

Aus dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die kardiale Freisetzung von Parathyroidhormon-related Peptide
(PTHrP)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von
Heike Degenhardt

Gießen 2003

Aus dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie der

Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch Herrn Prof. Dr. M. Diener

**Die kardiale Freisetzung von Parathyroidhormon-related Peptide
(PTHrP)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von

Heike Degenhardt

Tierärztin aus Kelkheim (Taunus)

Gießen 2003

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2003

Es gibt Dinge innerhalb und außerhalb der eigenen Möglichkeiten.

Tsunetomo Yamamoto

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	1
1 Einleitung	5
1.1 Geschichte	5
1.2 Allgemeines.....	6
1.3 PTHrP im kardiovaskulären System	11
1.4 Fragestellung	15
2 Material.....	17
2.1 Chemikalien.....	17
2.2 Antikörper.....	19
2.3 Geräte und Laborbedarf	19
2.3.1 Zellkultur	19
2.3.2 Gelelektrophorese	20
2.3.3 Sonstige Geräte.....	20
2.3.4 Verbrauchsmaterial	20
2.4 Auswertung	21
3 Methoden	23
3.1 Experimente in vitro	23
3.1.1 Versuchstiere	23
3.1.2 Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen.....	23
3.1.2.1 Präparation und Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen	23
3.1.2.2 Passage der mikrovaskulären Endothelzellen.....	25
3.1.3 Kultivierung vaskulärer Glattmuskelzellen aus der Rattenaorta.....	26
3.1.3.1 Präparation und Kultivierung vaskulärer Glattmuskelzellen aus der Rattenaorta.....	26
3.1.3.2 Passage der vaskulären Glattmuskelzellen	27
3.1.4 PTHrP-Freisetzung in vitro	27
3.1.4.1 Freisetzung durch Zelldehnung	27
3.1.4.2 Freisetzung unter Energieverarmung.....	28

3.2	Versuche am isoliert perfundierten Rattenherzen	29
3.2.1	Versuche zur PTHrP-Freisetzung	29
3.2.2	Versuche zur Bestimmung des Koronarflusses.....	30
3.2.3	Erfassung funktioneller Parameter.....	31
3.3	Experimente in vivo	31
3.3.1	Versuchstiere	31
3.3.2	Versuchsdurchführung	32
3.4	ASD-Studie.....	33
3.4.1	Patienten	33
3.4.2	Durchführung	33
3.5	Immunpräzipitation von PTHrP aus Plasmaproben.....	34
3.6	Analytische Methoden.....	35
3.6.1	Proteinfällung	35
3.6.2	Zellernte	36
3.6.3	Gelelektrophorese	36
3.6.4	Blotverfahren	37
3.6.4.1	Westernblot	37
3.6.4.2	Dot Blot	38
3.6.5	Immunologischer Nachweis von PTHrP	38
3.6.6	Bestimmung des Proteingehaltes	39
3.6.7	Nitritbestimmung	40
3.6.8	LDH-Bestimmung.....	40
3.7	Statistik	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Mechanosensitive Freisetzung von PTHrP aus dem Koronarendothel	43
4.1.1	Freisetzung aus salin perfundierten Rattenherzen	43
4.1.1.1	Flußabhängige Freisetzung	43
4.1.1.2	Flußabhängige Freisetzung von PTHrP nach Denudierung des Endothels	46
4.1.1.3	Freisetzung von PTHrP bei erhöhter Wandschubspannung.....	47
4.1.1.4	Einfluß der NO-Synthase auf die Freisetzung von PTHrP.....	49
4.1.1.5	Einfluß des Perfusionsdrucks auf die Freisetzung von PTHrP.....	49
4.1.2	Freisetzung durch kultivierte koronare Endothelzellen.....	52

4.1.2.1	Abhängigkeit der PTHrP-Freisetzung von der Zelldehnung	52
4.1.2.2	Einfluß des Kalziumchelators BAPTA auf die dehnungsinduzierte Freisetzung	53
4.1.2.3	Einfluß von Bradykinin auf die PTHrP-Freisetzung	54
4.1.2.4	Vergleich der dehnungsinduzierten PTHrP-Freisetzung aus Endothel- und Glattmuskelzellen	54
4.1.3	Freisetzung von PTHrP aus dem Koronarendothel in vivo	55
4.1.3.1	Basale Freisetzung aus dem Koronarendothel	55
4.1.3.2	Flußabhängige Freisetzung in vivo	55
4.1.3.3	Einfluß der NO-Synthase auf die Freisetzung in vivo	57
4.1.3.4	Druckunabhängige Freisetzung von PTHrP durch Bradykinin am isoliert perfundierten Rattenherzen und in vivo	58
4.1.4	Validierung der Ergebnisse unter klinischen Bedingungen.....	59
4.2	Ischämie-bedingte Freisetzung	63
4.2.1	Ischämie-bedingte Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen .	63
4.2.2	Freisetzung durch Energieverarmung an kultivierten koronaren Endothelzellen	65
4.2.3	Freisetzung in vivo	67
4.3	Nachweis der funktionellen Relevanz des endothelial freigesetzten PTHrP ..	68
4.3.1	Wirkung synthetischer PTHrP-Peptide mit endogen biologischer Aktivität auf den Koronarwiderstand	68
4.3.2	Wirkung von PTHrP-Rezeptorantagonisten auf den Koronarwiderstand	68
4.3.3	Funktionelle Relevanz des Ischämie-bedingt freigesetzten PTHrP für die Reperfusion	69
4.4	Biologische Aktivität des immunologisch nachgewiesenen PTHrP	71
4.4.1	Biologische Aktivität von authentischem humanem PTHrP	71
4.4.2	Biologische Aktivität von authentischem porcinem PTHrP	72
5	Diskussion	75
5.1	Hauptbefunde	75
5.2	Mechanosensitive Freisetzung von PTHrP	75
5.3	Ischämie-bedingte Freisetzung von PTHrP	80
5.4	Physiologische und pathophysiologische Relevanz von PTHrP	81
5.5	Schlußfolgerung.....	83

6 Zusammenfassung	85
7 Summary	87
8 Literatur	89
9 Danksagung	99

Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	aqua bidestilata
ASD	Atrialer Septumdefekt
BAPTA	1,2-Bis-(2-aminophenoxyethane-)N,N,N',N'- tetraacetic acid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAP	mittlerer koronar-arterieller Druck
CBF	mittlerer koronarer Blutfluß
CEC	Koronare Endothelzellen
ck-BB	Kreatininkinase BB
CR	Koronarwiderstand
DG	Deoxyglukose
DTE	Dithioerytritol
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Serum fetaler Kälber
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HR	Herzfrequenz
HUVECS	humane Endothelzellen der Nabelschnur

IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
IP	Immunpräzipitation
i.p.	immunpräzipitiert
i.v.	intravenös
KCN	Kaliumcyanid
LA	linker Vorhof
LDH	Laktatdehydrogenase
L-NA	N _ω -Nitro-L-Arginin
LOH	lokale osteolytische Hyperkalzämie
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck
LVdP/dTmax	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
LVdP/dTmin	maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
LVpP	linksventrikulärer Spitzendruck
MAH	malignancy associated hypercalcemia
MAP	mitogen aktiviertes Protein
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCS	Serum neonataler Kälber
NLS	nuclear localization signal
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
PA	Pulmonalarterie
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PDGF	platelet derived growth factor
PE	Phenylephrin
PGI ₂	Prostazyklin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTH	Parathormon
PTH1R	PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1
PTH2R	PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 2
PTH3R	PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 3
PTHrP	Parathyroidhormone-related peptide
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
SA	Systemarterie
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIP 39	Tubuloinfundibular peptide of 39 residues
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VC	Vena cava superior
VSMC	Vaskuläre Glattmuskelzellen
ZNS	zentrales Nervensystem

Einheiten

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
IU	Internationale Einheit
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
mA/cm ²	Milliampere pro Quadratzentimeter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
nM	nanomolar
P	Poise
pg	Pikogramm
U/min	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Geschichte

In den zwanziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde erstmals eine Hyperkalzämie beschrieben, welche bei Patienten im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen auftritt (ZONDEK et al. 1924, GUTMAN et al. 1936). Diese sogenannte ‚malignancy associated hypercalcemia‘ (MAH) ist eines der häufigsten paraneoplastischen Syndrome. Sie wurde ursprünglich auf lokale osteolytische Prozesse zurückgeführt, welche bei Knochenmetastasen durch Osteoklasten-aktivierende Zytokine ausgelöst werden (local osteolytic hypercalcemia; LOH). Gegen diese Genese sprach aber die Tatsache, daß MAH einerseits auch bei Patienten auftrat, welche keine Knochenmetastasen ausgebildet hatten und andererseits in vielen Fällen nach Entfernung des knochenfernen Tumors verschwand.

1941 vermutete FULLER als Ursache für die MAH das Vorhandensein eines ektopischen Hyperparathyroidismus, welcher auf einen humoralen Faktor zurückzuführen sei. Dieser müsse von den Tumoren selbst gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben werden. Er nahm an, daß es sich bei diesem Faktor um das erst kürzlich entdeckte Parathormon (PTH) oder eine ähnliche Substanz handele. Diese These wurde unterstützt durch die Tatsache, daß Extrakte aus MAH-erzeugenden Tumoren in PTH-sensitiven, Adenylatzyklase-stimulierenden Assays eine biologische Aktivität besaßen (STEWART et al. 1983).

Nachdem in den sechziger Jahren entwickelte Radioimmunoassays konträre Ergebnisse bezüglich veränderter PTH-Plasmakonzentrationen bei Tumorpatienten lieferten (RIGGS et al. 1971, POWELL et al. 1973), ergaben neuere, intaktes PTH erkennende Tests, daß die meisten Patienten mit MAH erniedrigte oder nicht nachweisbare PTH-Spiegel besitzen (ENDRES et al. 1989, SIMPSON et al. 1983). Somit schied PTH als ‚hypercalcemic factor of malignancy‘ aus.

1987 gelang es schließlich BURTIS et al., MOSELEY et al. und STREWLER et al. unabhängig voneinander, aus verschiedenen Tumorzelllinien ein Protein zu extrahieren, welches die Adenylatzyklase zu stimulieren und die Effekte von PTH an Niere und Knochen zu imitieren vermochte. Diese Eigenschaft und die Tatsache, daß die N-terminalen Aminosäuresequenzen mit denen des PTH übereinstimmen, führten zur Namensgebung ‚Parathyroidhormone-related peptide‘ (PTHrP).

1.2 Allgemeines

Obwohl PTHrP anfangs aufgrund seiner PTH-ähnlichen Wirkungen charakterisiert wurde, stellte sich im Zuge weiterer Untersuchungen heraus, daß PTH und PTHrP eine große Variabilität bezüglich Bildung, Zielzellen, intrazellulären Signalwegen und Effekten zeigen und PTHrP durch para-, auto- und intrakrine Wirkungsweise Aufgaben im fetalen und adulten Organismus erfüllt, die sich von denen des PTH unterscheiden.

Bei PTHrP und PTH handelt es sich um Produkte zweier unterschiedlicher Gene, welche auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind und die sich in der Komplexität ihres Aufbaus unterscheiden. Während das PTH-Gen nur über drei Exons verfügt, besitzt das für PTHrP kodierende bei allen bisher untersuchten Tierspezies acht, wobei Exon zwei, drei und vier Ähnlichkeit mit dem PTH-Gen aufweisen. Beim Menschen wurden neun Exons und drei Promotorregionen gefunden. Das Gen besitzt den Charakter eines early genes, d.h. daß die Expression schnell und transient hochreguliert werden kann.

Auch hinsichtlich der Lokalisation ihrer Expression finden sich Unterschiede. So wird PTHrP im Gegensatz zu PTH, welches nur von der Schilddrüse gebildet wird, nahezu ubiquitär exprimiert, z.B. in Haut, Knochenmark, Hypothalamus, ZNS, dem kardiovaskulären System und Organen mit einem großen Anteil glatter Muskulatur, wie Magen, Blase oder Uterus.

Ratte, Maus und Huhn verfügen nur über eine Form des PTHrP, welches bei Maus und Huhn aus 139 Aminosäuren und bei der Ratte aus 141 aufgebaut ist. Abgesehen von zwei Ausnahmen ist die Sequenz bis Aminosäure 111 identisch, distal davon

treten speziesspezifisch große Unterschiede auf (MARTIN et al. 1991). Allerdings dürfte das Protein durch den hohen Anteil von Serin und Threonin in diesem Abschnitt eine ähnliche Tertiärstruktur aufweisen. Beim Menschen können je nach Zelltyp durch alternatives Splicing bis zu zwölf Transkripte und drei verschieden große initiale Translationsprodukte gebildet werden (SOUTHBY et al. 1996). Die Freisetzung der so entstandenen Isoformen PTHrP1-139, 1-141 und 1-173 erfolgt, wie auch die Freisetzung von PTHrP anderer Spezies, in glykosilierter Form.

Aus dem eigentlichen Translationsprodukt entstehen durch post-translationale, endoproteolytische Spaltung durch Enzyme der Prohormon-Konvertase-Familie verschiedene biologisch aktive Teilpeptide. Beim Menschen sind drei Fragmente bekannt. Zum einen ein N-terminales Fragment (PTHrP1-36), zum anderen ein mittregionales (PTHrP38-94) und ein C-terminales Teilpeptid (PTHrP107-139) (SOIFER et al. 1992, BURTIS et al. 1992b, ORLOFF et al. 1993).

Aufgrund seiner Homologie in acht der ersten dreizehn Aminosäuren ist PTHrP in der Lage, die durch den N-terminalen Abschnitt ausgelösten Wirkungen von PTH zu imitieren, welche durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase vermittelt werden. Hier handelt es sich um Effekte an den klassischen PTH-Zielzellen in Knochen und Niere bezüglich der Kalziumregulation. PTHrP führt in der Niere zu einem Anstieg der Kalziumrückresorption und der Phosphatexkretion. Indirekt nimmt es Einfluß auf die Kalziumregulation über die Steigerung der Konversion von 25-Hydroxycholecalciferol in 1,25-Dihydroxycholecalciferol und der Knochenresorption (HORIUCHI et al. 1987, YATES et al. 1988, STREWLER et al. 1987). Diese Effekte werden vermittelt über den klassischen Rezeptor für PTH (PTH1R), an den sowohl PTH1-34 als auch PTHrP1-36 bindet. Hierbei handelt es sich um einen heptahelikalen, G-Proteingekoppelten Rezeptor, welcher zur Familie der Serotonin/Calcitonin-Rezeptoren zählt. Er weist eine hohe Expression in Niere und Knochen auf, wird aber auch in einer Vielzahl anderer Gewebetypen exprimiert (JÜPPNER 1999). Seine Aktivierung durch die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren bewirkt eine über die Stimulierung der Adenylatzyklase hervorgerufene Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle und somit eine Aktivierung der Proteinkinase A. Dieser Rezeptor konnte bisher bei Ratte, Maus und Mensch kloniert werden. Die Bindung des Proteins an den Rezeptor scheint sowohl bei PTH als auch bei PTHrP durch eine Domäne gewährleistet zu werden, welche zwischen den Aminosäuren 15 und 34 liegt. Da in

diesem Bereich die Aminosäuresequenzen der beiden Proteine unterschiedlich sind, wird eine ähnliche Sekundärstruktur angenommen.

Der Subfamilie der Serotonin/Calcitonin-Rezeptoren gehören neben dem PTH1R noch zwei weitere für PTH bzw. PTHrP spezifische Rezeptoren an. Im Gegensatz zum PTH1R wird der von USDIN et al. 1995 identifizierte PTH2R nur in wenigen Geweben bzw. nur in bestimmten Zelltypen der jeweiligen Organe exprimiert. Die Gebiete höchster Expression befinden sich im Gehirn, eine geringere Ausprägung weisen die glatte Gefäßmuskulatur, die Herzmuskelzellen, die Endothelzellen des Herzens und arterieller Gefäße, der exokrine Pankreas und die Lunge auf. In seiner Aminosäuresequenz besitzt der Rezeptor eine 52%ige Homologie gegenüber dem PTH1R, wird jedoch von PTHrP nicht aktiviert (USDIN et al. 1997). Als einziger Ligand konnte zunächst PTH identifiziert werden. Der durch PTH induzierte, PTH2R vermittelte cAMP-Anstieg ist speziesspezifisch unterschiedlich ausgeprägt. So erreichte die cAMP-Konzentration in mit humanem PTH2R transfizierten COS7-Zellen nach Stimulation mit PTH einen dreifach höheren Wert als in Zellen, welche mit dem PTH2R der Ratte transfiziert waren (HOARE et al. 1999). Diese Beobachtung und der Umstand, daß im Gehirn zwar eine hohe Expression an PTH2R-mRNA, aber keine (HOARE et al. 1999) oder nur geringe Mengen (HARVEY und FRASER 1993, USDIN et al. 1997) an PTH-mRNA gefunden werden konnten, ließ einen weiteren, womöglich effektiveren Liganden für den PTH2R vermuten. Aus dem bovinen Hypothalamus konnte ein Protein isoliert werden, welches keine Aktivität am PTH1R besitzt und eine limitierte Homologie zu PTH und PTHrP aufweist (USDIN et al. 1999). Die Bindung dieses sogenannten ‚Tubuloinfundibular peptide of 39 residues‘ (TIP 39) an den PTH2R bewirkte bei der Ratte einen zweimal höheren Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle als bei Stimulation des Rezeptors durch PTH. Aufgrund dessen ist TIP39 wahrscheinlich als primärer Ligand des PTH2R anzusehen (HOARE et al. 1999, USDIN et al. 2000).

Nicht nur unter den verschiedenen Säugetierspezies besteht eine große Homologie bezüglich struktureller und funktioneller Eigenschaften von PTH1R bzw. PTH2R, sondern es konnten auch entsprechende Rezeptoren in Fischen gefunden werden (RUBIN et al. 1999), was auf ein hohes entwicklungsgeschichtliches Alter des PTHrP hinweist. Im Zebrafisch gelang es zudem, einen Rezeptor zu isolieren, welcher im Gegensatz zu PTH1R und PTH2R nicht PTH, sondern N-terminale PTHrP-Fragmente als Liganden besitzt. Dieser als PTH3R bezeichnete Rezeptor gehört

ebenfalls zur Subfamilie der Serotonin/Calcitonin-Rezeptoren. Da sowohl PTH1R als auch PTH2R des Zebrafisches eine große Homologie mit den entsprechenden Rezeptoren der Säugetiere aufweisen, wird das Vorkommen eines dem PTH3R entsprechenden Rezeptors auch in Säugetieren vermutet.

Neben den oben beschriebenen Wirkungen auf die Kalziumhomöostase haben N-terminale Fragmente von PTHrP in allen Geweben, die bisher untersucht wurden, regulatorische Effekte bezüglich Entwicklung, Differenzierung und Wachstum, welche ebenfalls über den PTH1R vermittelt werden. So ist PTHrP beispielsweise beteiligt an der Ausbildung des Skeletts über Beeinflussung der Chondrozytenproliferation und -differenzierung und somit der endochondralen Knochenformation (KARAPLIS et al. 1994, LANSKE et al. 1996). Diese wichtige Rolle von PTHrP während der Entwicklung unterstreichen Versuche mit PTHrP- und PTH1R-knock-out-Mäusen, welche bei Geburt oder bereits in utero mit schwerwiegenden Skelettmißbildungen sterben (KARAPLIS & KRONENBERG 1996). Auch in der Entwicklung von Haut, Brustdrüse, Niere und kardiovaskulärem System ist PTHrP von entscheidender Bedeutung (DAVICCO et al. 1993, CAMPOS et al. 1991, WYSOLMERSKI et al. 1994 und 1996).

Ein weiterer über PTH1R vermittelter Effekt von PTHrP ist die Relaxation glatter Muskulatur. So verhindern N-terminale Fragmente bei der Ratte eine Acetylcholin-induzierte Kontraktion der Glattmuskelzellen des Uterus während der Gravidität (BARRI et al. 1992). Zudem bewirkt PTHrP durch eine Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur eine Vasodilatation.

An humanen Keratinozyten und Zelllinien squamöser Tumoren, welche nicht über PTH1R verfügen, sind N-terminale Fragmente von PTH und PTHrP in der Lage, die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu erhöhen, ohne daß es dabei zu einer Akkumulation von cAMP in der Zelle kommt. Dies legt den Schluß nahe, daß noch ein anderer Rezeptor für N-terminale Abschnitte vorhanden sein muß (ORLOFF et al. 1995).

Der indirekte Nachweis eines weiteren durch N-terminale PTHrP-Fragmente aktivierbaren Rezeptors gelangen YAMAMOTO et al. 1997 an Schnitten des Nucleus

supraopticus der Ratte. Im Gegensatz zu einer Stimulation mit PTH1-34 führte hier eine Inkubation mit PTHrP1-34 über den Anstieg von cAMP und der Aktivierung der Proteinkinase A zu einer konzentrationsabhängigen Freisetzung von Arginin-Vasopressin. Im ZNS könnte PTHrP demzufolge indirekt an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt sein. Eine Isolation bzw. Klonierung dieses PTHrP-spezifischen Rezeptors gelang bisher nicht.

Auch während der Trächtigkeit spielt PTHrP hinsichtlich der extrazellulären Kalziumhomöostase eine wichtige Rolle. Versuche an Schafen ergaben, daß PTHrP über eine Stimulation der plazentären Kalziumpumpe im Gegensatz zu PTH an der Regulation des plazentären Kalziumtransfers mitwirkt (KOVACS et al. 1997). Der Fetus verbleibt so gegenüber dem Muttertier in einem hyperkalzämischen Zustand. Als Hauptquelle für PTHrP gilt hier die Nebenschilddrüse des Fetus, eine Bildung erfolgt aber auch in der Plazenta selbst. Dieser Effekt wird laut CARE et al. (1990) und MACISAAC et al. (1991) über ein mittregionales Fragment vermittelt, welches die Aminosäuren 75 bis 87 beinhaltet, so daß das Vorhandensein eines Rezeptors für mittregionale Fragmente angenommen werden muß. Dieser muß sich vom klassischen Rezeptor unterscheiden und konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

C-terminale Fragmente von PTHrP inhibieren wirksam die Knochenresorption durch Osteoklasten. Die Signaltransduktion scheint eine andere als die bei Calcitonin zu sein, da in den Osteoklasten kein Anstieg von cAMP zu finden ist. Der Effekt ist durch einen Proteinkinase C-Inhibitor hemmbar und wird wahrscheinlich ausgelöst durch PTHrP107-111. Dieses Teilpeptid wird auch Osteostatin genannt (FENTON et al. 1991). Der für die Vermittlung dieses Effektes verantwortliche Rezeptor wurde bisher ebenfalls noch nicht gefunden.

Obwohl je nach verwendetem Immunoassay starke Schwankungen der Plasmakonzentration gemessen werden (BURTIS 1992a), ist davon auszugehen, daß PTHrP im zirkulierenden Blut bei gesunden Organismen nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegt. Diese Tatsache weist darauf hin, daß es sich bei den oben genannten Effekten um para- oder autokrine Wirkungsmechanismen handelt.

