHrP-Isoformen und deren Verteilung in der koronaren Endothelzelle

4.4.1 PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle

Neben der parakrinen Wirkung des freigesetzten PTHrP spielt das Peptidhormon als intrakriner Modulator auch für die Endothelzelle selbst eine wichtige Rolle (SCHORR et al., 2003). Die nachfolgend aufgeführten Experimente auf Zellebene dienen dem Verständnis der Mechanismen der Verteilungsregulation von PTHrP zwischen Zellkern und Zytoplasma.

Im Western Blot eines Gesamtzellextraktes ließ sich PTHrP in drei Isoformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachweisen: jeweils eine 14 kDa, eine 35 kDa Form und eine 50 kDa Form. Im Überstand ließ sich lediglich die 50 kDa Form nachweisen.

Bei der Verteilung der drei Hauptisoformen in der Endothelzelle (Abb. 4.20) sind die 35 kDa und die 50 kDa Formen ungefähr gleich zwischen Zytoplasma und Zellkern verteilt. Von der 14 kDa Form, die dem nicht-posttranslational modifiziertem PTHrP entspricht, ist aber signifikant mehr im Zellkern vorhanden (30,7±3,4% im Kern vs. 18,7±1,2% im Zytoplasma). Insgesamt befindet sich signifikant mehr PTHrP im Zellkern (54,9±2,4%), als im Zytoplasma (45,1±2,5%).



Abb. 4.20 Verteilung der PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle

Dargestellt ist die Verteilung der drei Isoformen von PTHrP zwischen Zellkern (weiße Balken) und Zytoplasma (graue Balken) von kultivierten Endothelzellen. Der Anteil der einzelnen Isoformen ist als % des Gesamtgehalts an PTHrP in der Zelle errechnet. Die Daten sind $\overline{X} \pm SD$ aus 5 Versuchsreihen à 20 Schalen,

* p<0,05 vs. Zytoplasma.

4.4.2 Einfluß eines N-Glykosylierungs-Hemmer (Tunicamycin) auf den Gehalt an PTHrP-Isoformen und deren Verteilung in der koronaren Endothelzelle

Bei der 35 kDa und 50 kDa PTHrP-Isoform handelt es sich um durch Glykosylierung post-translational modifizierten Isoformen des Peptids (Schlüter et al., 2001). Um den Einfluß einer N-Glykosylierung auf die Verteilung und Bildung von PTHrP zu untersuchen wurden mikrovaskuläre Endothelzellen mit einem N-Glykosylierungs-Hemmer (Tunicamycin, 0,5 µg/ml) inkubiert. Die Hemmung bewirkte eine signifikante Abnahme von ca.10% des Gesamt-PTHrP-Gehaltes in der Zelle. Im Zytoplasma blieb

der Anteil an PTHrP fast unverändert, aber im Kern war dieser um ca. 20% signifikant reduziert (Abb. 4.21).



Abb. 4.21 Einfluß von Tunicamycin auf den PTHrP-Gehalt in der koronaren Endothelzelle

Gezeigt sind der Gesamt-PTHrP-Gehalt der Zelle (weißer Balken, als % der Kontrolle) und der Kern- bzw. der Zytoplasma-Anteil an PTHrP (hell-grauer und dunkel-grauer Balken) nach Inkubation der Endothelzellen mit Tunicamycin. Die Daten sind \overline{X} ±SD aus 6 Versuchsreihen à 20 Schalen,* p<0,05 vs. Kontrolle.

Die Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin beeinflußte außer dem Gesamt-PTHrP-Gehalt der Zelle auch die Verteilung der einzelnen PTHrP-Isoformen. Im Zellkern war eine signifikante Abnahme nur bei der 35 kDa Form nachzuweisen (21,9±1,4% vs. 30,2±1,15% bei der Kontrolle); die anderen Isoformen waren in unveränderten Mengen vertreten (Abb. 4.22 oben). Im Zytoplasma dagegen waren keine signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung des PTHrP zu sehen (Abb. 4.22 unten).



Abb. 4.22 Einfluß von Tunicamycin auf die Verteilung der PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle

Dargestellt ist die Verteilung der drei Isoformen von PTHrP im Zellkern (oben) und im Zytoplasma (unten) von kultivierten Endothelzellen unter Kontrollbedingungen (weiße Balken) und nach Inkubation mit Tunicamycin (graue Balken). Die Daten sind ±SD aus 6 Versuchsreihen à 20 Schalen,

* p<0,05 vs. Kontrolle.

4.4.3 Einfluß eines p42 MAP-Kinase-Hemmers (PD98059) auf den Gehalt an PTHrP-Isoformen und deren Verteilung in der koronaren Endothelzelle

Da unter Hemmung der p42 MAP-Kinase eine vermehrte PTHrP-Freisetzung zu sehen war, wurde dieser Effekt auf Zellebene weiter verfolgt. Dafür wurden mikrovaskuläre Endothelzellen erneut mit dem p42 MAP-Kinase-Hemmer PD98059 präinkubiert. Dies führte zu einer signifikanten Abnahme des PTHrP-Gehaltes im Kern (1,4±0,1 vs. 0,8±0,1 bei der Kontrolle; Abb. 4.23). Die Gesamtmenge an PTHrP in der Zelle blieb aber unverändert (94,8±15% vs. 100±13,8% bei der Kontrolle; Abb. 4.24).



Abb. 4.23 Einfluß von PD 98059 auf den Gehalt an PTHrP im Kern von koronaren Endothelzellen

Die Abbildung zeigt den PTHrP-Gehalt unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit PD98059 (20 µmol/l), dargestellt als Quotient zwischen den Gehalt an PTHrP im

Kern und im Zytoplasma. Die Daten sind \overline{X} ±SD aus 6 Versuchsreihen à 20 Schalen,* p<0,05 vs. C.

<u>Ergebnisse</u>



Abb. 4.24 Einfluß von PD 98059 auf den Gesamtgehalt an PTHrP in der koronaren Endothelzelle

Dargestellt ist der gesamte PTHrP-Gehalt unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit PD98059. Der Gehalt an PTHrP ist als % der Kontrolle errechnet worden. Die Daten sind \overline{X} ±SD aus 6 Versuchsreihen à 20 Kulturschalen.

5.1 Hauptbefunde

In der vorliegenden Studie wurde eine mechanosensitive Freisetzung von PTHrP bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PHT) untersucht. Sie hatte somit das Ziel, die zuvor in vitro dargestellte mechanosensitive Freisetzung auf ihre pathophysiologische Relevanz hin zu überprüfen. Die Untersuchungen zeigten, daß es im Rahmen der erwähnten Erkrankung zu einer lokalen Freisetzung von PTHrP kommt, was zu signifikanten PTHrP-Konzentrationsgradienten zwischen pulmonalen und systemischen Kreislauf führt. Als wesentlicher neuer Befund wurde festgestellt, daß eine bestehende endotheliale Dysfunktion bei PHT-Patienten zu einer Reduktion der mechanosensitiven PTHrP-Freisetzung führt.

Weiterhin konnte bei in vitro Untersuchungen durch den Einsatz von isolierten und kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte mittels Acetylcholin und Phenylephrin nachgewiesen werden, daß rezeptorvermittelte Prozesse (in diesem Fall α-adrenerge bzw. cholinerge Rezeptoren) in koronaren Endothelzellen zur Hemmung der Kalzium-induzierten PTHrP-Freisetzung führen. Ursächlich hierfür sind Signaltransduktionsmoleküle (z.B. die Extracellular regulated kinase, ERK), die die intrazeluläre Verteilung von PTHrP beeinflussen und seine Freisetzung modifizieren. Ein weiterer Befund betrifft die Verteilung von PTHrP in der Endothelzelle und besteht darin, daß es im Zellkern vorwiegend entweder in nicht glykosylierter oder Nglykosylierter Form zu finden ist.

Diese Erkenntnisse sprechen für den Nachweis einer mechanosensitiven PTHrP-Freisetzung unter pathophysiologischen Bedingungen und dessen Modulation über spezifische Signaltransduktionsmechanismen.

73

5.2 Mechanosensitive Freisetzung von PTHrP bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie

Im kardiovaskulären System wird PTHrP sowohl im Herzen als auch in den Gefäßen exprimiert, wobei die höchste Expression im atrialen Myokard und in kardialen Gefäßen zu finden ist (BURTON et al. 1994). Zu den kardialen Effekten von PTHrP zählen die positiven Inotropie und Chronotropie sowie die vasodilatierende Wirkung auf die Koronargefäße (NICKOLS et al. 1989; MASSFELDER et al. 1999). Für die Freisetzung von PTHrP im Gefäßsystem ist bekannt, daß diese bei akuter Druckbelastung primär aus dem Endothel erfolgt, während eine chronische Druckbelastung durch eine eingeschränkte oder fehlende Freisetzung von PTHrP charakterisiert wird (FIASCHI-TAESCH et al. 1998).

Solche pathologisch veränderten Druckverhältnisse findet man auch beim Vorliegen einer pulmonalen Hypertonie (PHT). Diese Erkrankung der Pulmonalgefäße wird durch eine Imbalanz zwischen den vasodilatierenden und vasokonstringierenden Faktoren charakterisiert. Die dadurch veränderten Druckverhältnisse betreffen vorwiegend die Pulmonalarterie und führen zum Vorliegen höheren Druckwerten in diesem Gefäß (GHAMRA et al.2003). Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieser klinischen Studie war es eine mechanosensitive Freisetzung von PTHrP bei solchen PHT-Patienten nachzuweisen. Eine Herz-spezifische PTHrP-Freisetzung konnte schon bei Patienten mit erworbener Herzinsuffizienz gezeigt werden (OGINO et al. 2002), aber die für das Vorliegen von unterschiedlichen PTHrP-Konzentrationen in der Aorta und im Koronarsinus verantwortlichen Mechanismen blieben ungeklärt.

Auch in die Pathogenese der Arteriosklerose ist die regulatorische Rolle von PTHrP bezüglich der Bildung von atherosklerotischen Plaques bekannt (MARTIN-VENTURA et al. 2003) und es wurde festgestellt, daß PTHrP in den betroffenen Gefäßabschnitten hochreguliert ist (OZEKI et al. 1996). Somit scheint die Rolle von PTHrP in den pathophysiologischen Vorgängen im Gefäßsystem von Bedeutung zu sein.

Die PHT-Patienten dieser Studie wiesen abnorm hohe Druckwerte in der linken A.pulmonalis und dementsprechend erhöhte PTHrP-Konzentrationen im gleichen Gefäß auf. Durch den therapeutischen Einsatz von Sauerstoff und Ilomedin wurde versucht diese pathologisch erhöhten Druckwerte zu normalisieren. Nach dem erfolgreichen Verlauf der lokal-drucksenkenden Therapie konnte eine Abnahme der PTHrP-Plasmawerte in der linken Pulmonalarterie erzielt werden. Weiterhin zeigten solche PHT-Patienten, die ohne Druckminderung auf die Sauerstofftherapie (und ohne Änderung in den PTHrP-Gradienten) reagiert haben, unter Ilomedin-Inhalation sowohl eine Drucksenkung in der A.pulmonalis wie auch eine Abnahme der dazugehörigen PTHrP-Konzentration im genanntem Gefäß.