Der Nachweis von PTHrP im Nukleolus von COS-7-Zellen, humanen Keratinozyten und vaskulären Glattmuskelzellen im Rahmen neuerer Untersuchungen deutet auf einen zusätzlichen intrakrinen Effekt hin. Die Aminosäuren 87 bis 107 stellen ein sogenanntes ‚nuclear localization signal‘ (NLS) dar, welches für einen intrakrinen Effekt verantwortlich sein könnte und Voraussetzung ist für die Translokation des Proteins in den Kern. Die möglichen intrakrinen Wirkungen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutet wird eine Beeinflussung von zellulären Funktionen. So führt eine nukleäre Lokalisation von PTHrP in Skelettzellen unter Apoptosebedingungen zu einem Anstieg der Überlebensrate gegenüber Kontrollzellen (HENDERSON et al. 1995) und verzögert PTH1R-unabhängig die Invasion von Gefäßen und Osteoblasten in hypertrophischen Knorpel (LANSKE et al. 1999). In kultivierten, vaskulären Glattmuskelzellen stimulieren intranukleäre C-terminale Fragmente die Proliferation (MASSFELDER et al. 1997, DEMIGUEL et al. 2001).

Zusammenfassend dargestellt ist eine erste für PTHrP-spezifische funktionale Domäne in C-terminaler Richtung der PTH und PTHrP gemeinsamen Adenylatzyklase-aktivierenden Domäne lokalisiert und koppelt ebenfalls über die Adenylatzyklase an PKA-abhängige Pfade. Eine zweite liegt zwischen Aminosäure 37 und 107 und stimuliert den plazentären Kalziumtransport. Eine dritte befindet sich zwischen den Aminosäuren 107 und 111, sie koppelt an einen PKC-aktivierenden Pfad. Diese funktionellen Abschnitte liegen in einem Teil des Moleküls, welches keine Ähnlichkeiten mit PTH aufweist. Dies läßt für diese Abschnitte spezifische Rezeptoren vermuten, welche bisher aber noch nicht gefunden wurden, und zeigt, daß es sich bei PTHrP um ein eigenständiges Peptidhormon handelt, welches sich durch eine Vielzahl von Effekten von PTH unterscheidet.

1.3 PTHrP im kardiovaskulären System

Im kardiovaskulären System wird PTHrP sowohl in den Gefäßen als auch im Herzen selbst exprimiert. Im adulten Herzen finden sich die höchsten Expressionslevel im Vorhofmyokard und den kardialen Gefäßen (BURTON et al. 1994), die Myozyten der Ventrikel exprimieren im Gegensatz zu denen der Vorhöfe PTHrP nicht (SCHLÜTER et al. 2000).

Während über die Regulation der Expression von PTHrP in den Endothelzellen der Gefäße noch relativ wenig bekannt ist, erfolgt eine schnelle und transiente Hochregulierung der Expression in den vaskulären Glattmuskelzellen bei Stimulation mit vasoaktiven Peptiden wie Angiotensin II, Bradykinin, Serotonin, Endothelin, Noradrenalin und Thrombin (PIROLA et al. 1993). Auch Wachstumsfaktoren und mechanische Stimuli (NODA et al. 1994, PIROLA et al. 1994) führen zu einer erhöhten Expression genauso wie die Distension der Rattenaorta durch einen Ballonkatheter (DAIFOTIS et al. 1992). In hypertensiven Tieren ist die Expression ebenfalls hochreguliert.

Auch im kardiovaskulären System ist PTHrP an der fetalen Entwicklung beteiligt. Im Rattenfetus wird eine Expression von PTHrP und PTH1R etwa ab dem elften Tag der Gravidität beobachtet, ab diesem Zeitpunkt beginnt auch die Entwicklung des Herzens und der großen Gefäße. Transgene Mäuse, welche sowohl PTHrP als auch PTH1R in vaskulären Glattmuskelzellen überexprimieren, sterben in diesem Trächtigkeitsabschnitt mit Abnormalitäten in der Herzentwicklung (QUIAN et al. 1999). Einen weiteren Hinweis auf eine regulatorische Beteiligung von PTHrP an der Ausbildung der Gefäße liefert die Beobachtung, daß die Proliferationsrate in Glattmuskelzellen der Aorta von fetalen PTHrP-knock-out-Mäusen vermindert ist (MASSFELDER et al. 1997).

Im kardiovaskulären System des adulten Organismus sind die Zielzellen von PTHrP die Glattmuskelzellen, atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten und Schrittmacherzellen, während Endothelzellen keinen Rezeptor besitzen (RIAN et al. 1994).

Die durch PTHrP an Kardiomyozyten hervorgerufenen Effekte können nur teilweise von PTH simuliert werden. PTHrP1-34 hat am isoliert perfundierten Rattenherzen eine positiv chronotrope und inotrope Wirkung. Während der Anstieg der Herzfrequenz auch mit PTH hervorrufbar und am lebenden Tier sogar ausgeprägter ist, ist die positive Inotropie alleiniger Effekt von PTHrP (NICKOLS et al. 1989; OGINO et al. 1995). Auch an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten stimuliert PTHrP1-34 im Gegensatz zu PTH1-34 über die Adenylatzyklase die kontraktile Reaktion (NICKOLS et al. 1989; SCHLÜTER et al. 1997). Dieser Umstand und die Tatsache, daß PTH an adulten Kardiomyozyten keinen direkten Einfluß auf den cAMP-Gehalt und cAMP-abhängige Zellfunktionen besitzt, während sowohl PTHrP1-

34 als auch PTHrP7-34 eine Akkumulation von cAMP in der Zelle induzieren, weisen auf eine andere Ankopplung oder einen Rezeptor in adulten ventrikulären Kardiomyozyten hin, der nicht identisch mit dem PTH1R ist.

Ein weiterer Effekt an adulten Kardiomyozyten wird durch C-terminale Fragmente hervorgerufen. PTHrP107-111 steigert neben der Aktivität der fetalen Kreatinkinase-Isoform Kreatinkinase-BB (Ck-BB), welche bei kardialer Hypertrophie reexprimiert wird, auch die Proteinsynthese, die totale Proteinmasse und das Zellvolumen. Die Vermittlung dieser Effekte erfolgt über die Proteinkinase C mit Ausnahme der die Ck-BB betreffenden, welche über mitogen activated protein (MAP)-Kinase vermittelt sind. Somit besitzt das C-terminale Ende des PTHrP Charakteristika eines Wachstumsfaktors für adulte Kardiomyozyten (SCHLÜTER et al. 1997). Unterstützt werden diese in vitro erhobenen Befunde durch die Beobachtung, daß C-terminale Fragmente bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Dialyse erhöht sind. Diese Patienten weisen als hauptsächliche kardiale Veränderung unter langfristiger Dialyse eine Hypertrophie des linken Ventrikels auf.

In der Pathophysiologie des Gefäßsystems scheint PTHrP ebenfalls eine Rolle zu spielen. So haben N-terminale Fragmente an vaskulären Glattmuskelzellen einen über PTH1R vermittelten antiproliferativen Effekt und verhindern deren platelet derived growth factor (PDGF)-gesteuerte Migration in vitro (ISHIKAWA et al. 1998). Sowohl die Proliferation als auch die Migration ins Lumen sind für die Bildung einer Neointima verantwortlich, welche als Teil von Spätkomplikationen im Zusammenhang mit Angioplastien koronarer und anderer Arterien in Verbindung mit Arteriosklerose auftreten. PTHrP ist in Media und Neointima von angioplastischen Arterien hochreguliert (OZEKI et al. 1996) genauso wie in arteriosklerotischen und teilweise verschlossenen humanen Arterien (NAKAYAMA et al. 1994). Wie dieser antiproliferative Effekt im Zusammenhang mit der bereits unter 1.2 beschriebenen proliferationssteigernden Wirkung zu sehen ist, welche über intrakrine Signalwege ausgelöst wird, ist noch unklar.

Durch seine Fähigkeit, Glattmuskelzellen zu relaxieren und somit Gefäße zu dilatieren, trägt PTHrP zur Regulation des systemischen Blutflusses bei. Dieser vasodilatierende Effekt von PTHrP wird über PTH1R in der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt

(WU et al. 1993). So findet man bei transgenen Mäusen, welche PTHrP in der glatten Muskulatur überexprimieren, einen verminderten systemischen Blutdruck. Genauso verhält es sich bei Mäusen, welche PTH1R in vaskulären Glattmuskelzellen überexprimieren (QUIAN et al. 1999). Diese reagieren zudem bei intravenöser Gabe von PTHrP1-34 mit einem signifikant stärkeren Blutdruckabfall und stärkerer Reduzierung des peripheren Widerstandes als die Kontrolltiere. Auch an isolierten Aorten solcher Tiere war die Vasodilatation stärker ausgeprägt. In nicht transgenen Tieren ruft exogen zugegebenes PTHrP ebenfalls einen Abfall des systemischen Blutdrucks hervor. Intravenöse Gaben sowohl von PTHrP als auch PTH reduzieren den Blutdruck dosisabhängig bei nicht narkotisierten Ratten, wobei zum Erzielen des gleichen Effektes eine niedrigere Dosierung von PTHrP gegenüber PTH notwendig ist.

An präkontrahierten Aorten von Mäusen und Ratten bewirken PTHrP1-34 und PTH1-34 eine dosisabhängige Relaxierung. Die erneute Gabe von PTHrP zeigt einen wesentlich geringeren Effekt. Diese Desensibilisierung des Rezeptors ist wahrscheinlich in einer Liganden-abhängige Phosphorylierung und Inaktivierung durch G-Protein-Kinasen begründet. Diese Beobachtung wird auch gemacht an Knochen-, Nieren- und Glattmuskelzellen in vitro, genauso wie in vivo bei PTHrP-knock-out-Mäusen. Hier geht die Desensibilisierung gegenüber PTHrP einher mit einer Desensibilisierung gegenüber Acetylcholin und möglicherweise anderen Vasorelaxantien.

Allerdings weist die auto- und parakrine Wirkungsweise genauso wie die niedrige Plasmakonzentration und die geringe Halbwertszeit in erster Linie auf eine Rolle des PTHrP als Regulator lokaler Flüsse und nicht des systemischen Blutdrucks hin. Beispielsweise erwies sich PTHrP in renalen Arterien (WINQUIST et al. 1987) und Arteriolen (TRIZNA & EDWARDS 1991) als besonders potenter Vasodilatator. In narkotisierten Ratten führt eine intrarenale Infusion von PTHrP1-36 zu einer Erhöhung des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtrationsrate und der Diurese (MASSFELDER et al. 1996). Auch beim Menschen konnte bei einer Dosierung, die ohne Einfluß auf den systemischen Blutfluß blieb, ein Anstieg des renalen Plasmaflusses um ca. 40% beobachtet werden (WOLZT et al. 1997). Diese Wirkung wird durch PTH1R vermittelt. Unter Basalbedingungen scheint PTHrP aber an der

Regulation des renalen Gefäßtonus nicht entscheidend beteiligt zu sein, da die Gabe eines PTH1R-Antagonisten ohne Auswirkungen auf den renalen Blutfluß blieb (FIASCHI-TAESCH et al. 1998). PTHrP1-36 stimuliert wirksamer als PTH die Renin-Sekretion aus den juxtaglomerulären Zellen der isoliert perfundierten Rattenniere (SAUSSINE et al. 1993). Der Signalweg ist bisher ungeklärt. Die Renin-Sekretion wird durch Vasokonstriktoren und mechanische Stimuli supprimiert. Hier könnte PTHrP als Gegenspieler fungieren, da dessen Expression durch die gleichen Faktoren hochreguliert wird.

Obwohl PTH nicht nur – wie oben beschrieben – einen hypotensiven Effekt bei Ratten und Mäusen, sondern auch bei Hunden, Hühnern und anderen Spezies aufweist, wird es als Vasodilatator kontrovers diskutiert. Dies begründet sich darin, daß die zur Dilatation notwendigen Konzentrationen weit über den physiologisch vorkommenden liegen und zudem Patienten mit primärem Hyperparathyreoidismus und somit erhöhter Plasmakonzentration an PTH häufig an Hypertonie leiden, welche sich nach Parathyroidektomie wieder normalisiert. Hinzu kommt, daß am isoliert perfundierten Rattenherzen der vasodilatierende Effekt des PTHrP denjenigen des PTH übertrifft (NICKOLS et al. 1989). Ein para- oder autokriner Wirkmechanismus des lokal gebildeten und freigesetzten PTHrP und die Annahme, daß PTHrP und nicht PTH im kardiovaskulären System den eigentlichen Liganden für PTH1R darstellt, würde diesen Widerspruch erklären.

1.4 Fragestellung

Neben systemischen Botenstoffen und neuralen Faktoren unterliegt der Koronarwiderstand und somit auch die Myokarddurchblutung und –funktion dem Einfluß lokaler Mediatoren, welche vom Endothel gebildet und freigesetzt werden. Als wichtigste bisher bekannte Autakoide sind Stickstoffmonoxid, Prostazyklin, EDHF und Endothelin zu nennen. Mit Ausnahme des Endothelins, welches vasokonstriktorische Eigenschaften besitzt, wirken diese Stoffe gefäßerweiternd, wobei sie sich in Expression und Wirkung teilweise gegenseitig beeinflussen. Insbesondere von Stickstoffmonoxid ist bekannt, daß seine Konzentration Auswirkungen auf die Bildung und Freisetzung anderer endothelial gebildeter Mediatoren hat.

Wie bereits in Kapitel 1.3 dargestellt, wird auch PTHrP von koronaren und endokardialen Endothelzellen sowie von vaskulären Glattmuskelzellen exprimiert. Dies legt in Verbindung mit seinen vasodilatierenden und positiv inotropen Effekten die Vermutung nahe, daß PTHrP von diesen Zellen freigesetzt wird und neben anderen endothelial gebildeten Mediatoren über auto- und parakrine Mechanismen an der Regulation von Koronarfluß und Herzfunktion beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde den Fragen nachgegangen

1. welche Stimuli die Freisetzung von PTHrP aus koronaren Endothelzellen bedingen,
2. ob eine Abhängigkeit der PTHrP-Freisetzung von der Konzentration an Stickstoffmonoxid vorliegt und
3. welche Bedeutung dem endogen freigesetzten PTHrP in der Regulation von Koronardurchblutung und Herzfunktion zukommt.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
APS	Serva, Heidelberg
BAPTA	Calbiochem, Bad Soden
BCIP	AppliChem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Carbogen [®]	Messer Griesheim, Krefeld
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brillant Blue G-250	Merck, Darmstadt
Deoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Deoxyglukose	Sigma, Taufkirchen
Dextran	Sigma, Taufkirchen
DMEM/HAM'S F-12	PAA Laboratories, Cölbe
DTE	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim

KCN	Sigma, Taufkirchen
L-NA	Sigma, Taufkirchen
L-Arginin	Sigma, Taufkirchen
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel-de Haën, Seelze
Molekulargewichtsmarker	Amersham, Freiburg
NADH+H ⁺	Roche, Mannheim
Naphthylethylenediamine	Sigma, Taufkirchen
NBT	Sigma, Taufkirchen
NCS	Gibco BRL, Eggenstein
Nonidet P-40	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Phenylephrin	Calbiochem, Darmstadt
Protein-A-Sepharose CL-4B	Sigma, Taufkirchen
PTH7-34	Bachem, Heidelberg
PTHrP1-34	Calbiochem, Darmstadt
Pyruvat	Roche, Mannheim
SDS	Serva, Heidelberg
Spermine-NONOate	Alexis Corp., Grünberg
Sulfanilamid	Sigma, Taufkirchen
TCA	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haën (Seelze), Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Calbiochem (Bad Soden) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Antikörper

PTHrP	oncogene, Boston, MA, USA
anti Mouse IgG	Sigma, Taufkirchen

2.3 Geräte und Laborbedarf

2.3.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Anlage	Eigenbau: Werkstatt Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität, Gießen
Gewebehacker	Harvard Apparatus
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Primaria-Zellkulturschalen	Typ: Falcon 3803 Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen (1. Passage)	Typ: Falcon 3001 Becton Dickinson, Heidelberg
Bioflex [®] -Kulturschalen	Typ: Collagen I Flexcell Int. Corp., Hillsborough, NC, USA
Mikroskop	Typ: TMS-F Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld

2.3.2 Gelelektrophorese

Netzgeräte	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Amersham, Freiburg
Blotkammer	Biometra, Göttingen
PVDF-Blotmembran	Millipore, Bedford, MA, USA
Filterpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen

2.3.3 Sonstige Geräte

Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Bedford, MA, USA
Sterilbank	Typ: Lamin Air® HBB 2472 Heraeus, Hanau
Brutschrank	Typ: Cytoperm Heraeus, Hanau
Zelldehnungsapparat	Typ: FX-4000 Flexcell Int. Corp., McKeesport, PA, USA
Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Schüttler	Typ: WT 12 Biometra, Göttingen
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf

2.3.4 Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (Porenweite 0,2µm)	Sartorius, Göttingen
Zellschaber	Typ Falcon 3087 Becton Dickinson, Heidelberg

2.4 Auswertung

Flachbettscanner

Typ: Scan jet 4c

Hewlett Packard, Eschborn

Software

Image Quant[®]; Molecular Dynamics, Krefeld

Microsoft Excel

3 Methoden

3.1 Experimente in vitro

3.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um adulte männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 300-400 g. Sie stammten aus der hauseigenen Zucht des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität, Gießen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Standardfutter: Altromin[®]) und Wasser.

3.1.2 Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen

3.1.2.1 Präparation und Kultivierung mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen

Die Präparation der mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte nach PIPER et al. (1990). Hierfür wurde die verwendete Perfusionsanlage nach Langendorff vor Beginn der Präparation mit aqua bidest. gespült und luftblasenfrei mit Powell-Medium gefüllt. Während der gesamten Isolation wurde die Temperatur der Perfusionslösung über einen Heizkreislauf konstant bei 37°C gehalten und eine Begasung mit Carbogen[®] durchgeführt.

Powell-Medium

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
Glukose	2,0 g/l

Nach kurzer Narkose mit Diethylether wurde der Thorax der Ratten eröffnet und das Herz im Zusammenhang mit der Lunge herauspräpariert. Die Organe wurden in eiskalte physiologische Kochsalzlösung verbracht, die Lungen und das anhängende Fettgewebe sowie Ösophagus und Trachea entfernt und das Herz mit der freipräparierten Aorta an die Kanüle der Perfusionsanlage angehängt. Die Herzen wurden mit etwa 40 ml Powell-Medium blutfrei gespült und im Anschluß daran mit 50 ml Collagenasepuffer über 25 min rezirkulierend perfundiert. Die Flußrate betrug 5 ml/min/Herz.

Collagenasepuffer

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

Nach Abtrennung der Vorhöfe und der Aorta wurden die Herzen mittels eines Gewebhackers zerkleinert. Es folgte ein Nachverdau in 30 ml mit Carbogen[®] begastem Collagenasepuffer über einen Zeitraum von zehn Minuten bei 37°C, wobei alle ein bis zwei Minuten durch Auf- und Abpipettieren eine Durchmischung vorgenommen wurde, um die Separierung der einzelnen Zellen zu unterstützen.

Nach anschließender Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 200 µm wurden durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 400 U/min Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Collagenase-Lösung von den intakten Zellen abgetrennt.

Der Überstand wurde mit 10 mg Trypsin und 30 µl einer 100 mM CaCl₂-Lösung versetzt, unter Begasung mit Carbogen[®] bei langsamer Geschwindigkeit für 30 min bei 37°C mittels eines elektrischen Rührers durchmischt und in 60 ml M199/CO₂ aufgenommen.

<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
Carbogen [®]	mind. 2 h begast
aqua bidest.	ad 1 l

Das durch eine anschließende Zentrifugation über zehn Minuten bei 1000 U/min gewonnene Pellet wurde in etwa 10 ml des auf 37°C vorgewärmten Endothelzellmediums resuspendiert.

Endothelzellmedium

M199/CO ₂	x ml
mixed serum (NCS/FCS 1+1)	20 % (v/v)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 IU/ml

Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf einer bereits 20 ml Medium enthaltenden Falcon Primariaschale[®] verteilt.

Die Reinheit dieser Kulturen lag bei >95% Endothelzellen (NOLL et al. 1995), d.h. nach Anfärbung durch mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-Perchlorat markiertem, acetyliertem low-density-Lipoprotein (Dil-ac-LDL) zeigten weniger als 5% der Zellen keine Fluoreszenz. Bei dieser für vaskuläre Endothelzellen selektiven Färbung werden die Lipoproteine durch lysosomale Enzyme gespalten und das Dil akkumuliert in den intrazellulären Membranen, was als Fluoreszenz sichtbar wird.

3.1.2.2 Passage der mikrovaskulären Endothelzellen

Nach zweimaligem Waschen mit EDTA-Puffer erfolgte eine Inkubation mit Trypsin unter CO₂-freien Bedingungen bei 37°C bis zur Auflösung des Zellverbandes. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von Endothelzellmedium gestoppt, die Zellzahl in einer Zählkammer ermittelt und die damit errechnete Menge Zellsuspension auf die einzelnen, bereits Medium enthaltenden Kulturschalen verteilt. Das Ausplattieren erfolgte mit einer Zellzahl von 200.000 Zellen pro Schale, die Zellen wurden bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens verwendet.

<u>EDTA-Puffer</u>	pH 7,4 (sterilfiltriert)
NaCl	125,0 mM
KCl	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

3.1.3 Kultivierung vaskulärer Glattmuskelzellen aus der Rattenaorta

3.1.3.1 Präparation und Kultivierung vaskulärer Glattmuskelzellen aus der Rattenaorta

Die Isolation der vaskulären Glattmuskelzellen (VSMC) erfolgte nach OWENS et al. (1986). Hierfür wurden die den Tieren entnommenen Aortenstücke von anhängendem Gewebe freipräpariert, das Gefäß längs aufgeschnitten und die Endothelzellschicht mechanisch entfernt. Die Media wurde mit einem Skapell längs und quer eingeritzt, so daß rechteckige Abschnitte entstanden, welche anschließend von der Adventitia abgezogen und kleingeschnitten wurden. Die so entstandenen Explantate wurden für drei Stunden mediumfrei im Brutschrank bei 37°C bis zur Antrocknung an den Boden der Schale aufbewahrt und danach mit VSMC-Medium überschichtet. Der Mediumwechsel erfolgte bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens 1-2mal pro Woche.

<u>VSMC-Medium</u>	pH 7,4 (sterilfiltriert)
DMEM/HAM'S F-12	x ml
FCS	10 % (v/v)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 IU/ml
HEPES	25 mM

3.1.3.2 Passage der vaskulären Glattmuskelzellen

Die Passage der vaskulären Glattmuskelzellen erfolgte wie für mikrovaskuläre Endothelzellen unter 3.1.2.2 beschrieben.

3.1.4 PTHrP-Freisetzung in vitro

3.1.4.1 Freisetzung durch Zelldehnung

Zur Dehnung der Zellen wurde ein Flexercell-Gerät (Typ FX-4000, Flexcell Int. Corp.) eingesetzt, welches durch Anlegen eines computergesteuerten, definierten Vakuums eine Dehnung des Bodens der Kulturschale und somit der angehefteten Zellen ermöglichte (Abb. 3.1). Der Boden der verwendeten Bioflex-Sixwells[®] bestand aus einem elastischen Material, welches auf der den Zellen zugewandten Seite zur besseren Anheftung mit Collagen beschichtet war.

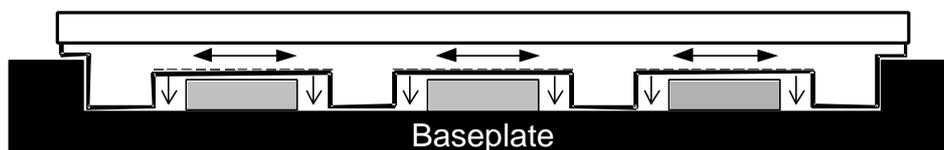


Abb. 3.1: Zelldehnung

Das Anlegen eines Vakuums an die Basisplatte des Flexercell-Gerätes bewirkte einen Zug der elastischen Böden der Bioflex[®]-Sixwells über die Stempel und somit eine Dehnung der Zellen. Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die Basisplatte mit eingesetzter Sixwell-Kulturschale, die Pfeile deuten die Richtung der vakuumbedingten Dehnung der Schalenböden bzw. der Zellen an.

Die Zellen wurden in erster Passage in einer Dichte von 350.000 Zellen pro Well ausplattiert (s. 3.1.2 bzw. 3.1.3) und zwei Tage später in subkonfluentem Zustand verwendet, um durch die in diesem Stadium besseren Anheftung einer dehnungsbedingten Ablösung der Zellen vom Schalenboden vorzubeugen. Die vaskulären Glattmuskelzellen wurden ca. zwölf Stunden vor Versuchsbeginn

serumfrei gesetzt, die koronaren Endothelzellen unmittelbar zuvor mit angewärmtem PBS gewaschen und anschließend das Medium durch serumfreies M199/CO₂ ersetzt. Als Versuchsprotokoll wurde eine einstündige zyklische Dehnung mit der Frequenz von 1 Hz von 5%, 10% und 20% gewählt, die Kontrollschalen blieben ungedehnt.

In einer weiteren Versuchsreihe mit mikrovaskulären Endothelzellen wurde ein Protokoll mit zehnpromzentiger zyklischer Dehnung mit einer Frequenz von 1 Hz über den Zeitraum von einer Stunde verwendet, wobei 30 min vor Versuchsbeginn eine Präinkubation mit BAPTA erfolgte.

Nach Beendigung des jeweiligen Versuchs wurde der Überstand abgenommen, die Proteine wie unter 3.6.1 beschrieben gefällt und die Zellen geerntet (s. 3.6.2). Die Proteine wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Westernblot auf eine Membran transferiert und diese mit monoklonalem PTHrP-Antikörper entwickelt (s. 3.6.5). Die Auswertung der Banden erfolgte densitometrisch.

3.1.4.2 Freisetzung unter Energieverarmung

Die mikrovaskulären Endothelzellen wurden in erster Passage verwendet und ein Teil der Schalen 30 min vor Versuchsbeginn mit BAPTA (10 µM) vorinkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde das Medium durch Kaliumcyanid/Deoxyglukose (5 mM/5 mM) ersetzt, die Kontrollschalen erhielten serumfreies Medium. Nach 40 min Inkubation bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung wurde der Überstand abgenommen und eine Proteinfällung durchgeführt (s. 3.6.1). Die Zellernte erfolgte wie unter 3.6.2 beschrieben. Die Proteine wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, mittels Westernblot auf eine Membran transferiert und diese mit monoklonalem PTHrP-Antikörper entwickelt (s. 3.6.5). Die Auswertung der Banden erfolgte densitometrisch.

<u>PBS</u>	pH 7,3
NaCl	15,0 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mM
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,6 mM

3.2 Versuche am isoliert perfundierten Rattenherzen

Für die Experimente am isoliert perfundierten Rattenherzen wurde eine Perfusionsanlage nach Langendorff verwendet. Hierbei wurde die mit Carbogen® begaste Perfusionslösung aus einem oberhalb des Herzens befindlichen Pufferreservoir dem Organ zugeleitet. Die Zuleitung wurde genauso wie das Pufferreservoir durch einen Heizkreislauf auf 37°C temperiert. Ein zwischengeschalteter Zweiwegehahn ermöglichte eine Unterbrechung der Flüssigkeitszufuhr. Das Herz befand sich in einer ebenfalls beheizten geschlossenen Kammer. Die Präparation des Herzens erfolgte wie unter 3.1.2 beschrieben.

Das Anhängen des Herzens mit der Aorta ascendens an die Kanüle der Anlage bedingte eine retrograde Perfusion des Organs unter weitgehender Umgehung der Vorhöfe und der Ventrikel, da der Schluß der Aortenklappen eine Umleitung des Flüssigkeitsstroms durch die Koronargefäße bewirkte. Der Abfluß des Perfusats erfolgte aus dem Sinus coronarius.

<u>Perfusionslösung</u>	pH 7,4
NaCl	120 mM
NaHCO ₃	24 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	0,4 mM
MgCl ₂ × 6H ₂ O	1,0 mM
CaCl ₂ × 2H ₂ O	1,8 mM
Glukose	5,0 mM

3.2.1 Versuche zur PTHrP-Freisetzung

Die PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen wurde unter flußkonstanten Bedingungen untersucht. Der Fluß wurde mittels einer zwischen Pufferreservoir und Herzen geschalteten Rollenpumpe reguliert. Als Basalfluß wurde eine Rate von 5 ml/min gewählt. Um durch die Herzaktion bedingte Schwankungen des Koronarflusses auszuschließen, wurden die Herzen durch Verwendung der zehnfachen Kaliumkonzentration (27 mM) in der Perfusionslösung stillgestellt. Das

Auffangen des Effluates erfolgte minütlich. Mit jeweils einem Milliliter wurde eine Proteinfällung durchgeführt, die Proteine mittels Dot Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (s. 3.6.4.2) und diese mit monoklonalem PTHrP-Antikörper entwickelt (s. 3.6.5). Die Auswertung der Banden erfolgte densitometrisch, die Quantifizierung der Freisetzung mit Hilfe eines Standards.

Um die Flußabhängigkeit der PTHrP-Freisetzung zu untersuchen, wurde in einem Teil der Experimente die basale Flußrate von 5 ml/min auf 1,25 ml/min und 2,5 ml/min reduziert bzw. auf 10 ml/min erhöht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Endothel der Koronargefäße vorsichtig denudiert, indem über fünf Sekunden mit einer Lösung perfundiert wurde, welche 0,5% (v/v) Triton X-100 enthielt.

Ein Anstieg der Wandschubspannung wurde erreicht über die Erhöhung der Viskosität des Perfusionspuffers durch Zugabe von 10% (w/v) Dextran (Molekulargewicht 70 kD). Die Viskosität der Lösung stieg hierdurch von 0,0072 P auf 0,0355 P bei 37°C (RUBIO et al. 1995).

Bei den Experimenten zur Überprüfung einer Stickstoffmonoxid-abhängigen Freisetzung wurde nach einer Vorlaufphase von zehn Minuten der Perfusionslösung Arginin (100 µM), L-Nitro-Arginin (100 µM) oder Spermine-NONOate (100 nM) zugesetzt.

Zur Untersuchung einer möglichen Ischämie-bedingten Freisetzung wurde nach einem Vorlauf von 15 min bei einer Flußrate von 5 ml/min eine No-flow-Ischämie durchgeführt, indem die Flüssigkeitszufuhr unterbrochen wurde. Nach Ablauf von 30 min erfolgte die Reperfusion bei gleicher Flußrate.

3.2.2 Versuche zur Bestimmung des Koronarflusses

Die Messung des Koronarflusses erfolgte am isoliert perfundierten Rattenherzen unter druckkonstanten Bedingungen (50 mmHg). Das Herz wurde durch Anlegen einer Elektrode auf eine Schlagfrequenz von 3 Hz eingestellt. Das Effluat wurde jede Minute über jeweils zehn Sekunden aufgefangen und die Menge durch Wägen bestimmt.

Nach einer Stabilisationsphase von zehn Minuten wurden die Koronargefäße durch Zugabe des α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (1 µM) vorkonstringiert. An-

schließlich erfolgte je nach Protokoll eine zusätzliche Gabe von PTHrP1-34 (100 nM), authentischem PTHrP (100 nM) oder PTH7-34 (100 nM).

Bei den druckkonstant durchgeführten Experimenten mit dem NO-Donor Spermine-NONOate (100 nM) wurde keine Vorkonstriktion vorgenommen.

3.2.3 Erfassung funktioneller Parameter

Die Messung des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) und der Frequenz wurde unter druckkonstanten Bedingungen (50 mmHg) durchgeführt. Die Erfassung des systolischen bzw. diastolischen Druckes und der Frequenz erfolgte über einen im linken Ventrikel positionierten Ballon, dessen Volumen durch Auffüllen mit aqua bidest. so reguliert wurde, daß in der Herzkammer ein basaler Druck von 10-12 mmHg herrschte. Die so erhaltenen Impulse wurden über einen externen Aufnehmer und einen Analog-Digital-Wandler auf einen PC übertragen. Der LVDP errechnete sich aus der Differenz des diastolischen und des systolischen Druckes.

Um einen möglichen Einfluß des ischämisch freigesetzten PTHrP auf die Funktionserholung des Herzens zu untersuchen, wurde nach einer Vorlaufphase von 20 min direkt vor Beginn der dreißigminütigen No-flow-Ischämie PTHrP1-34 (100 nM) bzw. PTH7-34 (100 nM) eingewaschen. Die gleichen Konzentrationen fanden auch während der Reperfusion Verwendung.

3.3 Experimente in vivo

3.3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Göttinger Minischweine mit einem Körpergewicht von 20-40 kg.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden mit 1 g Ketamin Hydrochloride i.m. sediert und mit Thiopental (Trapanal[®], 500 mg i.v.) anästhesiert. Die Narkose wurde durch Inhalation eines O₂/NO₂-Gemisches (40%:60%) mit 1,0-1,5% Isofluran aufrechterhalten. Die Intubation erfolgte durch einen median angelegten Trachealschnitt. Nach Thorakotomie im vierten Interkostalraum und Eröffnung des Perikards wurde ein extrakorporaler Kreislauf angelegt, indem die Arteria coronaria sinister auf einer Länge von 1,5 cm freipräpariert und ligiert wurde. Dem der Ligatur distal gelegenen Abschnitt wurde über eine zwischengeschaltete Rollenpumpe direkt Blut aus einer ebenfalls kanulierten Arteria carotis communis zugeführt. Um einer Hypoperfusion vorzubeugen, wurde die Pumpe so eingestellt, daß ein koronararterieller Druck von 70 mmHg unter Kontrollbedingungen nicht unterschritten wurde. Die Kanulierung der Vena cordis magna ermöglichte über ein nicht druckreguliertes Reservoir und eine zweite Rollenpumpe die Rückführung des Blutes in eine Vena jugularis interna. Über die andere Vena jugularis interna wurde eine Volumenauffüllung durch körperwarme, physiologische Kochsalzlösung vorgenommen.

Zur Antikoagulation erfolgte vor der Kanulierung der Koronargefäße eine Gabe von 20.000 IU Na-Heparin. Stündlich wurden weitere Dosen von jeweils 10.000 IU gegeben.

Der systemische arterielle Blutdruck wurde über einen in der zweiten Arteria carotis communis positionierten Polyethylenkatheter gemessen, der koronararterielle Blutdruck über den Seitenarm eines T-Konnektors, der mit einem externen Aufnehmer verbunden war.

Die Herzfrequenz wurde während des Versuches über den linken Vorhof mittels eines Schrittmachers kontrolliert (Type 215/T, Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland). Nach einer Stabilisationsphase von mindestens dreißig Minuten wurde mit den Kontrollmessungen begonnen.

Die PTHrP-Freisetzung wurde unter Kontrollbedingungen und fünf Minuten nach Flußreduktion ermittelt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde bei konstantem Perfusionsdruck 1 µg Bradykinin über den extrakorporalen Kreislauf gegeben.

Um die arterielle PTHrP-Plasmakonzentration zu untersuchen, wurden Blutproben aus dem linken Ventrikel genommen. Proben aus der Vena cordis magna dienten der

Ermittlung der venösen PTHrP-Plasmakonzentration. Die PTHrP-Freisetzung ergab sich aus der Differenz der arteriellen und venösen Plasmakonzentrationen.

3.4 ASD-Studie

3.4.1 Patienten

Im Zeitraum zwischen dem 06.03.2001 und dem 13.12.2001 wurden zwanzig Patienten, davon vier Jungen und sechzehn Mädchen, in die Studie aufgenommen. Die Eltern der untersuchten Kinder wurden vor Aufnahme über die Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung.

Der Altersdurchschnitt der Patienten lag bei 7,14 Jahren (3,42 bis 20,5 Jahre). Bei allen Kindern lag ein Atrialer Septumdefekt (ASD) von unterschiedlicher Ausprägung vor.

3.4.2 Durchführung

Der Verschluss des Septumdefektes erfolgte interventionell, d.h. der Defekt wurde ohne Eröffnung des Herzens mittels einer über einen Katheter eingeführten Doppelschirm-Prothese verschlossen.

Die hämodynamischen Parameter wurden über Druckabnehmer erfasst, welche über die Leiste venös bzw. arteriell eingeführt und intravasal bis in das rechte bzw. linke Herz und die Pulmonalarterie vorgeschoben wurden.

Die Probenentnahme erfolgte jeweils vor und nach Verschluss des Defektes aus der Arteria pulmonalis, der Vena cava superior sowie der Arteria femoralis und präoperativ aus dem linken Vorhof.

Nach Aufbereitung der Plasmaproben durch Proteinfällung wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot durchgeführt (s. 3.6) und zwar pro Patient in jeweils drei Ansätzen. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung wurden gemittelt. Es ergab sich eine Intra-Assay-Variabilität von 16,2%.

3.5 Immunpräzipitation von PTHrP aus Plasmaproben

Die Immunpräzipitation ermöglicht durch Bindung an den spezifischen Antikörper die Aufreinigung eines bestimmten Proteins, selbst wenn dieses im jeweiligen Probenmaterial in nur geringen Mengen vorhanden ist.

Zur Durchführung wurden 50 µl Plasma im Verhältnis 1:2 mit zehnfach konzentriertem Immunpräzipitations(IP)-Puffer versetzt.

<u>IP-Puffer (10x)</u>	pH 7,6
Tris/HCl	20 mM
NaCl	240 mM
EDTA	5 mM
Triton X-100	1 % (v/v)

Die Zugabe von 10 µl PTHrP-Antikörper führte bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min zur Entstehung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Das Vermischen der Probe mit 7-8 mg Protein-A-Sepharose CL-4B, welche 30 min bei 4°C in 400 µl IP-Puffer vorgequollen war, bewirkte eine Bindung des Fc-Fragments des Antikörpers an das kovalent mit der Sepharose gebundene Protein A. Durch die so entstandene Kopplung des Antigens an die Trägermatrix ließ sich das detektierte PTHrP nach drei Stunden Aufbewahrung bei 4°C bei 5000 U/min über drei Minuten abzentrifugieren.

Zur Entfernung von nicht- bzw. unspezifisch gebundenen Proteinen wurde das entstandene Pellet drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschvorgängen erfolgte ebenfalls mit 5000 U/min über drei Minuten.

<u>Waschpuffer</u>	pH 7,0
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	50 mM
Nonidet P-40	0,1 % (v/v)

Die Aufnahme des Pellets in 200 µl Ablösepuffer bewirkte eine Ablösung von der Trägermatrix und Auflösung des Antigen-Antikörper-Komplexes.

<u>Ablösepuffer</u>	pH 6,7
Tris/HCl	50 mM
SDS	2 % (w/v)
DTE	45 mM

Nach Erhitzung der Probe bei 95°C über die Dauer von fünf Minuten und zehnmütiger Zentrifugation bei 8500 U/min wurde der das Protein enthaltende Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen an 80%igem Ethanol eine Proteinfällung durchgeführt. Die Probe wurde abschließend fünf Minuten mit 13000 U/min zentrifugiert und das Pellet in aqua bidest. resuspendiert.

Die Konzentration des immunpräzipitierten Proteins wurde mittels Photometrie bestimmt (s. 3.6.5).

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Proteinfällung

Nach Zugabe von 10% (v/v) 5 mM Deoxycholat und zwanzigminütiger Aufbewahrung bei 4°C erfolgte die Proteinfällung durch Zusatz von 10% (v/v) 100%iger (w/v) TCA. Nach weiteren 30 min bei 4°C wurden die Proben bei 13000 U/min fünf Minuten zentrifugiert, das so entstandene Pellet in 35 µl Lämmli-Puffer mit einem Tropfen Tris/HCl (pH 9,5) resuspendiert und die Probe fünf Minuten bei 95°C erhitzt.

Plasma wurde vor Durchführung der Proteinfällung im Verhältnis 1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

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

3.6.2 Zellernte

Nach Versuchsende wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und zur Auflösung der Zellmembran für 15 min auf einem Schüttler mit 100 µl Lysispuffer inkubiert. Natrium-ortho-Vanadat bewirkte eine Hemmung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

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

Der Verdau von Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 10 µl Benzonase (50 IU/ml) für weitere zehn Minuten. Im Anschluß daran wurden die Zellen mittels eines Zellschabers geerntet, die Suspension mit 50 µl Lämmli-Puffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C erhitzt.

3.6.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde als diskontinuierliche Zonenelektrophorese in Form einer SDS-PAGE bei 40 mV durchgeführt. Verwendung fanden 12,5%ige Polyacrylamidgele in einer Dicke von 1,5 mm. Der Polyacrylamidgehalt des Sammelgels lag bei 5%. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid betrug 30:1.

Die Beladung des Gels erfolgte bei aus Effluat, Plasma oder Überstand gewonnenen Proben mit jeweils 35 µl. Bei Proben, denen eine Zellernte zugrunde lag, wurden jeweils 60 µg Protein eingesetzt. Zur Orientierung lief ein Molekulargewichtsmarker mit einem Spektrum zwischen 250 kD und 10 kD mit.

3.6.4 Blotverfahren

3.6.4.1 Westernblot

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im ‚semi-dry-blotting-Verfahren‘ elektrophoretisch nach Kyhse-Andersen (1984) auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurden zwischen Anode und Kathode der Blotkammer auf jeweils vier mit konzentriertem bzw. nicht konzentriertem Anodenpuffer getränkten Filterpapiere die zuvor mit 70%igem Methanol befeuchtete Blotmembran und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Den Abschluß bildeten vier mit Kathodenpuffer durchfeuchtete Filterpapiere. Der Proteintransfer wurde bei ca. 0,8 mA/cm² über zwei Stunden durchgeführt.

<u>konzentrierter Anodenpuffer</u>	pH 10,4
Tris/HCl	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

<u>Anodenpuffer</u>	pH 10,4
Tris/HCl	30 mM
Methanol	20 % (v/v)

<u>Kathodenpuffer</u>	pH 9,4
Tris/HCl	25 mM
6-Aminohexansäure	40 mM
Methanol	20 % (v/v)

3.6.4.2 Dot Blot

Beim Dot Blot wurden die Proben direkt mittels einer Pipette auf die PVDF-Membran aufgebracht, die zuvor mit 70%igem Methanol befeuchtet wurde. Verwendung fand hierfür eine MINIFOLD-Kammer (Schleicher & Schuell, Inc), bei welcher durch das Anlegen eines Vakuums der Proteintransfer auf die Membran sichergestellt wird.

3.6.5 Immunologischer Nachweis von PTHrP

Nach erfolgtem Proteintransfer (3.6.4) konnte PTHrP mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Hierzu wurde die Membran nach zweistündiger Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 2% (w/v) BSA in TBS zweimal je fünf Minuten mit TBS gewaschen.

<u>TBS</u>	pH 7,4
Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM

Der zweistündigen Inkubation mit dem ersten Antikörper folgten drei je zehnminütige Waschschrirte mit 0,2% (v/v) Triton in TBS mit anschließender Zweitantikörper-Inkubation über ebenfalls zwei Stunden.

Verwendet wurde als Erstantikörper ein monoklonaler, in der Maus hergestellter Antikörper gegen mittregionale Abschnitte von PTHrP (Aminosäuren 38 bis 64), welcher keine Kreuzreaktivität mit PTH aufwies. Beim zweiten Antikörper handelte es sich um anti Maus IgG, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Die jeweiligen Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 mit Antikörperlösung verdünnt eingesetzt.

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

Nach zweimaligem Waschen für jeweils fünf Minuten mit 0,5% (v/v) Triton in TBS wurden die von dem ersten Antikörper detektierten Proteine durch Zugabe der Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Die mit dem Zweitantikörper konjugierte alkalische Phosphatase (AP) katalysierte hierbei eine Dephosphorylierung des BCIP bei gleichzeitiger Reduktion des NBT, wodurch ein blau-violettes Präzipitat entstand. Der Vorgang wurde bei Erreichen der gewünschten Farbstärke durch H₂O abgestoppt. Anschließend wurde die Membran getrocknet.

Entwicklerlösung

AP-Puffer	40,0 ml
BCIP	5,2 mg
NBT	13,2 mg

<u>AP-Puffer</u>	pH 9,5
Tris/HCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	10 mM

3.6.6 Bestimmung des Proteingehaltes

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte nach BRADFORD et al. (1976) mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Bindung des Farbstoffes an die Proteine bewirkte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm. Hierzu wurden 10 µl der das immunpräzipitierte Protein enthaltenden Probe (s. 3.5) in einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach kurzer Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes diente als Standard BSA gelöst in 1N NaOH/0,01% (w/v) SDS in den Konzentrationen 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 % (w/v)
Methanol (96%ig)	5 % (v/v)
ortho-Phosphorsäure (85%ig)	10 % (v/v)
aqua bidest.	ad 1 l

3.6.7 Nitritbestimmung

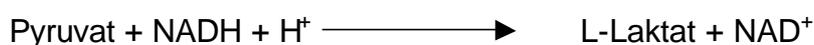
Zur Überprüfung einer stattgefundenen NO-Freisetzung wurde eine indirekte NO-Bestimmung über die Ermittlung der Nitritkonzentration im Effluat durchgeführt. Bei Nitrit handelt es sich um ein stabiles Endprodukt des NO-Metabolismus. Bei Zugabe des Griess-Reagenz zu gleichen Teilen und anschließender Aufbewahrung für eine Stunde bei 4°C kommt es zur Bildung eines stabilen Chromophores mit NO_2^- , dessen Konzentration im Effluat spektrophotometrisch bei 546 nm gemessen wurde.

Griess-Reagenz

Sulfanilamid	0,75 %
Naphthylethylenediamine	0,075 %
in 0,5N HCl	

3.6.8 LDH-Bestimmung

Als Nachweis einer möglicherweise stattgefundenen Zellschädigung wurde die Laktatdehydrogenase-Aktivität im Effluat bestimmt. Die Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die Reaktion zwischen Pyruvat und NADH zu L-Laktat und NAD^+ :



Die anfängliche Oxidationsgeschwindigkeit von NADH ist zu der katalytischen LDH-Aktivität direkt proportional. Sie wird durch die Messung der Extinktionsabnahme bei

340 nm bestimmt. Zur Auslösung der Reaktion wurden 50 µl der jeweiligen Probe in einer Mikrotiter-Platte mit 200 µl der Reaktionslösung versetzt.

Reaktionslösung

Phosphatpuffer	x ml
NADH (7,5 mM)	2 % (v/v)
Pyruvat (50 mM)	1 % (v/v)

Phosphatpuffer pH 7,4

1. KH_2PO_4 50 mM
2. K_2HPO_4 50 mM

Zu 1. wird 2. bis zum Erreichen eines pH von 7,4 zugegeben.