Diese Daten bestätigen die schnelle Anpassung der PTHrP-Freisetzung an den im Gefäß herrschenden Druck und lassen auf das Vorliegen eines mechanosensitiven PTHrP-Freisetzungsmechanismus bei diesen Patienten schließen. Im Rahmen dieser Studie wurden außerdem deutliche individuelle Schwankungen in den absoluten PTHrP-Konzentrationen und Gradienten festgestellt. Aus diesem Grund wurde bei der Plasmaproben-Analyse für jeden Patient die PTHrP-Konzentration in der linken Pulmonalarterie an die in der A.femoralis normiert und diese als interne Kontrolle benutzt.

Die in dieser Studie gemessenen absoluten Konzentrationen an PTHrP bei PHT-Patienten weichen zum Teil erheblich von bisher publizierten Literaturdaten ab (BURTIS et al. 1992). Allerdings muss kritisch angemerkt werden, daß diese Methodiken auf Grund der Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Referenzpeptide schlecht miteinander vergleichbar sind.

Ein weiterer Aspekt bezüglich der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie betrifft das Vorhandensein einer endothelialen Dysfunktion in den betroffenen Gefäßen (CELLA et al. 2001).

Es scheint, daß diese Dysfunktion in der Entstehung von strukturellen Veränderungen in der pulmonalen Gefäßwand involviert ist und dadurch eine kausale Rolle für das Bestehen und das Fortschreiten der Erkrankung spielt (BUDHIRAJA et al. 2004).

Die vaskulären Endothelzellen sind für die Freisetzung von verschiedenen gefäßwirksamen Mediatoren verantwortlich. Zu diesen zählen z.B. die Vasodilatatoren Prostazyklin und Stickstoffmonoxid (NO), sowie Endothelin, welches vasokonstriktorische Eigenschaften besitzt. Die endotheliale Freisetzung dieser vasoaktiven Substanzen ist bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie verändert und resultiert in einer Imbalanz zwischen ihnen: die Expression von Prostazyklin ist verringert (TUDER et al, 1999), die von Endothelin hingegen ist gesteigert (GIAID et al, 1993). Im Bezug auf NO bei PHT-Patienten sind die Daten unterschiedlich.

Da PTHrP im Gefäßbett auch endothelial freigesetzt wird, wurde diese Freisetzung im Bezug auf die Funktion des Endothels bei Patienten mit pulmonaler Hypertension überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Verbindung zwischen der endothelialen Dysfunktion bei PHT-Patienten und die zuvor nachgewiesene mechanosensitive Freisetzung von PTHrP festgestellt werden. Es zeigte sich, daß im Vergleich zu gesunden Testpersonen, die PHT-Patienten mit dem höchsten PTHrP-Gradienten signifikant erhöhte systemische PTHrP-Werte in der A.femoralis hatten. Diese Patienten waren im Schnitt auch älter und zeigten eine bessere Reaktion auf die Acetylcholin-Applikation (eingesetzt als Vasodilatator bei der drucksenkenden Therapie) im Sinne einer Steigerung der lokalen Endothel-abhängigen pulmonalen Blutflußgeschwindigkeit. Diejenigen Patienten, die keinen oder einen niedrigeren PTHrP-Gradienten hatten, sprachen auf Acetylcholin nicht an. Die Gruppe der letztgenannten Patienten war im Schnitt älter. Dieser Befund kann als Parameter für eine bestehende endotheliale Dysfunktion gewertet werden und führt zur Schlußfolgerung, daß die mechanosensitive PTHrP-Freisetzung bei PHT-Patienten mit einer solchen Dysfunktion verringert ist.

5.3 Endotheliale Synthese von PTHrP und Regulation seiner Freisetzung

Für die Freisetzung von PTHrP im Gefäßbett sind zwei verschiedene Zelltypen verantwortlich: zum einen die koronaren Endothelzellen und zum anderen die vaskulären Glattmuskelzellen. Nur die letzteren besitzen aber einen für die Vermittlung autokriner PTHrP-Effekte notwendigen PTH-1 Rezeptor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der intrakrine Signalweg untersucht über welchen PTHrP in koronaren Endothelzellen agiert. Bei diesem Zelltyp wurde u.a. der Druck auf die Gefäßwand als wichtiger Stimulus für die PTHrP-Freisetzung identifiziert. Der dafür verantwortliche Mechanismus erwies sich als abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration (DEGENHARDT et al. 2002). Dementsprechend führte die Inkubation von kultivierten Endothelzellen mit Ionomycin, das die Konzentration des freien Kalziums in der Zelle erhöht, zu einer gesteigerten PTHrP-Freisetzung.