3.7 Statistik

Die quantitativen Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler (SE) aus n unabhängigen Einzelexperimenten angegeben. Bei Experimenten, in welchen mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, wurde eine Varianzanalyse mit anschließendem Student-Neuman-Keul-Test durchgeführt. Wurden zwei Gruppen verglichen, fand der T-TEST Anwendung. $p < 0,05$ wurde als Signifikanzniveau verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Mechanosensitive Freisetzung von PTHrP aus dem Koronarendothel

4.1.1 Freisetzung aus salin perfundierten Rattenherzen

4.1.1.1 Flußabhängige Freisetzung

In einem ersten Experiment wurde die Freisetzungsrates von PTHrP am salin perfundierten Rattenherzen unter Variation der Flußrate bestimmt. Eine Beeinflussung des Perfusionsdrucks durch andere hämodynamische Faktoren, wie Herzfrequenz oder LVP, wurde durch Stillstellen der Herzen mittels erhöhter Kaliumkonzentration vermieden. Der während der Perfusion auf die Koronargefäßwand wirkende Druck war somit einzig eine Funktion der Flußrate.

Bei einem konstanten Fluß von 5 ml/min wurden im Effluat $84,3 \pm 8,3$ ng PTHrP pro Milliliter gemessen. Dies entspricht einer Konzentration von 1,7 nM. Die basale Freisetzungsrates betrug damit 422 ± 42 ng PTHrP pro Minute ($n=8$). Eine Veränderung der Flußrate führte zu einem Anstieg bzw. Abfall der PTHrP-Freisetzung, wie in Abb. 4.1 anhand eines repräsentativen Einzelexperimentes dargestellt ist. Die Zusammenfassung der Versuche in Abb. 4.2 zeigt eine lineare Beziehung zwischen Fluß und Freisetzungsrates. Die Konzentration im Effluat bleibt als Resultat dieser flußabhängigen Adaptation konstant (Abb. 4.3).

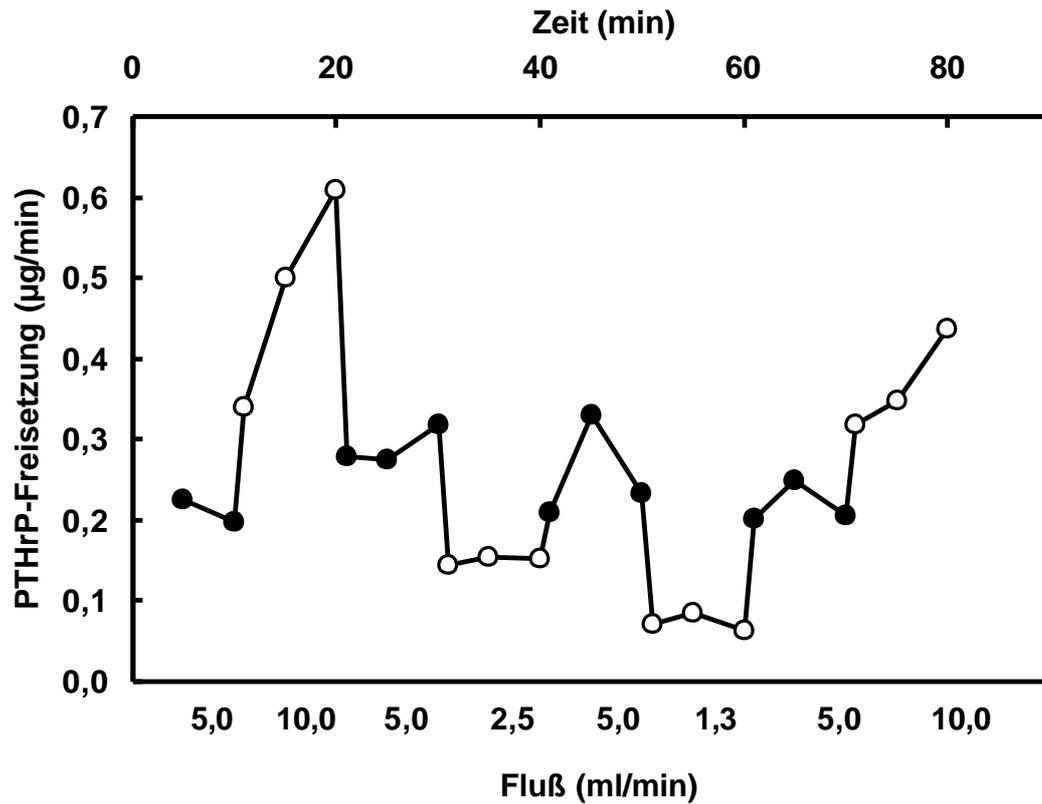


Abb. 4.1: PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten, nicht schlagenden Rattenherzen bei verschiedenen Flußraten

Die Abhängigkeit der PTHrP-Freisetzung von der Flußrate ist in µg/min anhand eines repräsentativen Einzelexperiment dargestellt.

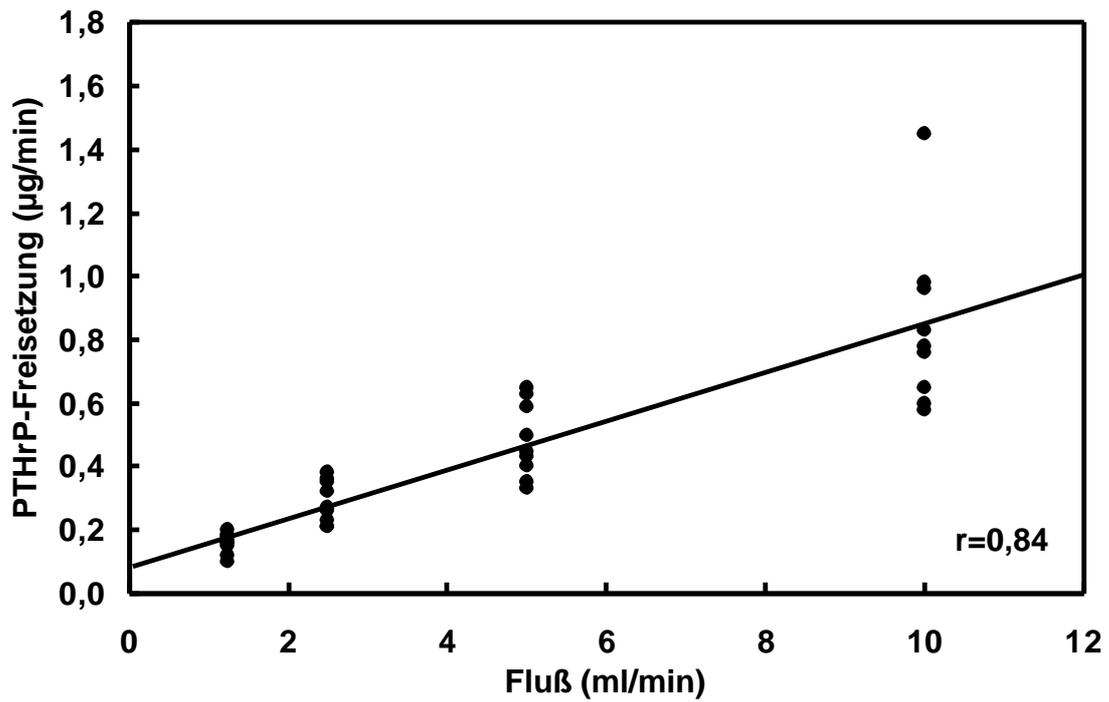


Abb. 4.2: Beziehung zwischen PTHrP-Freisetzung und Flußrate

Jeder Punkt repräsentiert ein Einzelexperiment, bei welchem die PTHrP-Freisetzung bei einer Flußrate von 10, 5, 2½ bzw. 1¼ ml/min gemessen wurde.

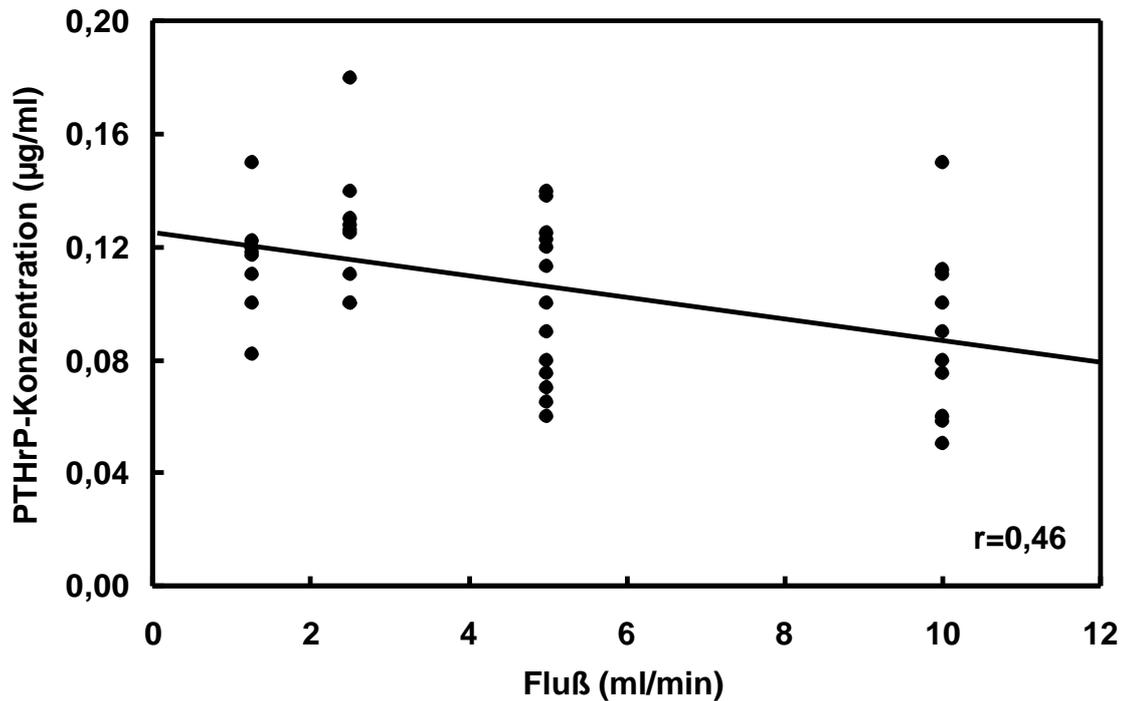


Abb. 4.3: Beziehung zwischen PTHrP-Konzentration im Effluat und Flußrate

Jeder Punkt repräsentiert ein Einzelexperiment, bei welchem die PTHrP-Freisetzung bei einer Flußrate von 10, 5, 2½ bzw. 1¼ ml/min gemessen wurde.

Um auszuschließen, daß die oben gezeigte Freisetzung Resultat eines auf Zellschädigung beruhenden Auswascheffektes ist, wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Effluat bestimmt. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte Aktivität im Effluat nachgewiesen werden.

4.1.1.2 Flußabhängige Freisetzung von PTHrP nach Denudierung des Endothels

Da sowohl mikrovaskuläre Endothelzellen als auch vaskuläre Glattmuskelzellen PTHrP exprimieren und freisetzen, stellte sich die Frage, welcher dieser Zelltypen als Hauptquelle des im Effluat detektierten PTHrP anzusehen ist. Die Denudierung der Endothelzellschicht durch Zugabe von Triton X-100 zur Perfusionslösung führte zu einem Absinken der basalen Freisetzungsrates ($0,187 \pm 0,02$ vs. $0,141 \pm 0,01$ µg/min,

$p < 0,05$). Durch eine Steigerung des Flusses konnte zwar ein signifikanter, aber im Vergleich zu Kontrollbedingungen stark abgeschwächter Anstieg der Freisetzung beobachtet werden ($0,187 \pm 0,02$ vs. $0,346 \pm 0,07$ $\mu\text{g}/\text{min}$ vor bzw. $0,141 \pm 0,01$ vs. $0,239 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{min}$ nach Denudierung) (Abb. 4.4).

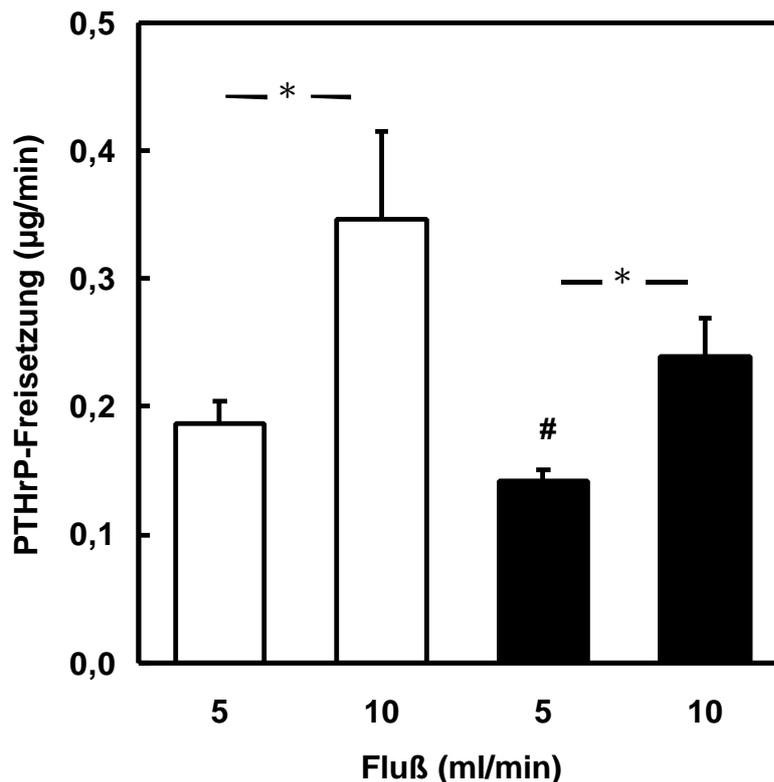


Abb. 4.4: PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten, nicht schlagenden Rattenherzen vor und nach Denudierung der Endothelzellschicht

Die Herzen wurden vor (weiße Balken) und nach (schwarze Balken) Denudierung des Endothels durch fünfsekündige Perfusion mit 0,5% (v/v) TritonX-100 bei Flußraten von 5 bzw. 10 ml/min perfundiert. Die Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ aus $n=4$ Herzen. * $p < 0,05$ zwischen 5 und 10 ml/min Fluß; # $p < 0,05$ vs. Freisetzungsrates bei 5 ml/min vor Denudierung.

4.1.1.3 Freisetzung von PTHrP bei erhöhter Wandschubspannung

Ein möglicher Mechanismus der flußabhängigen Freisetzung ist die Vermittlung über den bei erhöhter Flußrate auftretenden Anstieg der Wandschubspannung. Eine

Steigerung der Viskosität des Perfusionspuffers von 0,0072 P auf 0,0355 P durch Zufügen von Dextran bewirkte eine Erhöhung der Wandschubspannung bei konstantem Fluß. Es zeigte sich kein Einfluß auf die basale PTHrP-Freisetzung (Abb. 4.5).

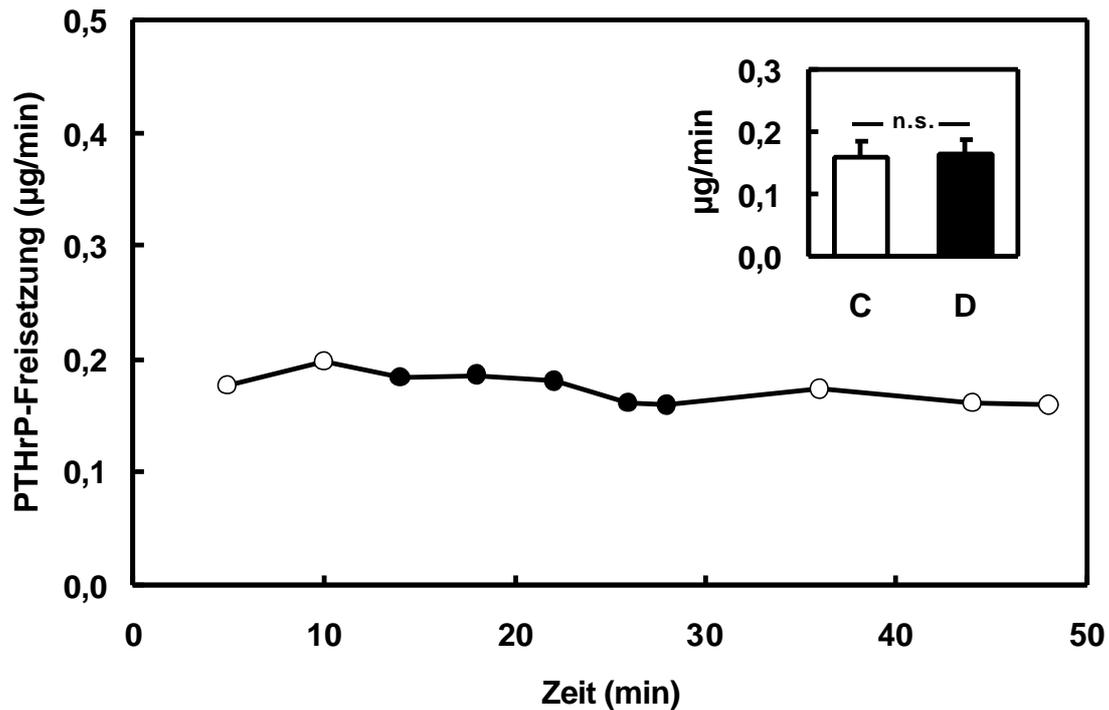


Abb. 4.5: PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten, nicht schlagenden Rattenherzen bei erhöhter Viskosität des Perfusionspuffers

Dargestellt ist die PTHrP-Freisetzung in µg/min anhand eines repräsentativen Einzelexperimentes bei einer Flußrate von 5 ml/min. Dextran (10% (wt/vol)) wurde zehn Minuten nach Versuchsbeginn zugegeben und dreißig Minuten später ausgewaschen (schwarze Punkte). Das Insert zeigt MW±SD unter Kontrollbedingungen (C; weißer Balken) und fünf Minuten nach Zugabe von Dextran (D; schwarzer Balken) von n=4 Versuchen.

Der Anstieg der Nitritkonzentration im Effluat diente als Nachweis einer gesteigerten Wandschubspannung (+23±5% über Basalwert, p<0,05 vs. Kontrolle, n=4). Bei Nitrit handelt es sich um ein Abbauprodukt von Stickstoffmonoxid.

4.1.1.4 Einfluß der NO-Synthase auf die Freisetzung von PTHrP

Bei einem konstanten Fluß von 5 ml/min hatten weder der NO-Donor Arginin noch der NO-Synthase-Inhibitor L-NA einen Effekt auf die Freisetzung von PTHrP. Das Absinken der Nitritkonzentration im Effluat bei Gabe von L-NA bzw. deren Anstieg unter Arginin diente als Nachweis einer Modulation der NO-Freisetzung (Tab. 4.1). Die Probenentnahme erfolgte zehn Minuten nach Gabe von L-NA bzw. Arginin, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Auswirkungen auf den Perfusionsdruck durch eine NO-vermittelte Änderung des Gefäßdurchmessers beobachtet werden konnten (Tab. 4.1).

		Nitrit (nM)	PTHrP-Freisetzung (ng/min)	Perfusionsdruck (mmHg)
Kontrolle	n=8	702±85	224±27	51,7±2,4
Arginin	n=4	941±43*	215±19	49,8±4,0
L-NA	n=4	597±28*	246±45	58,7±12,8

Tab. 4.1: Einfluß von Arginin und L-NA auf die PTHrP-Freisetzung und Nitritproduktion am isoliert perfundierten Rattenherzen

Die Konzentrationen von Nitrit und PTHrP wurden im Effluat isoliert perfundierter, nicht schlagender Rattenherzen zehn Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanz gemessen. Die Proben wurden gewonnen bei einem Fluß von 5 ml/min während der Perfusion mit Standardpuffer und nach Zugabe von Arginin (100 µM) bzw. L-NA (100 µM). Gezeigt werden MW±SD aus n Experimenten; * p<0,05 vs. Kontrolle bei 5 ml/min.

4.1.1.5 Einfluß des Perfusionsdrucks auf die Freisetzung von PTHrP

Um zu differenzieren, ob die gesteigerte PTHrP-Freisetzung eine direkte Folge der Flußerhöhung ist, oder ob der durch den verstärkten Flüssigkeitsstrom bedingte Druckanstieg auf die Gefäßwand den Anstieg der Freisetzungsrates hervorruft, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Fluß bei konstantem Perfusionsdruck erhöht und die Freisetzung von PTHrP untersucht. Diese Bedingungen wurden erreicht durch

eine mittels Zugabe des NO-Donors Spermine-NONOate (100 nM) hervorgerufene Vasodilatation. Es konnte kein signifikanter Anstieg der PTHrP-Freisetzung festgestellt werden (Abb. 4.6, linker Teil). Gleiche Ergebnisse erhielt man bei Zugabe von Arginin (100 μ M), welches durch verstärkte endotheliale NO-Freisetzung den Fluß um 14,6% steigerte. Auch hier blieb die PTHrP-Freisetzung unbeeinflusst (212 ± 33 ng/min vs. 213 ± 20 ng/min, n=4, n.s.).

Unter flußkonstanten Bedingungen dagegen führte eine Verminderung des Perfusionsdruckes durch die Gabe von Spermine-NONOate zu einer signifikanten Abnahme der PTHrP-Freisetzung (Abb. 4.6, rechter Teil).

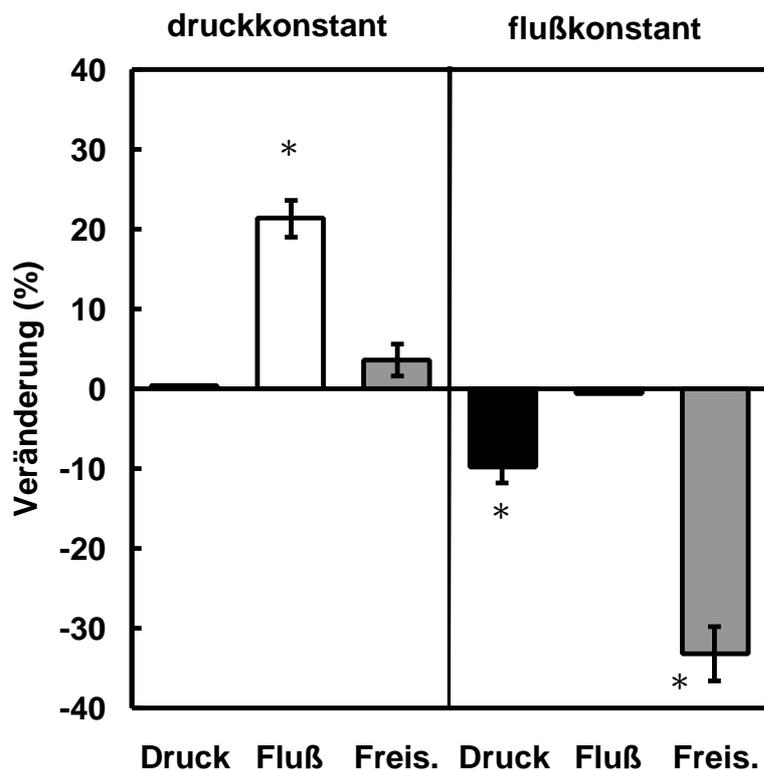


Abb. 4.6: PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen unter druck- bzw. flußkonstanten Bedingungen

Die Herzen wurden bei konstantem Perfusionsdruck (druckkonstant; 55 mmHg) für 10 min perfundiert. Danach wurde der NO-Donor Spermine-NONOate (100 nM) zugegeben. Die Balken zeigen die Veränderungen des Druckes (Druck), des Koronarflusses (Fluß) und der PTHrP-Freisetzung (Freis.) fünf Minuten nach Zugabe des NO-Donors. Die unter Kontrollbedingungen gemessenen 100%-Werte lagen für den Koronarfluß bei $6,39 \pm 0,16$ ml/min und für die Freisetzungsrates von PTHrP bei 124 ± 36 ng/min. Das gleiche Protokoll wurde verwendet bei konstanter Flußrate (flußkonstant; 10 ml/min). Hier lagen die 100%-Werte bei $53,4 \pm 2,9$ mmHg für den koronaren Perfusionsdruck und bei 165 ± 78 ng/min für die PTHrP-Freisetzung. Die Daten sind $MW \pm SD$ aus $n=4$ Experimenten; * $p < 0,05$ vs. Kontrollbedingungen.