Weiterhin ist bekannt, daß rezeptorabhängige Agonisten wie z.B. Acetylcholin, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen, in der Lage sind, die Freisetzung der anderen bekannten endothelial freigesetzten Mediatoren zu steigern (VANHOUTTE et al. 1995). Dies wurde auch im Bezug auf die Freisetzung von PTHrP untersucht. Die Inkubation der Endothelzellen mit Acetylcholin führte aber zu keiner Zunahme dieser Freisetzung, im Gegenteil: die obengenannte positive Wirkung von Ionomycin auf die PTHrP-Freisetzung wurde durch Acetylcholin deutlich reduziert. In vivo führte die lokale Applikation von Acetylcholin zu einer massiven PTHrP-Freisetzung in die A. pulmonalis. Da außer den vaskulären Endothelzellen, auch die Glattmuskelzellen eine zusätzliche Quelle für das im Gefäß freigesetzte PTHrP darstellen, wurden solche Zellen ebenfalls kultiviert und mit Acetylcholin inkubiert. Dies hatte aber keinen Einfluß auf die Freisetzung von PTHrP aus diesen Zellen.

Um die Wirkung von Acetylcholin auf die Freisetzung von PTHrP im gesamten Organ (das Herz) weiterhin zu verfolgen, wurden isolierte Rattenherzen druckkonstant perfundiert. Die Zugabe von Acetylcholin resultierte in diesen Fall in einer signifikanten Abnahme der PTHrP-Freisetzung. Insgesamt scheint Acetylcholin die PTHrP-

77

Freisetzung zu hemmen, indem es wahrscheinlich über andere Signaltransduktionswege wirkt, die unabhängig von der intrazellulären Kalzium-Konzentration sind.

Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Differenz zwischen der in vivo gefundenen vermehrten PTHrP-Freisetzung in die Pulmonalstrombahn unter Einsatz von Acetylcholin und dem hemmenden Effekt auf die hier verwendeten Zellsysteme. Der Grund für diese Unterschiede könnte in der verschiedenen Gefäßprovinz, in der unterschiedlichen Spezies und in dem Zusammenwirken von Fluß und Acetylcholin in vivo und der flußabhängigen Wirkung in vitro liegen. Dies ließ sich auf der Grundlage der hier erhobenen Befunde nicht eindeutig aufklären und erfordert weitergehende Untersuchungen an isolierten Zellsystemen aus der Pulmonalstrombahn der Ratte zum Beispiel.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, daß PTHrP nicht nur über den klassischen autokrinen/parakrinen Signalweg wirkt, sondern auch einen intrakrinen Signalweg in manchen Zelltypen aktivieren kann, welcher mit der Translokation des Proteins in den Nukleus verbunden ist. In Chondrozyten z.B. trägt dieser letztgenannte Signalweg u.a. zum Apoptoseschutz bei (HENDERSON et al. 1995). Auch in koronaren Endothelzellen spielt PTHrP als intrakriner Modulator eine wichtige Rolle (SCHORR et al. 2003). Zur Charakterisierung der intrakrinen Wirkung von PTHrP in Endothelzellen, wurde der Einfluß eines der Signaltransduktionsmoleküle in der Zelle auf die Freisetzung von PTHrP untersucht. Die p42 MAP-Kinase eignete sich als solches Molekül, da ihre Basalaktivität in Endothelzellen relativ hoch ist.

Bei den Untersuchungen wurde die Kinase sowohl inhibiert (PD 98058) wie auch aktiviert (Phenylephrin). Die Hemmung der p42 MAP-Kinase-Aktivierung durch PD 98058 führte zu einem signifikanten Anstieg der PTHrP-Freisetzung. Unter dem alleinigen Einfluß von Phenylephrin dagegen war keine basale Freisetzung von PTHrP nachweisbar. Beim gleichzeitigen Einsatz beider Substanzen überwog die hemmende Wirkung von PD 98058 und es konnte erneut ein signifikanter Anstieg der PTHrP-

78

Freisetzung erzielt werden. Es scheint, daß die p42 MAP-Kinase-Aktivität ein Teil des Signaltransduktionsmechanismus darstellt, der für diese Hemmung zuständig ist.

5.4 Intrazelluläre Verteilung von PTHrP

Wie im Vorfeld erwähnt worden ist, haben Untersuchungen in den letzten Jahren gezeigt, daß PTHrP in der Lage ist in den Zellkern zu gelangen und durch seine intrakrine Wirkung unterschiedliche zelluläre Prozesse zu beeinflussen (HENDERSON et al. 1995; MASSFELDER et al. 1997). Über die intrazelluläre Lokalisation des Proteins ist bekannt, daß diese Zellzyklus- und Phosphorylierungs-abhängig ist (LAM et al. 1999). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß PTHrP durch die Poren der Zellkern-Membran zwischen Zytoplasma und Kern transportiert werden kann. Außerdem wurde gezeigt, daß die Mikrotubuli in der Zelle eine wichtige Rolle bei dem nukleären Import von PTHrP spielen (LAM et al. 2002).

Auch in koronaren Endothelzellen ist die Rolle von PTHrP als intrakriner Modulator bekannt (SCHORR et al. 2003). Die Untersuchungen bezüglich der Verteilung von PTHrP in der Endothelzelle erfolgten unter Analyse der drei prädominanten Isoformen des Peptids. Deren Molekulargewicht beträgt 14 kDa-, 35 kDa- und 50 kDa-Form.

Bei der 35 kDa und 50 kDa PTHrP-Isoform handelt es sich um durch Glykosylierung post-translational modifizierten Isoformen des Peptids (SCHLÜTER et al., 2001), die ungefähr gleich zwischen Zytoplasma und Zellkern verteilt sind. Im Gegensatz dazu befand sich von der nichtglykosylierten 14 kDa Form deutlich mehr im Zellkern. Insgesamt konnte signifikant mehr PTHrP im Zellkern als im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Die Verteilung der PTHrP-Isoformen in der Endothelzelle ist in Abb. 5.1 dargestellt.