4.1.2 Freisetzung durch kultivierte koronare Endothelzellen

4.1.2.1 Abhängigkeit der PTHrP-Freisetzung von der Zelldehnung

Um den Einfluß des Blutdrucks auf koronare Endothelzellen zu imitieren, wurden kultivierte koronare Endothelzellen zyklischer Dehnung unterschiedlichen Ausmaßes ausgesetzt. Die PTHrP-Freisetzung korrelierte direkt mit der Dehnungsstärke (Abb. 4.7).

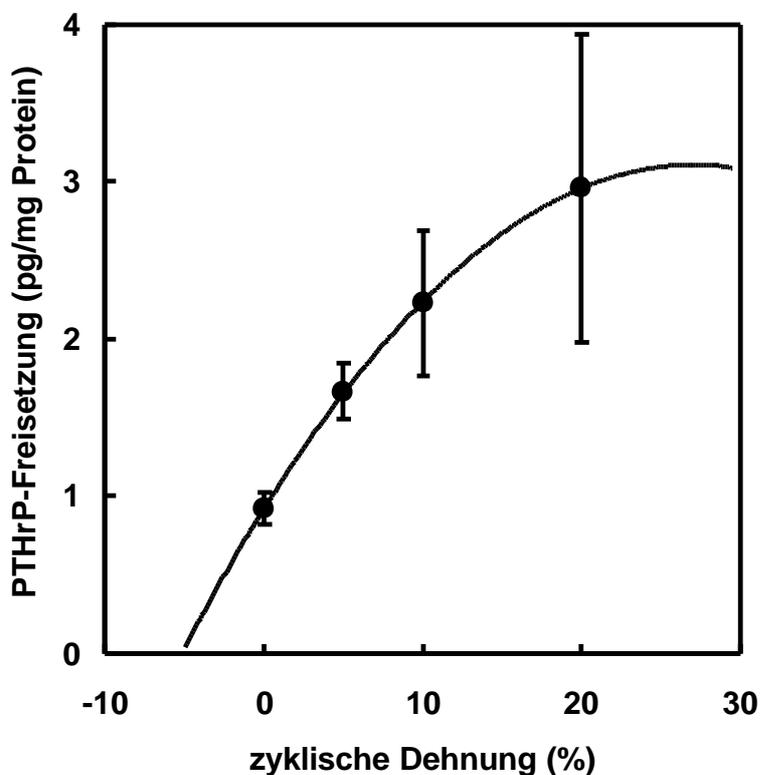


Abb. 4.7: PTHrP-Freisetzung durch kultivierte koronare Endothelzellen in Abhängigkeit des Grades der Zelldehnung

Dargestellt ist die PTHrP-Freisetzung von kultivierten koronaren Endothelzellen der Ratte unter Kontrollbedingungen und bei zyklischer Dehnung von 5, 10 und 20% über eine Stunde bei der Frequenz von 1 Hz. Die PTHrP-Konzentration im Überstand wurde bestimmt und auf den Proteingehalt der Kulturschalen normiert. Die Daten sind $MW \pm SD$ aus $n=6$ Schalen.

4.1.2.2 Einfluß des Kalziumchelators BAPTA auf die dehnungsinduzierte Freisetzung

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einem dehnungsabhängigen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration und der PTHrP-Freisetzung zu untersuchen, erfolgte eine Vorinkubation der koronaren Endothelzellen mit dem Kalziumchelator BAPTA (10 μ M). Die dehnungsabhängige Freisetzung von PTHrP wurde dadurch inhibiert (Abb. 4.8).

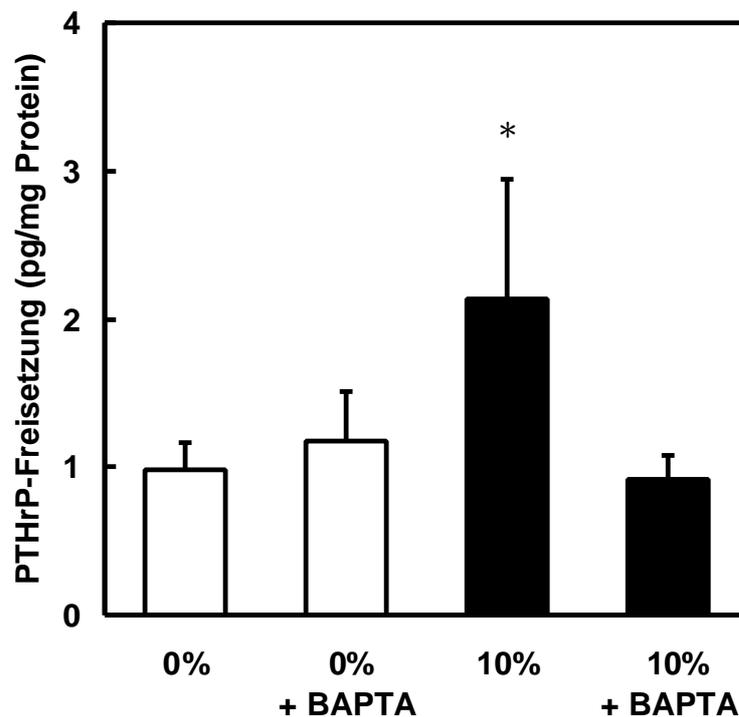


Abb. 4.8: PTHrP-Freisetzung gedehnter Zellen unter Einfluß von BAPTA

PTHrP-Freisetzung von kultivierten koronaren Endothelzellen der Ratte ungedehnt (0%; weiße Balken) und bei 10% zyklischer Dehnung über eine Stunde mit der Frequenz von 1 Hz (10%; schwarze Balken). Die PTHrP-Konzentration im Überstand wurde gemessen und auf den Proteingehalt der Zellen pro Kulturschale normiert. Die Präinkubation mit 10 μ M BAPTA (+ BAPTA) erfolgte 30 min vor Versuchsbeginn. Die Daten sind $MW \pm SD$ aus $n=6$ Kulturschalen; * $p < 0,05$ vs. C.

4.1.2.3 Einfluß von Bradykinin auf die PTHrP-Freisetzung

Weiterhin wurde untersucht, ob ein nicht durch Dehnung induzierter Anstieg der Konzentration des intrazellulären Kalziums den Effekt der Mechanotransduktion nachahmen kann. Diese Bedingungen wurden durch Inkubation mit Bradykinin erreicht. An kultivierten koronaren Endothelzellen verursachte Bradykinin (10 µM) eine Nettofreisetzung von PTHrP von $4,01 \pm 0,83$ pg/g Protein pro Stunde.

4.1.2.4 Vergleich der dehnungsinduzierten PTHrP-Freisetzung aus Endothel- und Glattmuskelzellen

Zur Bestätigung der Aussage aus 4.1.1.2, daß PTHrP in den Koronargefäßen hauptsächlich aus den Endothelzellen freigesetzt wird, wurde zusätzlich der Einfluß zyklischer Dehnung auf die PTHrP-Freisetzung an vaskulären Glattmuskelzellen untersucht. Obwohl sowohl die koronaren Endothelzellen als auch die kultivierten vaskulären Glattmuskelzellen PTHrP exprimierten, ließ sich eine Freisetzung in den Überstand nur bei den Endothelzellen beobachten (Abb. 4.9).

Westernblot

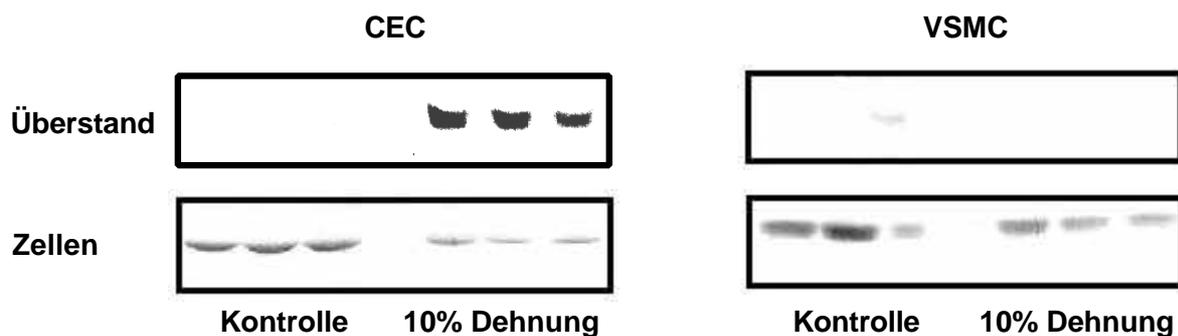


Abb. 4.9: Freisetzung bzw. Expression von PTHrP in koronaren Endothelzellen bzw. vaskulären Glattmuskelzellen bei Dehnung von 10%

Gezeigt wird anhand eines repräsentativen Immunoblots die PTHrP-Expression auf Proteinebene in koronaren Endothelzellen (CEC) bzw. vaskulären Glattmuskelzellen (VSMC) (untere Reihe) und die PTHrP-Freisetzung in den Überstand (obere Reihe). Die Zellen wurden für die Dauer einer Stunde einer zyklischen Dehnung von 10% bei einer Frequenz von 1 Hz ausgesetzt (10% Dehnung) bzw. ungedehnt verwendet (Kontrolle).

4.1.3 Freisetzung von PTHrP aus dem Koronarendothel in vivo

4.1.3.1 Basale Freisetzung aus dem Koronarendothel

In arteriell genommenen Plasmaproben narkotisierter Schweine lag die PTHrP-Konzentration bei $277,9 \pm 54,8$ ng/ml und die Konzentration in der Koronarvene bei $423,9 \pm 56,8$ ng/ml. Dies entspricht Konzentrationen von 5,6 nM bzw. 8,5 nM. Hieraus ergab sich für die PTHrP-Konzentration eine mittlere venös-arterielle Differenz von $146,0 \pm 32,7$ ng/ml (n=15 Schweine), welche auf eine konstante PTHrP-Freisetzung aus dem koronaren Gefäßbett unter in vivo Bedingungen hinweist.

4.1.3.2 Flußabhängige Freisetzung in vivo

Um zu untersuchen, ob sich die am isoliert perfundierten Rattenherzen beobachtete Flußabhängigkeit der PTHrP-Freisetzung auch in vivo bestätigt, wurde während der Versuchsdurchführung die Flußrate bis auf 29% ihres Ausgangswertes reduziert. Der Ausgangswert richtete sich nach dem Erreichen eines mittleren koronar-arteriellen Drucks von 111 ± 4 mmHg. Die Probenentnahme erfolgte 5 min nach Flußreduktion, die gemessenen Hämodynamik-Werte sind in Tab. 4.2 zusammengefaßt.

		basal	5min Ischämie
LVpP	mmHg	91±11	81±8
CAP	mmHg	111±4	32±3*
CBF	ml*min ⁻¹	35±7	6±1*
CR	mmHg/ml*min ⁻¹	3,28±0,78	5,88±1,33
LVdP/dT _{max}	mmHg/sek	1480±388	942±127
LVdP/dT _{min}	mmHg/sek	1348±205	940±126
HR	Schläge/min	96±2	95±5

Tab. 4.2: Hämodynamik-Werte der in vivo-Experimente

LVpP: linksventrikulärer Spitzendruck, CAP: mittlerer koronar-arterieller Druck, CBF: mittlerer koronarer Blutfluß, CR: Koronarwiderstand, LVdP/dT_{max}: maximale Druckantiegsgeschwindigkeit, LVdP/dT_{min}: maximale Druckabfallsgeschwindigkeit, HR: Herzfrequenz. Angegeben sind MW±SD vor (basal) und fünf Minuten nach Flußreduktion (5 min Ischämie) aus n=15 Experimenten; * p<0,05 vs. basal.

Die Freisetzungsrates von PTHrP errechnete sich aus der Konzentrationsdifferenz der koronar-venösen und der arteriellen Plasmaproben und der jeweiligen Flußrate. Bei allen Versuchen führte die Flußminderung zu einem Absinken der PTHrP-Freisetzung, wohingegen die koronarvenöse Plasmakonzentration unverändert blieb (Abb. 4.10).

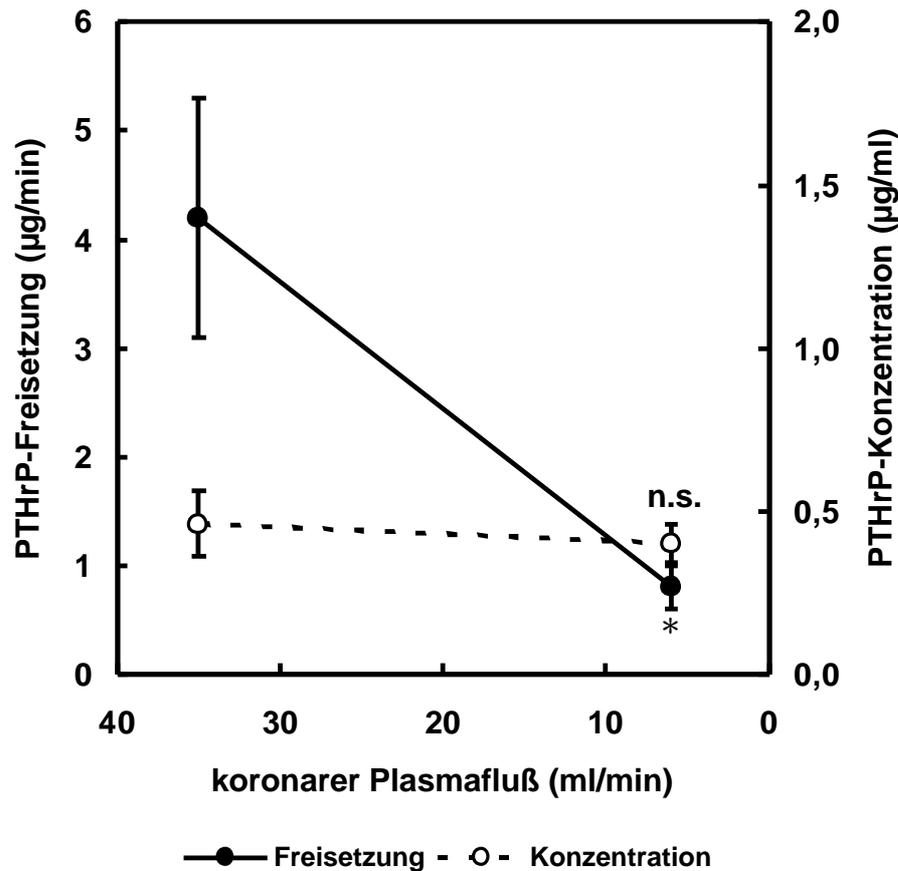


Abb. 4.10: PTHrP-Freisetzung aus dem koronaren Gefäßbett bei Flußreduktion

Beziehung zwischen PTHrP-Freisetzung (schwarze Punkte) aus dem koronaren Gefäßbett des Schweines bzw. der Konzentration (weiße Punkte) in der Vena cordis magna und dem koronaren Plasmafluß bei narkotisierten Schweinen. Die PTHrP-Freisetzung wurde errechnet unter Kontrollbedingungen (links) und fünf Minuten nach Beginn der Hypoperfusion (rechts). Die Daten sind MW±SD aus n=6 Experimenten; * p<0,01.

4.1.3.3 Einfluß der NO-Synthase auf die Freisetzung in vivo

Eine Überprüfung der am isoliert perfundierten Herzen gefundenen Daten bezüglich der NO-unabhängigen PTHrP-Freisetzung erfolgte in vivo durch den Einsatz des NO-Synthase-Inhibitors L-NA. Bei konstantem Fluß (29±8 vs. 31±7 ml/min) konnte durch Zugabe von L-NA keine signifikante Änderung der PTHrP-Freisetzung beobachtet werden (4,28±1,91 vs. 4,49±6,71 µg/min, n=6 Experimente, n.s.).

4.1.3.4 Druckunabhängige Freisetzung von PTHrP durch Bradykinin am isoliert perfundierten Rattenherzen und in vivo

Zur Bestätigung des in vitro nachgewiesenen Freisetzungsmechanismus von PTHrP wurden Experimente am isoliert perfundierten Rattenherzen bzw. in vivo am narkotisierten Schwein durchgeführt. Um eine mechanosensitive Freisetzung von PTHrP zu vermeiden, wurde bei diesen Versuchen der Perfusionsdruck konstant gehalten. Die Gabe von Bradykinin verursachte am isoliert perfundierten Rattenherzen einen Anstieg der PTHrP-Freisetzung um 51,3% und eine Steigerung des Koronarflusses um 39,7%. Am Schweineherzen steigerte Bradykinin unter in vivo Bedingungen die PTHrP-Freisetzung um 73% und den Fluß um 150,5% (Abb. 4.11).

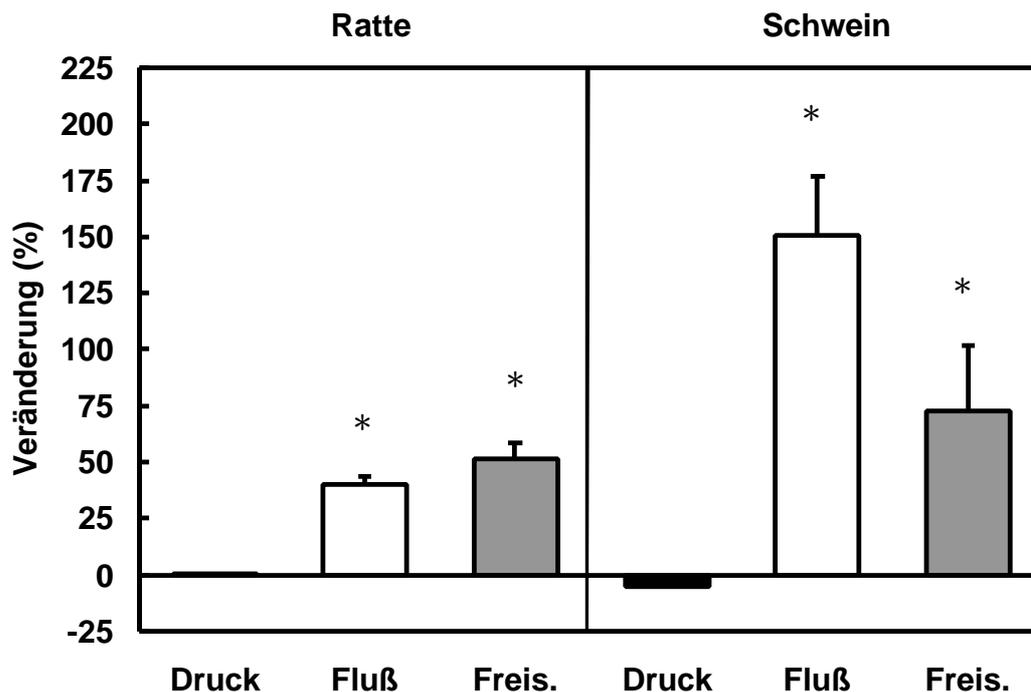


Abb. 4.11: Einfluß von Bradykinin auf die PTHrP-Freisetzung

Isolierte Rattenherzen wurden bei konstantem Perfusionsdruck für zehn Minuten perfundiert. Nach dieser Stabilisationsphase wurde Bradykinin ($10 \mu\text{M}$) zugegeben. Die Balken zeigen die maximalen Änderungen, welche fünf Minuten nach Bradykininzugabe beobachtet wurden. Die unter Kontrollbedingungen gemessenen 100%-Werte lagen für den koronaren Perfusionsdruck (Druck, schwarz) bei 55 mmHg , für den Koronarfluß (Fluß, weiß) bei $4,48 \pm 0,57 \text{ ml/min}$ und für die PTHrP-Freisetzung (Freis., grau) bei $186 \pm 54 \text{ ng/min}$. Vor intrakoronarer Applikation von Bradykinin am Schweineherzen lagen die 100%-Werte bei $117,4 \pm 5,4 \text{ mmHg}$ für den mittleren koronaren Perfusionsdruck (Druck, schwarz), bei $36,9 \pm 4,3 \text{ ml/min}$ für den Koronarfluß (Fluß, weiß) und bei $4,1 \pm 0,8 \mu\text{g/min}$ für die PTHrP-Freisetzung (Freis., grau). Die Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$ aus $n=4$ Experimenten; * $p < 0,05$ vs. Ende der Stabilisationsphase.

4.1.4 Validierung der Ergebnisse unter klinischen Bedingungen

Zur Validierung der Ergebnisse unter klinischen Bedingungen wurde die PTHrP-Konzentration in Plasmaproben von Kindern mit Atriale Septumdefekt bestimmt. Bei den untersuchten Patienten lag der pulmonale Fluß im Mittel präoperativ

2,1±0,1fach über dem systemischen Fluß. Nach Verschuß des Defektes glich sich die Flußrate in der Pulmonalarterie derjenigen der Systemarterie (A. femoralis) an (Abb. 4.12).

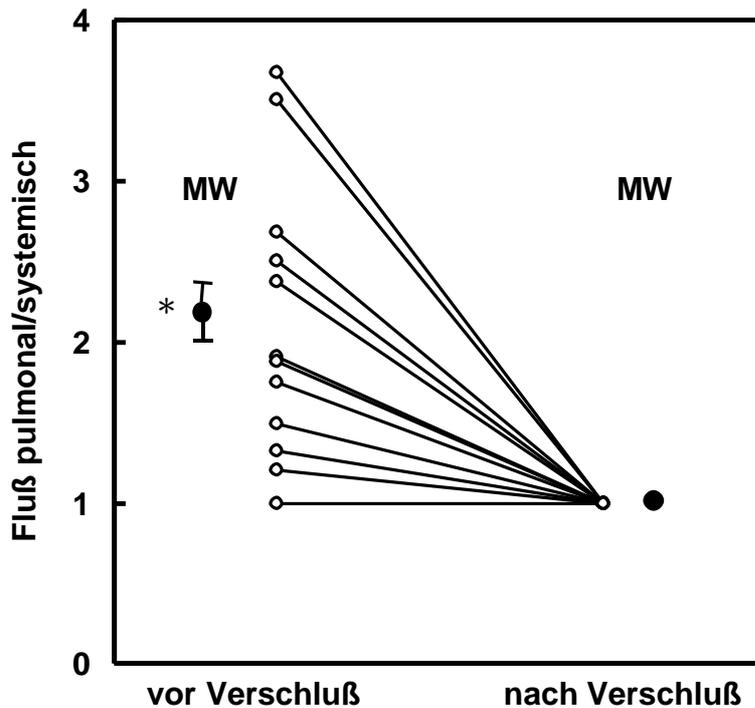


Abb. 4.12: Verhältnis des pulmonalen zum systemischen Fluß vor und nach Verschuß des Defektes

Dargestellt ist der Quotient aus pulmonaler und systemischer Flußrate für jeden einzelnen Patienten (weiße Punkte) und der sich daraus ergebende MW±SE aus n=12; * p<0,05 vs. postoperativ.