Abb.5.1 PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle

Dargestellt ist die Verteilung der drei PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle. Im Zytoplasma werden alle drei Isoformen zu gleichen Anteilen gefunden. Im Zellkern überwiegen die nichtglykosylierte 14 kDa Form (zu 50%) und die 35 kDa Form (zu 30%). Freigesetzt wird ausschließlich die 50 kDa Form.

Um weiterhin die Mechanismen der Verteilungsregulation von PTHrP zwischen Zellkern und Zytoplasma zu untersuchen wurde ein N-Glykosylierungs-Hemmer eingesetzt (Tunicamycin). Dies bewirkte eine deutliche Abnahme des Gesamtgehaltes an PTHrP in der Zelle, wobei der Kernanteil der 35 kDa Form insbesondere betroffen war. Dieser Befund zeigt, daß im Zellkern PTHrP vorwiegend entweder nicht glykosyliert (14 kDa Form) oder N-glykosyliert (35 kDa Form) nachzuweisen ist. Das in der Versuchsreihe eingesetzte Tunicamycin reduziert durch die Hemmung der N-Glykosylierung den Gehalt an PTHrP und beeinflußt somit die Zusammensetzung des Peptids in der Zelle (Abb. 5.2).



Abb.5.2 Einfluß von Tunicamycin auf die Verteilung der PTHrP-Isoformen in der koronaren Endothelzelle

Der Einsatz von Tunicamycin führte durch die Hemmung der N-Glykosylierung zu einer Abnahme des Gesamtgehaltes an PTHrP im Zellkern. Dabei ist ausschließlich der Anteil der 35 kDa Isoform des Proteins im Zellkern signifikant reduziert. Die anderen Isoformen sind in unveränderten Mengen vertreten.

Wie es schon unter 5.3. beschrieben worden ist, führte die Hemmung der p42 MAP-Kinase-Aktivität durch PD 98058 zu einem Anstieg der PTHrP-Freisetzung. Der Grund für diese gesteigerte PTHrP-Freisetzung könnte im Einfluß der p42 MAP-Kinase-Aktivität auf die Glykosylierung des Proteins liegen (Abb. 5.2). Der letztgenannte Effekt wurde weiterhin auf Zellebene verfolgt.

Es wurde angenommen, daß die p42 MAP-Kinase u.a. die N-Glykosylierung von PTHrP beeinflussen kann und dadurch seine Verteilung in der Endothelzelle ändern könnte. Bei einer verminderten N-Glykosylierung von PTHrP würde z.B. eine geringere Menge des Peptids im Kern transportiert. Dafür könnte aber eine vermehrte O-Glykosylierung des Proteins im Zytoplasma stattfinden und dementsprechend mehr PTHrP in seiner 50 kDa Isoform freigesetzt werden. Diese Hypothese würde den Anstieg der PTHrP-Freisetzung unter der p42-MAP-Kinase-Aktivität erklären. Die Hemmung durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß unter dem Einfluß eines p42-MAP-Kinase Inhibitors (PD 98058) es einerseits tatsächlich zu einer Abnahme des Anteils an PTHrP im Kern kam, aber die Gesamtmenge des Peptids in der Zelle unverändert blieb. Somit wird die Rolle der p42 MAP-Kinase in der Verteilung von PTHrP in der Zelle zwar bestätigt, aber der genaue Mechanismus, über welchen diese Verteilung und die Freisetzung des Peptides von der p42 MAP-Kinase beeinflußt werden, muss noch aufgeklärt werden.

5.5 Pathophysiologische Relevanz der Befunde

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine mechanosensitive Freisetzung von PTHrP beim Menschen unter pathophysiologischen Bedingungen nachgewiesen, die eine Antwort auf eine bestehende akute Druckbelastung darstellt. Es ist bekannt, daß diese PTHrP-Freisetzung von einer langfristigen Adaptation des vaskulären Systems begleitet wird, u.a. von einer erhöhten Expression des Peptids im Gefäßbett. (TAKAHASCHI et al 1995; NODA et al. 1997). Dies spricht für eine kausale Rolle von PTHrP in der akuten Adaptation von Gefäßen bei unterschiedlichen hämodynamischen Bedingungen. Unabhängig von der biologischen Relevanz der beschriebenen Freisetzung, wurde ein Zusammenhang zwischen den PTHrP-Gradienten im Gefäß und der Dysfunktion des vaskulären Endothels festgestellt. Dem zu Folge kann PTHrP als ein Induktor der endothelialen Funktion bei langanhaltender Druckbelastung angesehen werden.

Die weiteren Untersuchungsergebnisse belegen, daß die Freisetzung von PTHrP in Endothelzellen durch rezeptorgebundene Prozesse und Signaltransduktionsmoleküle (u.a. die p42 MAP-Kinase) modifiziert werden kann. Es wurde festgestellt, daß die Zellverteilung von PTHrP ebenfalls von diesen letztgenannten Molekülen beeinflußt wird. Dabei wurde PTHrP im Kern vorwiegend entweder nicht glykosyliert oder Nglykosyliert nachgewiesen. Die in den beschriebenen Prozessen involvierten molekularen Mechanismen bedürfen weiterer Aufklärung.