Ein Vergleich der aus dem linken Vorhof entnommenen Proben mit denjenigen aus System- und Pulmonalarterie bzw. Vena cava ergab, daß die Konzentration an PTHrP in der Pulmonalarterie sowohl über derjenigen in der Arteria femoralis (+35±8%, p<0,05) als auch der im linken Vorhof (+26±7%, p<0,05) und in der Vena cava (+22±11%, p<0,05) lag (Abb. 4.13).

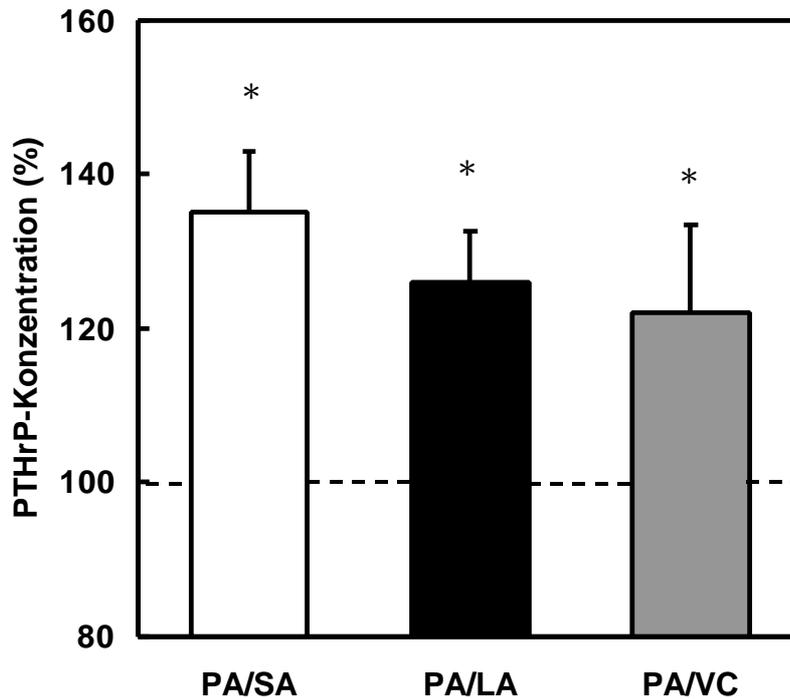


Abb. 4.13: Konzentration von PTHrP in der Pulmonalarterie verglichen mit der Konzentration in der Arteria femoralis, dem linken Vorhof und der Vena cava präoperativ

Dargestellt ist die Konzentration an PTHrP in der Pulmonalarterie (PA; weißer Balken), im linken Vorhof (LA; schwarzer Balken) und in der Vena cava (CV; grauer Balken), jeweils in % der Konzentration der Systemarterie (SA). Die Daten sind $MW \pm SE$ aus $n=20$ Patienten; * $p < 0,05$ vs. SA (weiß), LA (schwarz) bzw. VC (grau).

Die durch den Verschuß des Defektes bedingte Senkung der Flußrate im kleinen Kreislauf und die daraus resultierende Normalisierung der Volumen- bzw. Flußverhältnisse verursachte eine postoperativ signifikant verringerte PTHrP-Konzentration in der Arteria pulmonalis bezogen auf die systemische Konzentration (126 ± 7 vs. $101\pm 5\%$) (Abb. 4.14).

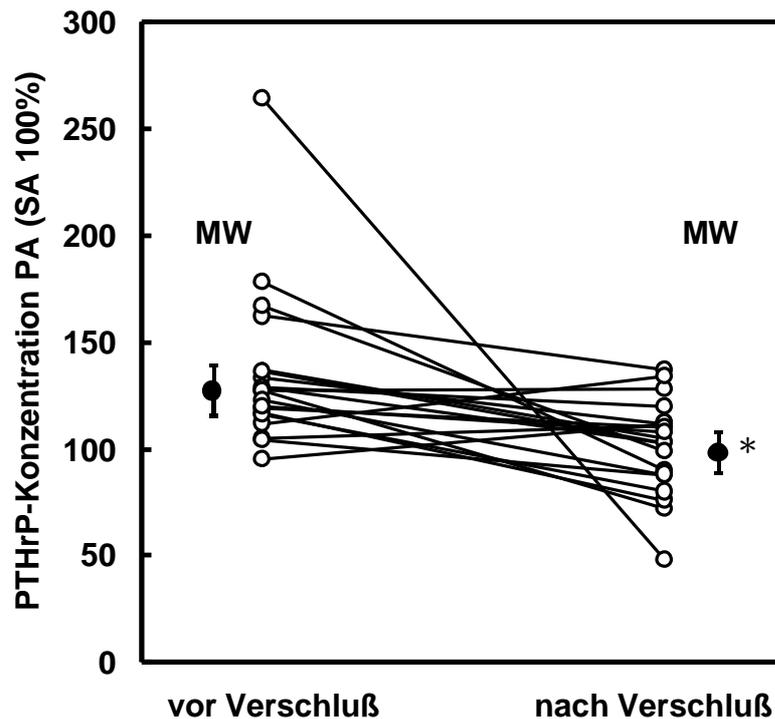


Abb. 4.14: PTHrP-Konzentration in der Pulmonalarterie bezogen auf die der Arteria femoralis vor und nach Verschuß des Defektes

Dargestellt sind die Werte der einzelnen Patienten und der sich daraus ergebende $MW\pm SE$ aus $n=18$ Kindern; * $p<0,05$ vs. präoperativ.

Aufgrund der vasodilatierenden Eigenschaften von PTHrP wären bei verminderter Freisetzung Auswirkungen auf das Gefäßlumen und somit auf den Gefäßwiderstand zu erwarten. Wie in Abb. 4.15 dargestellt, ergab ein Vergleich des pulmonalen bezogen auf den systemischen Gefäßwiderstand nach Verschuß einen signifikant

gegenüber den präoperativen Werten erhöhten Wert ($0,045 \pm 0,008$ vs. $0,089 \pm 0,012$), der mit einer Abnahme der lokalen Konzentration von PTHrP einhergeht.

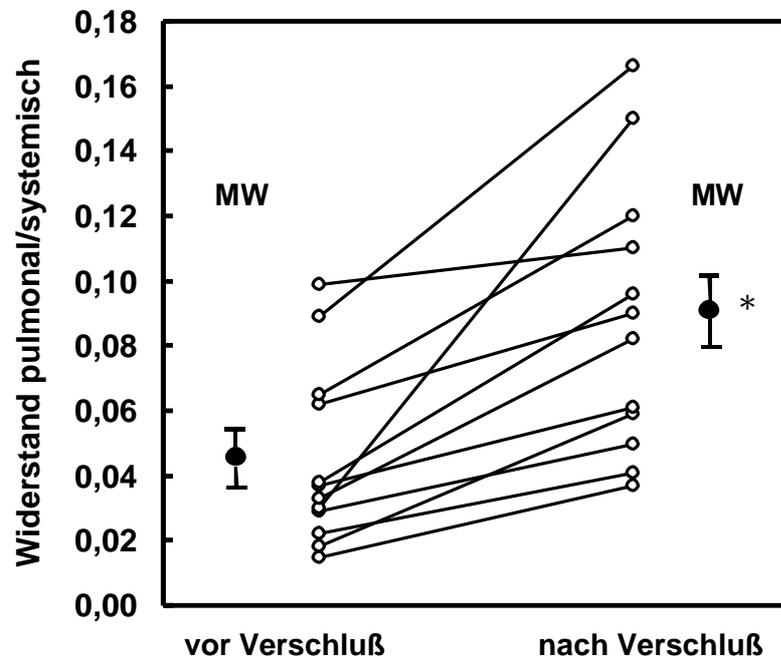


Abb. 4.15: Verhältnis des pulmonalen zum systemischen Gefäßwiderstand vor und nach Verschuß des Defektes

Dargestellt ist der Quotient aus pulmonalem und systemischem Widerstand für jeden einzelnen Patienten (weiße Punkte) und der sich daraus ergebende $MW \pm SE$ (schwarze Punkte) aus $n=12$ Kindern; * $p < 0,05$ vs. präoperativ.

4.2 Ischämie-bedingte Freisetzung

4.2.1 Ischämie-bedingte Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen

Die bislang beschriebenen Experimente weisen auf eine Kalzium-induzierte PTHrP-Freisetzung hin. Eine Vermittlung der PTHrP-Freisetzung über einen Ischämie-bedingten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ist daher wahrscheinlich.

Im Folgenden wurde deshalb die Auswirkung der Ischämie auf die PTHrP-Freisetzung untersucht.

Am isoliert perfundierten Rattenherzen wurde im Anschluß an eine fünfzehnminütige Stabilisationsphase mit einer Flußrate von 5 ml/min durch Unterbrechung der Flüssigkeitszufuhr für die Dauer von 30 min eine no-flow-Ischämie erzeugt. In der frühen Phase der anschließenden Reperfusion fand sich eine gegenüber den präischämisch gemessenen Werten signifikant erhöhte PTHrP-Konzentration im Effluat (Abb. 4.16).

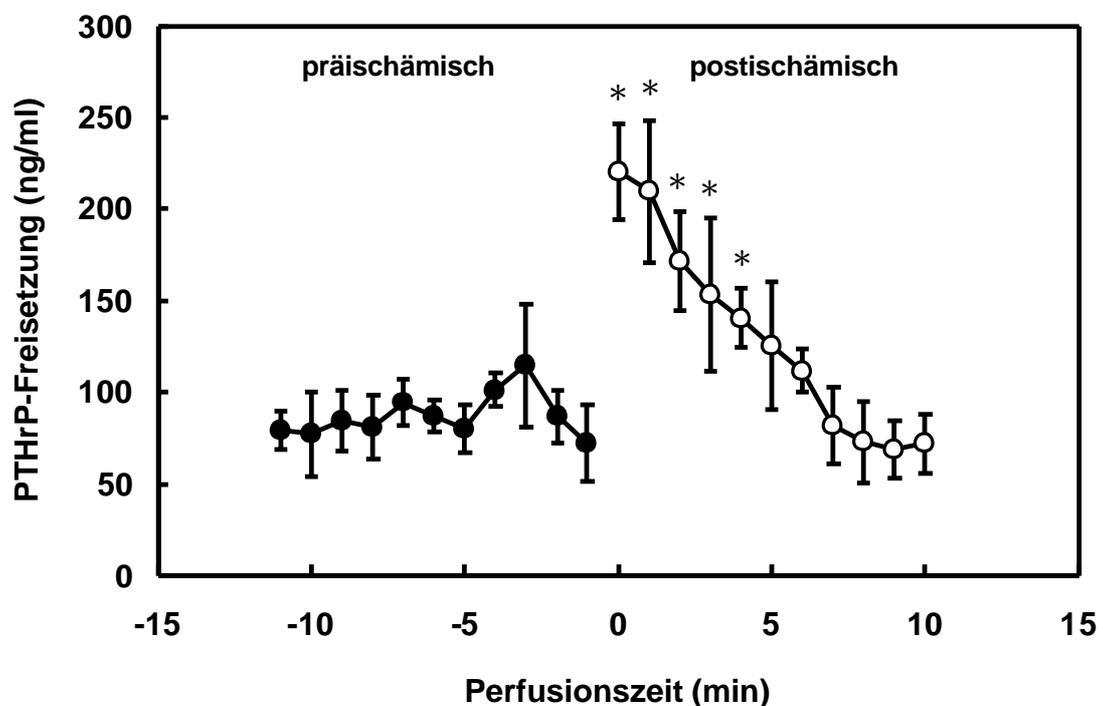


Abb. 4.16: Prä- und postischämische PTHrP-Freisetzung

Isolierte, nicht schlagende Rattenherzen wurden mit einer Flußrate von 5ml/min perfundiert. Nach einer Stabilisationsphase von 15 Minuten (schwarze Punkte) wurde eine dreißigminütige no-flow-Ischämie (nicht dargestellt) mit anschließender Reperfusion (weiße Punkte) durchgeführt. Gezeigt werden $MW \pm SD$ aus $n=12$ Experimenten, * $p < 0,05$ vs. Ende der Stabilisationsphase.

4.2.2 Freisetzung durch Energieverarmung an kultivierten koronaren Endothelzellen

An kultivierten koronaren Endothelzellen wurde untersucht, ob der Anstieg der Konzentration des intrazellulären Kalziums kausal an der Ischämie-bedingte Freisetzung von PTHrP beteiligt ist. Bei Simulation einer Ischämie durch eine mittels Kaliumcyanid und Deoxyglukose hervorgerufene Energieverarmung konnte ein signifikanter Anstieg der PTHrP-Freisetzung gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Eine Präinkubation mit dem Kalziumchelator BAPTA (10 μ M) bewirkte eine Abschwächung dieses Effektes ($5,4\pm 1,3\%$ vs. $39,5\pm 5,9\%$ bzw. $24,3\pm 5,4\%$) (Abb. 4.17).

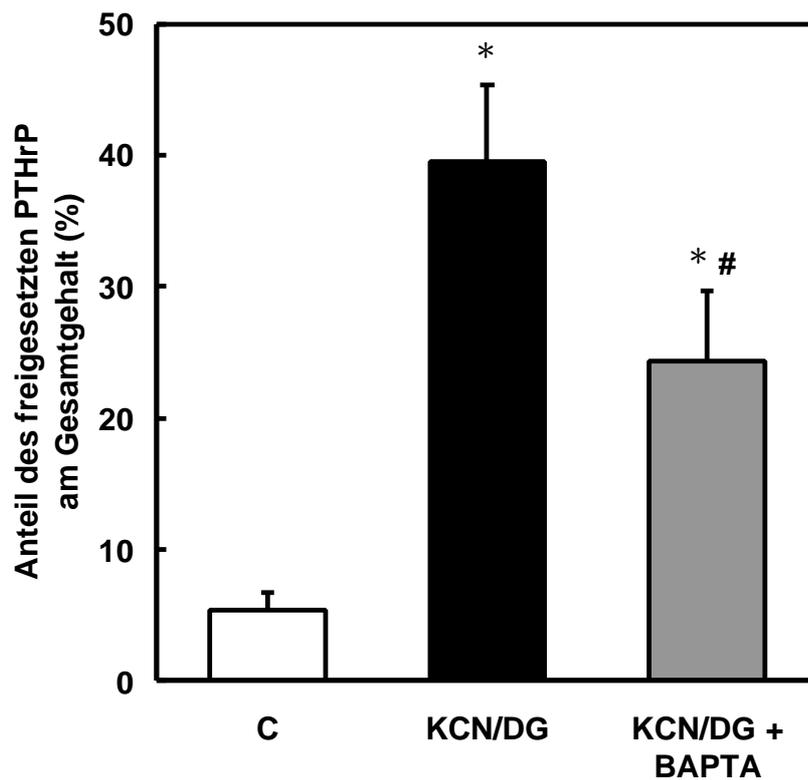


Abb. 4.17: PTHrP-Freisetzung von kultivierten koronaren Endothelzellen unter Energieverarmung

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil des freigesetzten PTHrP am PTHrP-Gesamtgehalt von Zellen und Überstand. Die kultivierten koronaren Endothelzellen wurden für 40 min mit KCN/DG energieverarmt (schwarzer Balken, KCN/DG) bzw. eine halbe Stunde mit BAPTA (10 μ M) vorinkubiert (grauer Balken; KCN/DG + BAPTA). Die PTHrP-Konzentration im Überstand und in den geernteten Zellen wurde mittels Standard bestimmt und der prozentuale Anteil des freigesetzten PTHrP am Gesamtgehalt errechnet. Der Gesamtgehalt an PTHrP betrug je Schale $63,8 \pm 10,0$ ng. Die Daten sind $MW \pm SD$ aus je $n=7$ Kulturschalen; * $p < 0,05$ vs. C, # $p < 0,05$ vs. KCN/DG.

4.2.3 Freisetzung in vivo

Zur Überprüfung der am isoliert perfundierten Herzen und in vitro gewonnenen Ergebnisse wurde in vivo beim Schwein eine low-flow-Ischämie erzeugt, indem über einen Zeitraum von 90 min der Koronarfluß auf 10% seines ursprünglichen Wertes reduziert wurde. Dies führte zu einer gegenüber den präischämisch gemessenen Werten signifikant erhöhten Konzentration an PTHrP in den koronarvenös entnommenen Proben (Abb. 4.18).

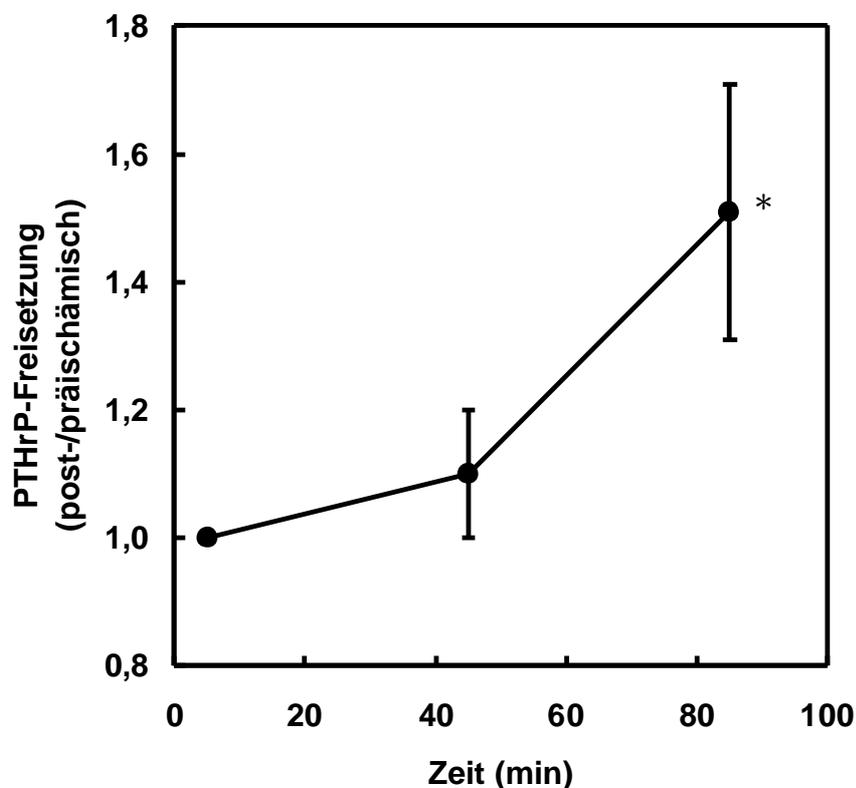


Abb. 4.18: PTHrP-Freisetzung aus dem Koronarbett in vivo bei Flußreduktion auf 10% beim Schwein

Beim Schwein wurde in vivo der Koronarfluß nach einer Stabilisationsphase für 90 min auf 10% seines Ausgangswertes reduziert. Gezeigt wird die PTHrP-Freisetzung als Quotient aus präischämischem und postischämischem Wert zum Zeitpunkt 0 min, 45 min und 85 min nach Flußreduktion. Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n=12$ Experimenten; * $p < 0,05$ vs. Beginn der low-flow-Ischämie (Zeitpunkt 0).

4.3 Nachweis der funktionellen Relevanz des endothelial freigesetzten PTHrP

4.3.1 Wirkung synthetischer PTHrP-Peptide mit endogen biologischer Aktivität auf den Koronarwiderstand

Eine Überprüfung der Rezeptorfunktionalität erfolgte am isoliert perfundierten Rattenherzen durch die exogene Zugabe von synthetischem PTHrP1-34 und Bestimmung der Auswirkungen auf den Koronarwiderstand. Hierfür wurden die Koronargefäße durch die Gabe des α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin vorkonstringiert, wodurch der koronare Gefäßwiderstand von $8,87 \pm 0,34$ mmHg/g*ml auf $10,83 \pm 0,19$ mmHg/g*ml anstieg. Die Zugabe von PTHrP1-34 (100nM) führte zu einem signifikanten Abfall des Widerstandes um 11,8% auf $9,55 \pm 0,21$ mmHg*g/ml ($n=13$, $p<0,05$).

Am Schweineherzen senkte die intrakoronare Applikation von 15 μ g PTHrP1-34 den Koronarwiderstand von $3,1 \pm 0,3$ mmHg/ml*min⁻¹ auf $1,0 \pm 0,1$ mmHg/ml*min⁻¹ ($n=3$, $p<0,05$).

4.3.2 Wirkung von PTHrP-Rezeptorantagonisten auf den Koronarwiderstand

Um die Rolle des flußabhängig freigesetzten PTHrP in der Regulation des Koronarwiderstandes zu untersuchen, wurde am isoliert perfundierten Rattenherzen die Wirkung von PTHrP durch den Rezeptor-Antagonisten (D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34) inhibiert. Hierdurch stieg der Widerstand in den mit Phenylephrin vorkonstringierten Koronargefäßen um 10,9% (Abb. 4.19).

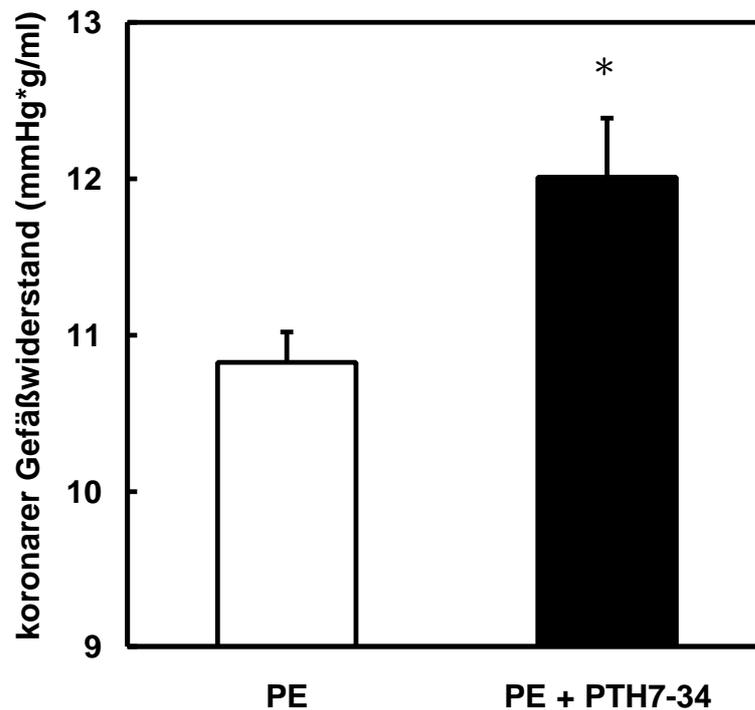


Abb. 4.19: Bedeutung des endogen freigesetzten PTHrP für den Koronarwiderstand

Die Koronargefäße wurden durch den α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin vorkonstrigiert (PE; weißer Balken). Die Hemmung des endogen freigesetzten PTHrP durch den Rezeptor-Antagonisten D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 bewirkte einen signifikanten Anstieg des Koronarwiderstandes (schwarzer Balken). Dargestellt sind jeweils MW \pm SD von n=6 Experimenten, * p<0,05 vs PE.