6 Zusammenfassung

Das Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), welches strukturell mit dem Parathormon verwandt ist, wird u.a. im Gefäßbett des Herzens gebildet und freigesetzt. Dieses Peptidhormon besitzt eine vasodilatierende Wirkung auf die Koronargefäße und beeinflußt außerdem positiv inotrop und chronotrop die Herzfunktion. Die vaskuläre PTHrP-Freisetzung im Bereich des Herzens spielt bekanntlich eine Rolle in der Regulation des Blutdruckes und in der Entstehung von neurohumoralen Veränderungen während verschiedener Erkrankungsstadien. Weitgehend ungeklärt war es ob eine PTHrP-Freisetzung unter pathophysiologischen Bedingungen für die herzkranken Patienten auch relevant ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde in vivo eine mechanosensitive lokale Freisetzung von PTHrP bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie (PHT) nachgewiesen, die in Folge einer bestehenden chronischen Druckbelastung pulmonalen im Kreislauf auftritt. Charakteristisch für diese Freisetzung sind die dabei entstehenden PTHrP-Konzentrationsgradienten zwischen der linken Pulmonalarterie und den in der A femoralis gemessenen systemischen PTHrP-Werte. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß diese PTHrP-Freisetzung bei PHT-Patienten mit endothelialer Dysfunktion vermindert ist. Diese Ergebnisse sprechen für eine kausale Rolle von PTHrP in der akuten Adaptation von Gefäßen bei unterschiedlichen hämodynamischen Werten. Die Befunde über den Zusammenhang zwischen der PTHrP-Freisetzung und der Dysfunktion des Endothels bei langanhaltender Druckbelastung zeigen außerdem, daß PTHrP als ein Induktor der endothelialen Funktion angesehen werden kann.

Um die Mechanismen der vaskulären PTHrP-Synthese und –Freisetzung zu untersuchen wurden in vitro Experimente durchgeführt, die eine Hemmung der Kalziuminduzierten PTHrP-Freisetzung durch rezeptorgebundene Prozesse in Endothelzellen nachgewiesen haben. Dabei wurden Acetylcholin und Phenylephrin benutzt um eine

Zusammenfassung

Wirkung auf die cholinergen bzw. α -adrenerge Rezeptoren der Endothelzelle zu erzielen.

Die Befunde nach Stimulation bzw. Hemmung der p42 MAP-Kinase-Aktivität zeigten, daß dieses Molekül ein Teil des Signaltransduktionsmechanismus ist, der die PTHrP-Freisetzung modifizieren kann. Aufgrund der Tatsache, daß nach Hemmung der p42 MAP-Kinase-Aktivität es zu einer Abnahme des PTHrP-Gehaltes im Zellkern kam, konnte der Einfluß dieser Kinase auch im Bezug auf die Verteilung von PTHrP in der Endothelzelle nachgewiesen werden.

Versuche mit dem N-Glycosylierungshemmer Tunicamycin belegten, daß PTHrP in der Zelle vorwiegend in nicht glykosylierter oder N-glykosylierter Form zu finden ist. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die mechanosensitive Freisetzung von PTHrP bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie eine Antwort auf eine akute Druckbelastung darstellt. Diese Freisetzung wird u.a. über spezifische Signaltransduktionsmechanismen modifiziert.

7 Summary

Parathyroid hormone related peptide (PTHrP) shows a structural homology to parathyroid hormone (PTH) and shares some biological activities with PTH. PTHrP is expressed in several tissues, including the heart and the vessels of the cardiovascular system. This peptide hormone exerts positive inotropic and chronotropic effects on cardiac myocytes and induces coronary vasodilatation. Several studies showed that the PTHrP release from the vascular bed contributes to the regulation of blood pressure and neurohumoral changes during states of cardiovascular diseases such as atherosclerosis and congestive heart failure. Although local release of PTHrP is known to occur in patients, who have those diseases, the question about the physiological relevance of this release remained open.

The present study has investigated mechanosensitive release of PTHrP in patients with pulmonary hypertension (PHT). It was shown that chronic hypertension in the pulmonary circulation causes a local release of PTHrP leading to significant gradients between the concentrations of PTHrP in the left A.pulmonalis versus systemic concentrations, which were measured in the A.femoralis. Furthermore, it has been demonstrated that this mechanosensitive release of PTHrP is impaired in patients with endothelial dysfunction.

These results suggest a causal role for PTHrP in the acute adaptation of vessels to different hemodynamic values. It appears also that the peptide might be taken as an inductor of endothelial function under conditions of long-lasting pressure.

The present study investigates also the mechanisms of the cellular generation and release of PTHrP. The experiments performed in vitro showed that some α -adrenergic or cholinergic receptor dependent processes are able to inhibit the release of PTHrP. Therefore, Acetylcholin and Phenylephrin were used on cultured microvascular endothelial cells.

87

Summary

The results after stimulation and inhibition of the activity of p42 MAP-Kinase indicate the role of this molecule in the mechanism of signal transduction that modifies the release of PTHrP.

Furthermore, it was found that inhibition of the p42 MAP-Kinase activity leads to a decrease of the nuclear content of PTHrP in endothelial cells. This indicates that the p42 MAP-Kinase also has an influence on the cellular distribution of PTHrP. Using Tunicamycin to inhibit N-glycosylation in endothelial cells, it was concluded that nuclear PTHrP is predominantly non-glycosylated or N-glycosylated.

In summary, the mechanosensitive release of PTHrP in patients with pulmonary hypertension appears to be an acute response to pressure overload. Specific signal transduction molecules (including the p42 MAP-Kinase) can modify this mechanosensitive release.