4.3.3 Funktionelle Relevanz des Ischämie-bedingt freigesetzten PTHrP für die Reperfusion

Eine mögliche Bedeutung des Ischämie-bedingt freigesetzten PTHrP für die funktionelle Erholung wurde im Folgenden durch Einsatz des PTHrP-Antagonisten D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 untersucht. Als Maß der funktionellen Erholung diente der linksventrikulär entwickelte Druck während der Reperfusion bezogen auf die präischämischen Werte.

Während die exogene Zugabe von PTHrP am isoliert perfundierten Rattenherzen keinen Einfluß auf die funktionelle Erholung hatte, bewirkte der PTHrP-Antagonist D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 eine deutlich schlechtere Funktionserholung (Abb 4.20). Der Koronarwiderstand war zwischen den drei Gruppen zu keinem Zeitpunkt der Reperfusion signifikant verändert.

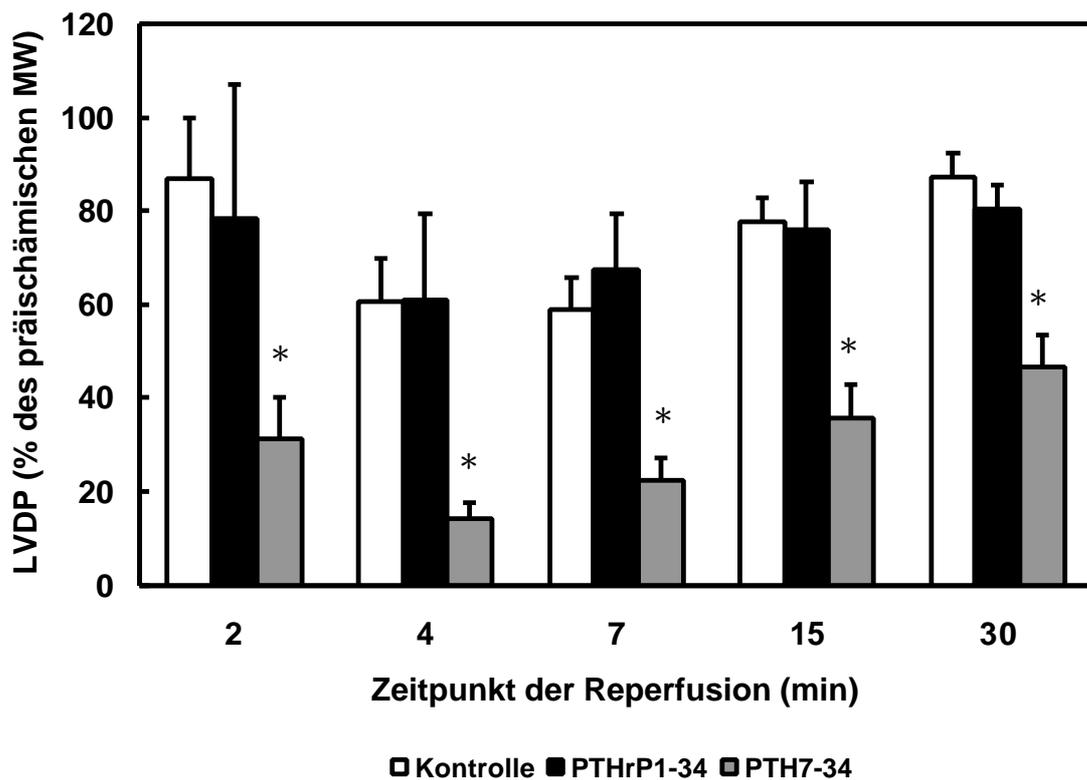


Abb. 4.20: Rolle des endogen freigesetzten PTHrP für die funktionelle Erholung
An isoliert perfundierten Rattenherzen wurde eine dreißigminütige no-flow-Ischämie durchgeführt (weiße Balken) bzw. vor Ischämiebeginn PTHrP1-34 (schwarze Balken) oder der Rezeptor-Antagonist D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 (graue Balken) eingewaschen und der linksventrikulär entwickelte Druck präischämisch und während der Reperfusion gemessen. Die Daten sind MW±SE aus je n=6 Experimenten, * p<0,05 vs. C.

4.4 Biologische Aktivität des immunologisch nachgewiesenen PTHrP

4.4.1 Biologische Aktivität von authentischem humanem PTHrP

Die Überprüfung der biologischen Aktivität des detektierten PTHrP erfolgte über eine Aufreinigung des Proteins und dessen Einsatz am isoliert perfundierten Rattenherzen. Als Nachweis einer biologischen Aktivität wurde die positiv chronotrope Wirkung angesehen.

Wie in Abb. 4.21 dargestellt, führte immunpräzipitiertes humanes PTHrP zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz. Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Gabe des PTHrP-Antagonisten D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 inhibiert.

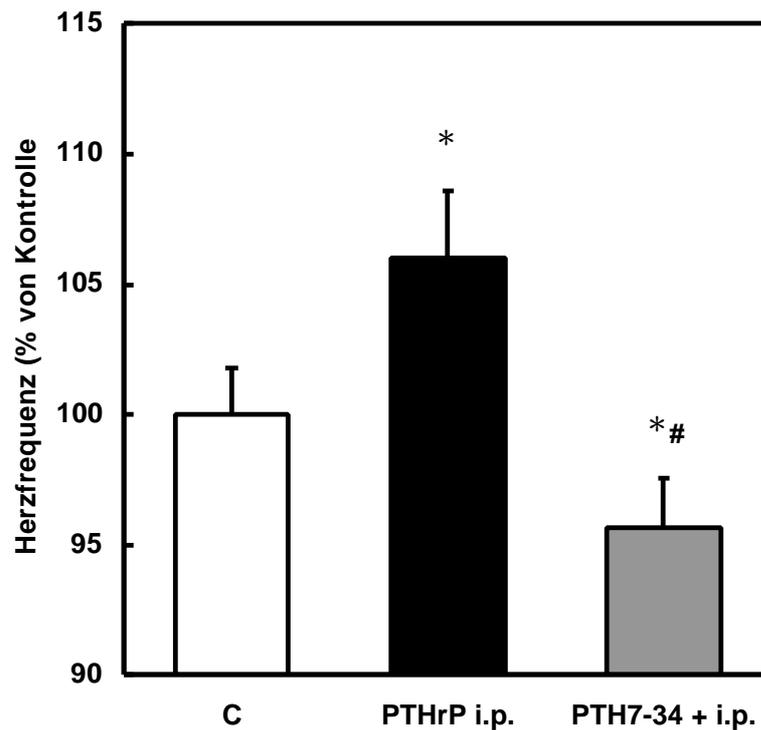


Abb. 4.21: Herzfrequenz unter Einfluß von authentischem PTHrP bzw. des PTHrP-Antagonisten D¹²-Tyr³⁴-PTH7-34

Isolierte Rattenherzen wurden zehn Minuten mit Standardpuffer perfundiert und die Schlagfrequenz gemessen (C; weißer Balken). Anschließend folgte die Gabe von aus humanen Plasmaproben immunpräzipitiertem PTHrP (PTHrP i.p.) in einer Konzentration von 100 nM (schwarzer Balken) bzw. eine gleichzeitige Gabe von PTHrP i.p. und dem PTHrP-Antagonisten D¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 in gleicher Konzentration (grauer Balken). Dargestellt sind MW±SD aus n=4 Experimenten, * p<0,05 vs. Kontrolle (C), # p<0,05 vs. PTHrP i.p..

4.4.2 Biologische Aktivität von authentischem porcinem PTHrP

Um die biologische Aktivität des in porcinen Plasmaproben detektierten PTHrP zu überprüfen, wurden an isoliert perfundierten Rattenherzen die Koronargefäße durch die Gabe des α -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin (PE) vorkonstringiert. Der koronare Gefäßwiderstand stieg hierdurch von $8,87\pm 0,34$ mmHg*g/ml auf $10,83\pm 0,19$ mmHg*g/ml. Die Zugabe des authentischen porcinen PTHrP führte zu einem signifikanten Absinken des koronaren Gefäßwiderstandes (Tab. 4.3)

		Koronarwiderstand (mmHg*g/ml)	
PE	n=22	10,83±0,19	
PE + PTHrPauth.	n=5	9,26±0,26*	-14,5%

Tab. 4.3:

Isolierte Rattenherzen wurden mit einem konstanten Druck von 55 mmHg perfundiert und durch Anlegen einer Elektrode auf eine Frequenz von 3 Hz eingestellt. Der koronare Gefäßwiderstand wurde berechnet aus dem Quotienten von Perfusionsdruck und Flußrate normiert auf das Herzgewicht. Der basale Koronarwiderstand betrug $8,87 \pm 0,34$ mmHg*g/ml. Die Herzgefäße wurden durch Phenylephrin (PE, $10 \mu\text{M}$) vorkonstringiert. Nach fünf Minuten entwickelte sich ein stabiler Gefäßwiderstand und aus Schweineplasma immunpräzipitiertes PTHrP (PTHrP auth.) wurde in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Die Daten sind $\text{MW} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$ vs. Phenylephrin.

5 Diskussion

5.1 Hauptbefunde

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine konstante Freisetzung von PTHrP aus dem koronaren Gefäßbett sowohl am isoliert perfundierten Herzen als auch unter in vivo Bedingungen nachgewiesen werden. Die Modulation der Freisetzung erfolgt über Änderungen der Flußrate. Der ihr zugrunde liegende Mechanismus ist an die intrazelluläre Kalziumkonzentration gekoppelt.

Weiterhin wurde gezeigt, daß es auch unter ischämischen Bedingungen zu einem Anstieg der PTHrP-Freisetzung kommt. Ursächlich hierfür ist ebenfalls ein kalzium-abhängiger Mechanismus.

Die physiologische Relevanz sowohl der basalen als auch der Ischämie-bedingten Freisetzung von PTHrP wurde über die Hemmung seiner Aktivität mittels Gabe eines PTHrP-Rezeptor-Antagonisten nachgewiesen, welche den koronaren Widerstand erhöhte bzw. die funktionelle Erholung nach einer Ischämie verzögerte.

5.2 Mechanosensitive Freisetzung von PTHrP

Kultivierte koronare Endothelzellen setzen unter no-flow-Bedingungen kein PTHrP frei (SCHLÜTER et al. 2000), wohingegen im Effluat isoliert perfundierter Herzen PTHrP detektiert werden konnte. Daraus ergibt sich, daß zur Freisetzung des Peptidhormons eine bestimmte Art von Stimulus benötigt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde eine strenge Korrelation zwischen der Flußrate und der PTHrP-Freisetzung am isoliert perfundierten Rattenherzen gefunden. Darüber hinaus konnte auch in vivo eine Nettofreisetzung aus dem koronaren Gefäßbett beobachtet werden, welche ebenfalls eine Abhängigkeit von der Flußrate zeigte. Der Umstand, daß die Konzentration an PTHrP im Effluat bzw. Plasma sowohl am isoliert perfundierten Herzen als auch in vivo beim Schwein bei verschiedenen Flußrate unverändert blieb, weist auf das Vorliegen einer adaptiven Freisetzung hin.

Die durch den Blutfluß auf das Gefäßbett einwirkenden Kräfte bedingen die lokale Freisetzung verschiedener gefäßwirksamer Mediatoren, welche an der Regulation des Koronarwiderstandes und somit an der Myokarddurchblutung beteiligt sind. Hierbei muß unterschieden werden in an der luminalen Seite der Endothelzellen entwickelte, tangentielle Kräfte, nämlich der von Strömungsgeschwindigkeit und Viskosität abhängigen Wandschubspannung, und denjenigen, welche durch den transmuralen Druck und die pulsatile Dehnung des Gefäßes insbesondere auf die abluminale Seite der Endothelzellen einwirken. Für einige Autakoide wurde eine Abhängigkeit der Freisetzung von diesen mechanisch-physikalischen Stimuli nachgewiesen. Die wichtigsten bisher bekannten, endothelial freigesetzten Mediatoren sind Prostazyklin (PGI_2), Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF), welche vasodilatatorische Eigenschaften besitzen, und der Vasokonstriktor Endothelin. Aus dieser Gruppe gilt NO als potentester Vasodilatator. Für seine Freisetzung ist die Wandschubspannung als wichtigster Stimulus anzusehen (FLEMING et al. 1996). Die Vermittlung dieser Freisetzung erfolgt über einen kalziumunabhängigen Mechanismus unter Einbeziehung einer Tyrosin-Phosphatase (FISSLTHALER et al. 2000). Auch für PGI_2 ist eine wand-schubspannungsabhängige Freisetzung bekannt (FRANGOS et al. 1985, HANADA et al. 2000). Für PTHrP konnte im Rahmen dieser Arbeit keine über Veränderungen der Wandschubspannung vermittelte Freisetzung nachgewiesen werden, da eine Erhöhung der Wandschubspannung über die Perfusativiskosität bei gleichbleibender Flußrate ohne Wirkung auf die basale Freisetzung von PTHrP blieb. Der Nachweis einer tatsächlich vermehrten Wandschubspannung wurde über die gesteigerte Konzentration des NO-Abbauproduktes Nitrit im Effluat erbracht. Eine Beteiligung der Wandschubspannung an dem flußabhängigen Freisetzungsmechanismus von PTHrP ist somit auszuschließen.

Stickstoffmonoxid wirkt nicht nur als direkter Vasodilatator, sondern ist zusätzlich in der Lage, die Freisetzung anderer Autakoide zu modulieren. Insbesondere für EDHF wurde eine Hemmung der Synthese durch NO nachgewiesen (BAUERSACHS et al. 1996). Hinsichtlich der Beeinflussung der PGI_2 -Freisetzung durch NO sind die bisher gemachten Beobachtungen uneinheitlich. Nach OSANAI et al. (2000) erhöhte die Hemmung der NO-Synthase (NOS) an HUVECS die flußinduzierte Freisetzung von PGI_2 , während WANG und DIAMOND 1997 eine Abnahme des Wandschub-

spannungs-abhängigen Anstiegs der PGI₂-Produktion durch die Hemmung der NOS an bovinen Endothelzellen der Aorta beobachtet. Im Gegensatz dazu beeinflusste in der vorliegenden Arbeit weder die verstärkte NO-Bildung durch Zugabe des NO-Donors Arginin noch die Hemmung der NO-Synthase durch L-NA die Freisetzung von PTHrP am isoliert perfundierten Herzen. Diese Befunde konnten durch in vivo Experimente bestätigt werden. Auch hier rief die Hemmung der NOS keine Änderung der PTHrP-Freisetzung hervor. Somit ist davon auszugehen, daß die Freisetzung von PTHrP unabhängig von der Konzentration an Stickstoffmonoxid erfolgt.

Wie bereits oben erwähnt, stellt die durch den pulsatilen Blutfluß hervorgerufene Dehnung der vaskulären Endothelzellen einen weiteren wichtigen Stimulus zur Freisetzung gefäßwirksamer Mediatoren dar. POPP et al. untersuchten 1998 die Freisetzung von EDHF an isolierten porcinen Koronararterien, welche zyklisch wechselnden Drücken ausgesetzt wurden, und stellten eine Abhängigkeit der Freisetzung von der Gefäßwanddehnung fest. Eine solche Abhängigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit auch für PTHrP gefunden. In vitro konnte bei zyklischer Dehnung ausgesetzten mikrovaskulären Endothelzellen eine Freisetzung von PTHrP in den Überstand beobachtet werden. Diese den Blutfluß imitierende pulsatile Dehnung ruft einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration hervor, welcher durch einen Kalziuminflux durch dehnungsabhängige Kalziumkanäle und der Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher zustande kommt (ROSALES et al. 1997). Da in Gegenwart des Kalziumchelators BAPTA die dehnungsinduzierte Freisetzung von PTHrP inhibiert war, ist von dem Vorliegen eines kalziumabhängigen Mechanismus auszugehen. Auch der dehnungsabhängigen Freisetzung von EDHF liegt eine solche Vermittlung über den Anstieg der Konzentration des freien intrazellulären Kalziums zugrunde (POPP et al. 1998). Unterstützt werden diese Befunde dadurch, daß bei Gabe von Bradykinin, welches an Endothelzellen durch Steigerung der IP₃-Konzentration in der Zelle eine dehnungsunabhängige Kalziumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum bewirkt (COLDEN-STANFIELD et al. 1987), sowohl in vitro als auch in vivo und am isoliert perfundierten Herzen unter druckkonstanten Bedingungen eine Zunahme der PTHrP-Freisetzung beobachtet werden konnte. Der gleichzeitig gemessene Anstieg der Flußrate blieb durch die druckkonstant gewählten Versuchsbedingungen in diesem Fall ohne Einfluß auf die Freisetzung, so daß die gesteigerte Freisetzung allein als Folge des Anstiegs der intrazellulären

Kalziumkonzentration anzusehen ist. Dies geht konform mit der Beobachtung, daß rezeptorabhängige Agonisten wie z.B. Bradykinin oder Acetylcholin, welche die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen, ebenfalls in der Lage sind, die Freisetzung der anderen bekannten endothelial freigesetzten Mediatoren zu steigern (VANHOUTTE et al. 1995).

Weiterhin wurde beobachtet, daß am isoliert perfundierten Herzen eine Verminderung des Druckes bei flußkonstanter Perfusion eine Abnahme der Freisetzung hervorrief, während die Freisetzung bei Erhöhung des Flusses unter druckkonstanten Bedingungen unverändert blieb. Aus diesen Befunden geht hervor, daß nicht die durch den Fluß bedingten tangentialen Kräfte, sondern der von ihm verursachte Druck auf die Gefäßwand der ausschlaggebende Faktor für die Freisetzung von PTHrP ist.

Die vaskuläre Freisetzung von PTHrP kann prinzipiell durch zwei verschiedene Zelltypen erfolgen, nämlich den Endothel- und den Glattmuskelzellen. Sowohl mikrovaskuläre Endothelzellen als auch vaskuläre Glattmuskelzellen sind in der Lage, PTHrP zu exprimieren (SCHLÜTER et al. 2000, ISHIKAWA et al. 1994). Den durch die Strömung des Blutes entstehenden mechanischen Kräften sind in erster Linie die Endothelzellen direkt ausgesetzt. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind die vaskulären Endothelzellen als Hauptquelle des von isoliert perfundierten Rattenherzen freigesetzten PTHrP anzusehen, da die basale Freisetzungsrates und deren flußabhängige Veränderungen nach Denudierung des Endothels reduziert waren. Als mögliche Ursache der beobachteten Restfreisetzung käme eine nicht vollständige Zerstörung der vaskulären Endothelzellschicht oder eine Freisetzung durch vaskuläre Glattmuskelzellen in Frage. Gegen die letztgenannte Möglichkeit spricht allerdings die Beobachtung, daß vaskuläre Glattmuskelzellen unter zyklischer Dehnung kein PTHrP freisetzen. Einer solchen Freisetzung müßte also ein Mechanismus zugrunde liegen, der sich von demjenigen der endothelialen Freisetzung unterscheidet.

Unterschiedliche Flußraten bzw. Druckverhältnisse im Bereich des Herzens findet man unter pathophysiologischen Bedingungen bei Vorliegen eines Atrialen Septumdefektes (ASD). Durch den unvollständigen Schluß des Foramen ovale bzw. einer Entwicklungsstörung des Septum secundum kommt es zum Auftreten eines

links-rechts-Shunts. Als Folge der vermehrten Volumenbelastung des rechten Herzens kommt es im kleinen Kreislauf zum Vorliegen höherer Flußraten, wobei eine pulmonale Hypertonie erst im späten Stadium der Erkrankung auftritt. Diese Differenz bezüglich der Flußrate ist nach Verschluß des Defektes nicht mehr vorhanden. Präoperativ herrscht im rechten Ventrikel ein höherer Druck, welcher sich ebenfalls nach Aufhebung des Shunts normalisiert.

Eine Überprüfung der experimentell gewonnenen Ergebnisse unter klinischen Bedingungen im Rahmen der ASD-Studie ergab, daß die Reduzierung der Flußrate im kleinen Kreislauf durch den Verschluß des Septumdefektes zu einer Abnahme der PTHrP-Konzentration in der Arteria pulmonalis führte. Bei adaptiver Freisetzung – wie sie unter Versuchsbedingungen gefunden wurde – wäre allerdings prä- gegenüber postoperativ eine unveränderte PTHrP-Konzentration zu erwarten gewesen. Eine Freisetzung von PTHrP in der Lungenstrombahn hätte zudem darin resultieren müssen, daß die Konzentration an PTHrP im linken Vorhof derjenigen in der Pulmonalarterie entspricht bzw. darüber liegt. Die in der Pulmonalarterie sowohl im Vergleich mit dem linken Vorhof als auch mit der Arteria femoralis erhöhte Konzentration an PTHrP läßt sich dadurch erklären, daß der größte Teil des in der Pulmonalarterie detektierten PTHrP aus den endokardialen Endothelzellen des rechten Ventrikels stammt. Der dort präoperativ erhöhte Druck resultierte in einer vermehrten Freisetzung an PTHrP. Mit dieser These übereinstimmend sank die PTHrP-Konzentration in der Pulmonalarterie nach Normalisierung der Druckverhältnisse im rechten Ventrikel durch den Verschluß des Septumdefektes. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß vor Verschluß des Defektes die in der Vena cava superior gemessene Konzentration unter derjenigen in der Pulmonalarterie lag. Diese Ergebnisse bestätigen die druckinduzierte Freisetzung aus kardialen Endothelzellen, allerdings kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen keine Aussage über eine flußabhängige Freisetzung im kleinen Kreislauf gemacht werden. OGINO et al. machten 2002 ähnliche Beobachtungen bei Patienten mit Herzinsuffizienz, d. h. mit einer durch Dilatation bedingten verstärkten Dehnung der Wand des linken Ventrikels. Sie fanden eine erhöhte Konzentration an PTHrP im Koronarsinus, die in der Kontrollgruppe nicht vorlag. Die bei den ASD-Patienten gegenüber der Pulmonalarterie gemessene niedrigere Konzentration im linken Vorhof ist durch eine Metabolisierung des Peptidhormons in der Lungenstrombahn und dessen geringe Halbwertszeit zu erklären.

5.3 Ischämie-bedingte Freisetzung von PTHrP

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der koronaren Herzdurchblutung. Nach einer Ischämie ist im Zuge einer endothelialen Dysfunktion die Freisetzung und Synthese des wichtigsten endothelial gebildeten Vasodilatators NO allerdings reduziert bzw. aufgehoben (WODITSCH und SCHRÖR 1992). Dieser Umstand wirkt einer effektiven Reperfusion und somit einer schnellen funktionellen Erholung entgegen. Zusätzlich führt das Vorliegen einer Ischämie zu einer Energieverarmung der Zellen. Wie von SCHLÜTER et al. 2000 untersucht, kommt es neben der in Kap. 5.2 beschriebenen mechanosensitiven Vermittlung auch unter einer solchen Energieverarmung zu einer PTHrP-Freisetzung aus mikrovaskulären Endothelzellen. In Übereinstimmung mit diesen in vitro gewonnenen Ergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß auch am isoliert perfundierten Rattenherzen nach dreißigminütiger no-flow-Ischämie in der frühen Reperfusionphase eine erhöhte PTHrP-Konzentration im Effluat detektiert werden kann. Eine solche gesteigerte Freisetzung in der Reperfusionphase ist bereits für PGI₂ bekannt (WODITSCH und SCHRÖR 1992). Diese Befunde bestätigten sich auch unter in vivo Bedingungen beim Schwein. Hier kam es nach neunzigminütiger Flußreduktion auf 10% des Ausgangswertes ebenfalls zu einem Anstieg der PTHrP-Freisetzung.