Budhiraja R, Tuder R, Hassoun P Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension Circulation 2004; 109:159-165

Burtis WJ Parathyroid hormone-related protein: structure, function and measurement Clin Chem (United States) 1992a; 38(11):2171-2183

Burtis WJ, Fodero JP, Gaich G, Debeyssey M, Stewart AF Preliminary characterization of circulating amino- and carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy J Clin Endocrinol Metab 1992b; 75(4):1110-1114

Burton DW, Brandt DW, Deftos LJ Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system Endocrinology 1994; 135(1):253-261

Campos RV, Asa SL, Drucker DJ Immunocytochemical localization of parathyroid hormone-like peptide in the rat fetus Cancer Res 1991; 51:6351-6357

Care AD, Abbas SK, Pickard DW, Barri ME, Drinkhill M, Findlay JB, White IR, Caple IW Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein Exp Physiol 1990; 75:605-608

<u>Literatur</u>

Cella G, Bellotto F, Tona F, Sbarai A, Mayyaro G, Motta G, Fareed J Plasma markers of endothelial dysfunction in pulmonary hypertension Chest 2001; 120:1226-1230

Curtis NE, Thomas RJ, Gillespie MT, King RG, Rice GE, Wlodek ME Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) mRNA splicing and parathyroid hormone/PTHrP receptor mRNA expression in human placenta and fetal membranes J Mol Endocrinol 1998; 21(2):225-234

Daifotis AG, Weir EC, Dreyer BE, Broadus AE Stretch-induced parathyroid hormone-related peptide gene expression in the rat uterus J Biol Chem 1992; 267:23455-23458

Davicco MJ, Rouffet J, Durand D, Lefaivre J, Barlet JP Parathyroid hormone-related peptide may increase mammary blood flow J Bone Miner Res 1993; 8:1519-1524

Degenhardt H, Jansen J, Schulz R, Sedding D, Braun-Dulläus R, Schlüter K-D Mechanosensitive release of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells

J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283:H1489-H1496

Everhart-Caye M, Inzucchi SE, Guinness-Henry J, Mitnick MA, Stewart AF Parathyroid hormone (PTH)-related protein (1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans.

J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:199-208

Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, Nicholson GS

A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP (107-111) Endocrinology 1991; 129(6):3424-3426

Fiaschi-Taesch N, Endlich N, Massfelder T, Endlich K, Stewart AF, Helwig JJ Renovascular parathyroid hormone-related protein in spontaneously hypertensive rats: dilator or trophic factor? Kidney Int 1998; 67:S207-S210

Ghamra ZW, Dweik RA Primary pulmonary hypertension: an overview of epidemiology and pathogenesis Cleve Clin J Med 2003; 70 Suppl. 1:S2-8

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension N Engl J Med 1993; 328:1732-1739

Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BM, Goltzman D, Karaplis AC Nuclear localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death Mol Cell Biol 1995; 15:4064-4075

Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Gianella-Neto D, Forrester JS, Singer FR, Goltzman D, Hendy GN, Pirola C, Fagin JA, Clemes T Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation J Clin Invest 1991; 88:1841-1847

Horiuchi N, Caulfield M, Fisher JE, et al.

Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro

Science 1987; 238:1566-1580

Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y Amino-terminal fragment (1-34) of parathyroid hormone-related protein inhibits migration and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells Atherosclerosis 1998; 136:59-66

Jiang B, Morimoto S, Fukuo K, Yasuta O, Chen S, Ogihara T Role of parathyroid hormone-related protein in the proliferation of vascular smoothe muscle cells Miner Electrolyte Metab 1995; 21:157-160

Jüppner H Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide: exploration of their biological importance Bone 1999; 25:87-90

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC

Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene

Genes & Dev 1994; 8:277-289

Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC, Kronenberg HM Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(26):15233-15238

Lam MH, House CM, Tiganis T, Mltchelhill KI, Cures A, Ramsay R, Kemp BE, Martin TJ, Gillespie MT

Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr85) of parathyroid hormonerelated protein negatively regulates its nuclear localization

J Biol Chem 1999; 274(26): 18559-66

Lam MH, Thomas R, Lakoski Loveland K, Schilders S, Gu M, Martin TJ, Gillespie MT, Jans DA

Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules

Molecular Endocrinology 2002; 16(2):390-401

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LHK, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone groth Science 1996; 273:663-666

Mangin M, Ikeda K, Drever BE, Milstone L, Broadus AE Two distinct tumor-derived PTH-like peptides result from alternative ribonucleic acid splicing Mol Endocrinol1988; 2(11):1049-1055

Martin-Ventura JL, Ortego M, Esbrit P, Hernandez-Presa MA, Ortega L, Egido J Possible role of Parathyroid hormone-related protein as a proinflammatory cytokine in atherosclerosis Stroke 2003; 34:1783-1790

Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig J-J, Stewart AF Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting Proc Natl Acad Sci USA; 94: 13630-13635

Massfelder T, Helwig J-J Parathyroid hormone-related protein in cardiovascular development and blood pressure regulation Endocrinology 1999; 140 (4): 1507-1510

Mok LL, Ajiwe E, Martin TJ, Thompson JC, Cooper CW Parathyroid hormone-related protein relaxes rat gastric smooth muscle and shows cross-desensitization with parathyroid hormone Bone Miner Res 1989; 4:433-439

Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, et al. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer line Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:5048-5052

Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, DiPette DJ, Asimakis GK Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone related-peptide, humoral hypercalcemia of malignancy factor Endocrinology 1989; 125(2):834-831

Noda M, Katoh T, Kurokawa K, Takuwa Y Increased expression of parathyroid hormone-related peptide gene in blood vessels of spontaneously hypertensive rats Hypertension 1997; 30(5): 1284-8
<u>Literatur</u>

Ogino K, Burghoff D, Bilezikian JP The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTHrelated protein Endocrinology 1995; 136:3024-3030

Ogino K, Ogura K, Kinugasa Y, Furuse Y, Uchida K, Shimoyama M, Kinugawa T, Osaki S, Kato M, Tomikura Y, Igawa O, Hisatome I, Belezikian JP, Shigemasa C Parathyroid hormone-related protein is produced in the myocardium and increased in patients with congestive heart failure J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:4722-4727

Orloff JJ, Soifer NE, Fodero JP, Dann P, Burtis WJ Accumulation of carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone/related protein in renal failure Kidney International 1993; 43:1371-1376

Ozeki S, Ohtsuru A, Seto S, Takeshita S, Yano H, Nakayama T, Ito M, Tokota T, Nobuyoshi M, Segre GV, Yamashita S, Yanko K Evidence that implicates the parathyroid hormone-related peptide in vascular stenosis. Increased gene expression in the intima of injured carotid arteries and human restenotic coronary lesions Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:565-575

Pirola CJ, Wang HM, Kamyar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA

Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post/transcriptional mechanisms J Biol Chem 1993; 268:1987-1994

Literatur

Potts JT Jr, Gardella TJ, Juppner H, Kronenberg H The history of parathyroid hormone and its receptor: structure-based design of parathyroid hormone analogues Osteoporos Int 1997; Suppl. 3: S169-173

Rian E, Jemtland R, Olstad OK, Endresen MJ, Grasser WA, Thiede MA, Henriksen T, Bucht E, Gautvik KM Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: A possible role in angiogenesis Biochem Biophys Res Commun 1994; 198:740-747

Schlüter K-D, Weber M, Piper HM Effects of PTHrP(107-111) and PTHrP(7-34) on adult cardiomyocytes J Mol Cell Cardiol 1997; 29:3057-3065

Schlüter K-D, Katzer C, Frischkopf K, Wenzel S, Taimor G, Piper HM Expression, release and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells Circ Res 2000; 86:946-951

Schorr K, Taimor G, Degenhardt H, Weber K, Schlüter K-D PTHrP is induced by stimulation of 1α-adrenoceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothel cells Mol Pharmacol 2003; 63:111-118

Soifer NE, Dee KE, Insogna KL, et al. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types J Biol Chem 1992; 367(25):18236-18243

<u>Literatur</u>

Southby J, Murphy LM, Martin TJ, Gillespie MT Cell-specific and regulator-induced promoter usage and messenger ribonucleic acid splicing for parathyroid hormone-related protein Endocrinology 1996; 137(4):1349-1357

Strewler GJ, Stern P, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nisenson RA

Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone

J Clin Invest 1987; 80:1803-1807

Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY, et al.

A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression

Science 1987; 237(4817):893-6

Takahashi K, Inoue D, Ando K, Matsumoto T, Ikeda K, Fujita T Parathyroid hormone related-peptide as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. Biochem Biophys Res Commun 1995; 208(1):447-55

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension Am J Respir Crit Care Med 1999; 159:1925-1932

Usdin TB

Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective Ligand in the hypothalamus Endocrinology 1997; 138:831-838

<u>Literatur</u>

Wlodek ME, Westcott KT, Ho PW, Serruto A, Di Nicolantonio R, Farrugia W, Moseley JM

Reduced fetal, placental, and amniotic fluid PTHrP in the groth-restricted spontaneously hypertensive rats

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000; 279(1):R31-8

Wu S, Pirola CJ, Green J, Yamaguchi DT, Okano K, Juppner H, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL

Effects of N-terminal, midregion and C-terminal parathyroid hormone-related peptides on adenosine 3',5'-monophosphate and cytoplasmic free calcium in rat aortic smooth muscle cells and UMR-106 osteoblast-like cells Endocrinology 1993; 133:2437-2444

Wysolmerski JJ, Broadus AE, Yhou J, Fuchs E, Milstone LM, Philbrick WM Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the skin of transgenic mice interferes with hair follicle development Proc Natl Acac Sci USA 1994; 91:1133-1137

Wysolmerski JJ, McCaughern-Carucci JF, Daifotis AG, Broadus AE, Philbrick WM Overexpression of parathyroid hormone-related protein or parathyroid hormone in transgenic mice impairs branching morphogenesis during mammary gland development Development 1996; 121:3539-3547

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Themas und für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Insbesondere bedanke ich mich für seine Gesprächsbereitschaft und die Geduld, mit der er mich während der gesamten Dauer der Doktorarbeit unterstützte.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Diener aus dem Fachbereich Veterinärmedizin, der trotz großer Zahl an internen und externen Doktoranden, einwilligte die Betreuung meiner Doktorarbeit zu übernehmen.

Ich möchte mich auch bei allen technischen Assistenten des Physiologischen Institutes für die freundliche Einarbeitung und die geduldige Unterstützung in der alltäglichen Arbeit im Labor bedanken. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Daniela Schreiber und Peter Volk bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt allen weiteren Mitarbeitern und Doktoranden des Physiologischen Institutes für ihren Beitrag an die schöne Zeit, die ich während der Promotionsarbeit in Gießen hatte, und an die ich mich jetzt im fernen Bulgarien sehr gerne erinnere.

10 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität-Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.