Hypoxie führt unter in vitro Bedingungen an kultivierten Endothelzellen zu einer Freisetzung des endothelial gebildeten Vasokonstriktors Endothelin (KOUREMBANAS et al. 1991). An pulmonalen Endothelzellen wiesen GAINE et al. 1998 unter hypoxischen Bedingungen die Freisetzung anderer, noch nicht vollständig identifizierter Faktoren mit kontraktiler Wirkung nach. Auch an isoliert perfundierten Rattenherzen konnte sowohl während einer Ischämie als auch insbesondere in der frühen Reperfusionphase die Freisetzung von Endothelin beobachtet werden (BRUNNER et al. 1992). Endothelin verursacht eine Abnahme des Koronarflusses bei gleichzeitigem Anstieg des Koronarwiderstandes (GROVER et al. 1992). Die gesteigerte Freisetzung des Vasodilatators PTHrP könnte gerade bei einer verminderten NO-Freisetzung als wichtiger Gegenspieler dieser so ausgelösten Vasokonstriktion wirken.

Energieverarmung verursacht in Endothelzellen eine Akkumulation von Kalzium durch Freisetzung aus intrazellulären Speichern (ZIEGELSTEIN et al. 1994, MUHS

et al. 1997). Die Beobachtung, daß bei Vorinkubation mit dem Kalziumchelator BAPTA unter in vitro-Bedingungen die durch Energieverarmung induzierte PTHrP-Freisetzung deutlich reduziert war, führte zu der Vermutung, daß nicht nur an der mechanosensitiven, sondern auch an der Ischämie-induzierten Freisetzung von PTHrP aus mikrovaskulären Endothelzellen ein kalziumabhängiger Mechanismus beteiligt ist.

5.4 Physiologische und pathophysiologische Relevanz von PTHrP

Voraussetzung für die Effektivität eines Botenstoffs ist das Vorhandensein eines funktionellen Rezeptors an den jeweiligen Zielzellen und die biologische Aktivität des Liganden. Den Nachweis der biologischen Aktivität von authentischem PTHrP der Ratte lieferten SCHLÜTER et al. bereits 1997, indem sie die positiv inotrope Wirkung des aufgereinigten Peptidhormons auf Kardiomyozyten untersuchten. Ergänzend zu diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit die biologische Aktivität sowohl von humanem als auch porcinem authentischem PTHrP nachgewiesen werden. Bei Einsatz von aus humanen Plasmaproben aufgereinigtem PTHrP am isoliert perfundierten Rattenherzen ließ sich eine positiv chronotrope Wirkung beobachten. Im gleichen Modell steigerte das aus porcinen Plasmaproben präzipitierte Protein den Koronarfluß. Somit kann bei allen drei in dieser Arbeit verwendeten Spezies von dem detektierten, endogen freigesetzten PTHrP als einem biologisch aktiven Liganden ausgegangen werden.

Die Wirkungen von PTHrP werden über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt (Kap. 1.2). Am isoliert perfundierten Herzen rief die Gabe des synthetischen Teilpeptids PTHrP1-34 einen Abfall des Koronarwiderstandes hervor. Auch in vivo am Schwein senkte PTHrP1-34 den Koronarwiderstand. Diese Ansprechbarkeit der Gefäße auf die vasodilatierende Wirkung von PTHrP bestätigt das Vorhandensein funktioneller Rezeptoren für N-terminale Fragmente von PTHrP im koronaren Gefäßsystem. Der Umstand, daß sowohl PTHrP als auch D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 an diesen Rezeptor bindet, läßt den Schluß zu, daß die bindende Domäne des Liganden zwischen den Aminosäuren 7 und 34 lokalisiert ist. Eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt allerdings nur durch PTHrP, während D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 als Antagonist wirkt. Daher ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Rezeptor um den PTH1R handelt,

welcher eine zwischen den Aminosäuren 15 und 34 lokalisierte Domäne bindet und dessen Aktivierung durch die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren erfolgt. Die Expression des PTH1R an vaskulären Glattmuskelzellen wurde von WU et al. (1993) und RIAN et al. (1994) beschrieben.

Wie bereits unter 5.2 beschrieben, wird der Koronarfluß von unterschiedlichen endothelial freigesetzten vasoaktiven Substanzen beeinflusst. Die Rolle des endogen freigesetzten PTHrP im Rahmen der Regulation des Koronarflusses bzw. des Gefäßwiderstands am Herzen war bisher weitestgehend ungeklärt. An der Niere bewirkte die Gabe eines PTH1R-Antagonisten weder im in vivo Modell an der narkotisierten Ratte noch am isoliert perfundierten Organ eine Änderung des renalen Blutflusses (FIASCHI-TAESCH et al. 1998, MASSFELDER et al. 1996). Dagegen führte eine Antagonisierung des endogen freigesetzten PTHrP durch den Rezeptor-Antagonisten D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 im Rahmen der vorliegenden Arbeit am isoliert perfundierten Rattenherzen zu einem Anstieg des Koronarwiderstandes. Auch unter klinischen Bedingungen ist eine vasodilatierende Wirkung des basal freigesetzten PTHrP zu erwarten. Dies bestätigte sich dadurch, daß das nach Verschuß des Atrialen Septumdefektes auftretende Absinken der PTHrP-Konzentration in der Pulmonalarterie einen Anstieg des Gefäßwiderstandes zur Folge hatte. Demnach kommt PTHrP bei der Kontrolle des Koronarflusses eine regulatorische Funktion zu.

Das Vorliegen einer Ischämie und die anschließende Reperfusion resultieren in einer myokardialer Dysfunktion, welche gekennzeichnet ist durch einen Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP), Änderungen im koronaren Perfusionsdruck und einem verminderten linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP), welcher sich im Zuge der Reperfusion nur langsam erholt. Einen möglichen Einfluß endothelial freigesetzter Mediatoren auf die postischämische funktionelle Erholung des Herzens untersuchten WODITSCH und SCHRÖR 1992 für NO und PGI₂. Hierbei führte die Hemmung der NO-Bildung zu einem Anstieg des Koronarwiderstandes, blieb aber ohne Auswirkungen auf die kontraktile Funktion des linken Ventrikels während der Ischämie und Reperfusion. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibierung der PGI₂-Bildung durch Indomethacin eine ernsthaften Einschränkung der myokardialen Funktion in der Reperusionsphase mit einem Anstieg des LVEDP und einer Abnahme der myokardialen Kontraktionskraft zur Folge. JANSEN et al. beobachteten 2002 in vivo am Schweineherzen bei exogener Zugabe von PTHrP1-34 in die Arteria

coronaria sinister sowohl eine Zunahme des Blutflusses im Ischämie-geschädigten Herzen als auch eine Verbesserung der myokardialen Funktion, welche als direkter Effekt des PTHrP1-34 und nicht als Folgeerscheinung der verbesserten Durchblutung anzusehen war.

Die Inhibierung der Wirkung des Ischämie-induziert freigesetzten PTHrP durch den Rezeptorantagonisten D-Trp¹²-Tyr³⁴-PTH7-34 am isoliert perfundierten Herzen führte in der vorliegenden Arbeit zu einem deutlich verzögerten Erreichen des prä-ischämisch herrschenden linksventrikulär entwickelten Drucks und infolgedessen zu einer schlechteren funktionellen Erholung. In diesem Zusammenhang liegt eine mögliche physiologische Relevanz des endogenen, Ischämie-bedingt freigesetzten PTHrP während der Reperfusionphase nicht nur in der durch seine vasodilatierenden Eigenschaften hervorgerufenen verbesserten Durchblutung, sondern auch in seiner direkten inotropen Wirkung und somit einer besseren funktionellen Erholung.

5.5 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, daß endogen freigesetztem PTHrP sowohl in der Regulation des koronaren Blutflusses als auch im Rahmen der postischämischen Erholung des Herzens eine wichtige Rolle als parakrin wirkendem Faktor zukommt. Die Freisetzung von PTHrP erfolgt im koronaren Gefäßbett vorwiegend aus den Endothelzellen. Seine lokale Plasmakonzentration wird durch Änderungen des auf die Gefäßwand einwirkenden Drucks gesteuert. Diesbezüglich scheint es keine wesentlichen Speziesunterschiede zwischen Ratte, Schwein und Mensch zu geben.

PTHrP ist somit neben NO, PGI₂ und EDHF als ein wichtiger endothelial freigesetzter Mediator mit vasodilatierender Wirkung anzusehen. Von besonderem Interesse ist der Umstand, daß die lokale Konzentration von PTHrP unabhängig von der NO-Konzentration moduliert wird. Aus diesem Grund beeinträchtigen Veränderungen in der Aktivität oder Expression der NOS unter pathophysiologischen Bedingungen nicht notwendigerweise die Wirkung von PTHrP bei der Regulation des Koronarflusses. Daher wäre PTHrP beim Vorliegen einer postischämisch auftretenden endothelialen Dysfunktion und somit einer verminderten NO-Freisetzung noch immer in der Lage, den Koronarwiderstand zu senken. Im Zusammenhang mit der vermehrten

Freisetzung vasokonstriktorisch wirkender Autakoide während und nach einer Ischämie scheint PTHrP eine wichtige Rolle in der Kompensation der postischämisch auftretenden endothelialen Dysfunktion und des häufig damit verbundenen Anstiegs des Gefäßwiderstandes („no-reflow“-Phänomen) zuzukommen. Zudem ist eine Beteiligung von PTHrP an der Wiederherstellung der myokardialen Funktion nach einer Ischämie durch seine direkte positiv inotrope Wirkung wahrscheinlich.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die kardiale Freisetzung und die physiologische Relevanz von Parathyroidhormone-related peptide (PTHrP) für die Koronardurchblutung und Herzfunktion an kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte, am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens und in vivo am Schwein untersucht. Die Überprüfung der experimentell gewonnenen Ergebnisse bezüglich des Freisetzungsmechanismus erfolgte anhand einer klinischen Studie bei Kindern mit Atriale Septumdefekt.

Bei PTHrP handelt es sich um ein nahezu ubiquitär im Körper gebildetes Peptidhormon, welches neben anderen gefäßwirksamen Mediatoren u.a. in mikrovaskulären und endokardialen Endothelzellen exprimiert wird und zusätzlich zu einer vasodilatierenden auch eine positiv inotropen Wirkung besitzt. Sowohl der kardiale Freisetzungsmechanismus von PTHrP als auch seine Rolle bezüglich der Koronardurchblutung und Herzfunktion unter physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedingungen waren bisher weitestgehend ungeklärt.

Es konnte gezeigt werden, daß PTHrP von kardialen Endothelzellen freigesetzt wird und diese Freisetzung NO-unabhängig erfolgt. Die Freisetzungsrates wird durch Änderungen des auf die Gefäßwand einwirkenden Drucks moduliert. Auch unter ischämischen Bedingungen war ein Anstieg der PTHrP-Freisetzung zu beobachten. Sowohl für die mechano-sensitive als auch die Ischämie-bedingte Freisetzung ist ein kalziumabhängiger Mechanismus verantwortlich. Die Antagonisierung des endogen freigesetzten PTHrP hatte eine Erhöhung des Koronarwiderstandes bzw. postischämisch eine verzögerte funktionelle Erholung der Herzfunktion zur Folge.

PTHrP ist somit neben NO, PGI₂ und EDHF als ein wichtiger endothelial freigesetzter Mediator mit vasodilatierender Wirkung anzusehen. Durch seine NO-unabhängige Freisetzung wäre PTHrP beim Vorliegen einer postischämisch auftretenden endothelialen Dysfunktion und somit einer verminderten NO-Freisetzung noch immer in der Lage, den Koronarwiderstand zu senken. Somit könnte ihm eine wichtige Rolle in der Kompensation der postischämisch auftretenden endothelialen Dysfunktion und des häufig damit verbundenen Anstiegs des Gefäßwiderstandes zukommen. Zudem scheint es durch seine direkte positiv inotrope Wirkung an der Wiederherstellung der myokardialen Funktion nach einer Ischämie beteiligt zu sein.

7 Summary

In the present study the cardiac release and the physiological relevance of Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) for the coronary blood flow and function of the heart was explored. Experiments were performed in vitro on cultured microvascular endothelial cells, saline perfused rat hearts or in vivo in anesthetized pigs. The results concerning the mechanism of the PTHrP-release were verified by means of a clinical trial of patients with atrial septal defect.

PTHrP is expressed in various mammalian tissues including microvascular and endocardial endothelial cells. Beside its vasodilatory effects PTHrP exerts positive inotropic effects on cardiac myocytes. Both the mechanism of the cardiac release of PTHrP and its importance for the regulation of the coronary blood flow and function of the heart under physiological and pathophysiological conditions are not well understood at the moment.

The present study shows that PTHrP is released from cardiac endothelial cells and that this release is independent of the concentration of NO. The release rate is modulated by changes in pressure acting on the vascular wall. Under ischemic conditions the release of PTHrP was increased as well. Both the mechano-sensitive and the ischemic release of PTHrP depend on the concentration of intracellular calcium. An antagonization of the endogenous released PTHrP resulted in an increase in the coronary resistance respectively a delayed postischemic recovery of heart function.

Therefore PTHrP is among NO, PGI₂ and EDHF an important endothelial released mediator with a vasodilatory effect. Due to its NO-independent release PTHrP is able to decrease the coronary resistance in presence of a postischemic endothelial dysfunction and a decreased NO-release. Therefore PTHrP may act as an important factor in the compensation of the postischemic endothelial dysfunction and increase in the coronary resistance. Moreover PTHrP seems to be involved in the recovery of the myocardial function after an ischemia due to its direct positive inotropic effect.

8 Literatur

Barri ME, Abbas SK, Care AD

The effects in the rat of two fragments of parathyroid hormone-related protein on uterine contractions in situ

Exp Physiol 1992; 77:481-490

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R

Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor

Circulation 1996; 94:3341-3347

Bradford MM

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Anal Biochem 1976; 72:248-254

Brunner F, du Toit EF, Opie LH

Endothelin release during ischaemia and reperfusion of isolated perfused rat hearts

J Mol Cell Cardiol 1992; 24(11):1291-1305

Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski J, et al.

Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy

J Biol Chem 1987; 262(15):7151-7156

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, Debeysey 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

Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, Kunze DL
Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells
Circ Res 1987; 61(5):632-640

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

Deftos LJ, Burton DW, Brandt DW
Parathyroid hormone-like protein (PLP) is a secretory product of atrial myocytes
J Clin Invest 1993; 92:727-735

DeMiguel F, Fiaschi-Taesch N, Lopez-Talavera JC, Takane KK, Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF
The C-terminal region of PTHrP, in addition to the nuclear localization signal, is essential for the intracrine stimulation of proliferation in vascular smooth muscle cells
Endocrinology 2001; 142:4096-4105

Endres DB, Villanueva R, Sharp CF jr, Singer FR
Measurement of parathyroid hormone
Endocrinol Metab Clin North Am 1989; 18:611-629

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

Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I
Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress
Acta Physiol Scand 2000; Jan; 168(1):81-88

Fleming I, Bauersachs J, Busse R
Paracrine functions of the coronary vascular endothelium
Mol Cell Biochem 1996; Apr 12-26; 157(1-2):137-145

Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG, Ives CL
Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells
Science 1985; 227:1477-1479

Fuller A

Case records of the Massachusetts General Hospital (case 27461)
N Engl J Med 1941; 225:789-791

Gaine SP, Hales MA, Flavahan NA

Hypoxic pulmonary endothelial cells release a diffusible contractile factor distinct from endothelin
Am J Physiol 1998; 274:L657-L664

Grover GJ, Sleph PG, Fox M, Trippodo NC

Role of endothelin-1 and big endothelin-1 in modulating coronary vascular tone, contractile function, and severity of ischaemia in rat hearts
J Pharmacol Exp Ther 1992; 263:1074-1082

Gutman AB, Tyson TL, Gutman EB

Serum calcium, inorganic phosphorus and phosphatase activity in hyperparathyroidism, paget's disease, multiple myeloma and neoplastic disease of bones
Archives of internal medicine 1936; 57:379-413

Hanada T, Hashimoto M, Nosaka S, Sasaki T, Nakayama K, Masumura S, Yamauchi M, Tamura K

Shear stress enhances prostacyclin release from endocardial endothelial cells
Life Sci 2000; 66(3):215-220

Harvey S, Fraser RA

Parathyroid hormone: neural and neuroendocrine perspectives
J Endocrinol 1993; 139:353-361

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

Hoare SRJ, Bonner TI, Usdin TB

Comparison of rat and human parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation: PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor
Endocrinology 1999; 140(10):4419-4425

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; 238:1566-158

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

Jansen J, Gres P, Umschlag C, Heinzel FR, Degenhardt H, Schlüter KD, Heusch G, Schulz R

Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs

Am J Physiol 2003; 284(1):H49-H55

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

Karaplis AC, Kronenberg HM

Physiological roles for parathyroid hormone-related protein: lessons from gene knockout mice

Vitam Horm 1996; 52:177-193

Kourembanas S, Masden PA, McQuillan LP, Faller DV

Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium

J Clin Invest 1991; 88:1054-1057

Kovacs CS, Kronenberg HM

Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium and lactation

Endocr Rev 1997; 18:832-872

Lanske B, Karaplis AC, Lee K, et al.

PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth

Science 1996; 273:663-666

Lanske B, Amling M, Neff L, Guiducci J, Baron R, Kronenberg HM

Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development

J Clin Invest 1999; 104(4):399-407

Maclsaac RJ, Heath JA, Rodda CP, Moseley JM, Care AD, Martin TJ, Caple IW

Role of fetal parathyroid glands and parathyroid hormone-related protein in the regulation of placental transport of calcium, magnesium and inorganic phosphate

Reprod Fertil Dev 1991; 3(4):447-457

Martin TJ, Moseley JM, Gillespie MT

Parathyroid hormone-related protein: biochemistry and molecular biology

Crit Rev Biochem Mol Biol 1991; 26(3-4):377-395

Massfelder T, Parekh N, Endlich K, Saussine C, Steinhausen M, Helwig JJ
Effect of intrarenally infused parathyroid hormone-related protein on renal blood flow and glomerular filtration rate in the anaesthetized rat
Br J Pharmacol 1996; 118:1995-2000

Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, Stewart AF
Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for a nuclear targeting
Proc Natl Acad Sci 1997; 94(25):13630-13635

Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, et al.
Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line
Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84:5048-5052

Muhs A, Noll T, Piper HM
Vinculin phosphorylation and barrier failure of coronary endothelial monolayers under energy depletion
Am J Physiol 1997; 273:H608-H617

Nakayama T, Ohtsuru A, Enomoto H, Namba H, Ozeki S, Shibata Y, Yokota T, Nobuyoshi M, Ito M, Sekine I
Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides
Biochem Biophys Res Commun 1994; 200:1028-1035

Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, DiPette DJ, Asimakis GK
Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor
Endocrinology 1989; 125(2):834-841

Noda M, Katoh T, Takuwa N, Kumada M, Kurokawa K, Takuwa Y
Synergistic stimulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells
J Biol Chem 1994; 269:17911-17917

Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM
Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers
Am J Physiol 1995; 268:H1462-H1470

Ogino K, Burghoff D, Bilezikian JP
The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related 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, Bilezikian 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

Orloff JJ, Kats Y, Urena P, et al.
Further evidence for a novel receptor for amino-terminal parathyroid hormone-related protein on keratinocytes and squamous carcinoma cell lines
Endocrinology 1995; 136(7):3016-3023

Osanai T, Fujita N, Fujiwara N, Nakano T, Takahashi K, Guan W, Okumura K
Cross talk of shear-induced production of prostacyclin and nitric oxide in endothelial cells
Am J Physiol 2000; 278:H233-H238

Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM
Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation
J Cell Biol 1986; 102:343-352

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

Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krützfeld A, Watanabe H
Microvascular endothelial cells from heart
In: Cell Culture Techniques in Heart and Vessels Research, ed. von HM Piper
Springer Verlag, Heidelberg, 1990; 158-177

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

Pirola CJ, Wang HM, Strgacich MI, Kamyar A, Cercek B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA
Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein gene expression in vivo and in vitro
Endocrinology 1994; 134:2230-2236

Popp R, Fleming I, Busse R
Pulsatile stretch in coronary arteries elicits release of endothelium-derived hyperpolarizing factor: a modulator of arterial compliance
Circ Res 1998; Apr 6; 82(6):696-703

- Powell D, Singer FR, Murray TM, Minkin C, Potts JT jr
Nonparathyroid humoral hypercalcemia with neoplastic diseases
N Engl J Med 1973; 289:176-181
- Quian J, Lorenz JN, Maeda S, Sutcliff RL, Weber C, Nakayama T, Colbert MC, Paul RJ, Fagin JA, Clemens TL
Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle
Endocrinology 1999; 140(4):1826-1833
- 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
- Riggs BL, Arnaud CD, Reynolds JC, Smith LH
Immunologic differentiation of primary hyperparathyroidism from hyperparathyroidism due to nonparathyroid cancer
J Clin Invest 1971; 50:2079-2083
- Rosales OR, Isales CM, Barrett PQ, Brophy C, Sumpio BE
Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Ca^{2+} concentration through mobilizing of intracellular and extracellular pools
Biochem J 1997; 326:385-392
- Rubin DA, Jüppner H
Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide
J Biol Chem 1999; 274(40):28185-28190
- Rubio R, Ceballos G, Suarez J
Coronary flow stimulates auricular-ventricular transmission in the isolated perfused guinea pig heart
Am J Physiol 1995; 269:H1177-H1185
- Saussine C, Massfelder T, Parnin F, Judes C, Sime U, Helwig JJ
Renin stimulating properties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney
Kidney Int 1993; 44:764-773
- Schlüter KD, 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 KD, 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

Simpson EL, Mundy GR, D'Souza SM, Ibbotson KJ, Bockman R, Jacobs JW
Absence of parathyroid hormone messenger RNA in nonparathyroid tumors associated with hypercalcemia
N Engl J Med 1983; 309(6):325-330

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

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

Stewart AF, Insogna KL, Goltzman D, Broadus AE
Identification of adenylate cyclase-stimulating activity and cytochemical glucose-6-phosphate dehydrogenase-stimulating activity in extracts of tumors from patients with humoral hypercalcemia of malignancy
Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80(5):1454-1458

Strewler GJ, Nissenson RA
Nonparathyroid hypercalcemia
Adv Intern Med 1987; 32:235-258

Strewler GJ, Stern P, Jacobs J, et al.
Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells structural and functional homology with parathyroid hormone
J Clin Invest 1987; 80:1803-1807

Trizna W, Edwards RM
Relaxation of renal arterioles by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein
Pharmacology 1991; 42:91-96

Usdin TB, Gruber C, Bonner TI
Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor
J Biol Chem 1995; 270(26):15455-1458

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

Usdin TB, Hoare SRJ, Wang T, Mezey É, Kowalak JA
TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus
nature neuroscience 1999; 2(11):941-943

Usdin TB
The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide-receptor system
TiPS 2000; 21:128-130

- Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV
Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition
Am J Cardiol 1995; 76:3E-12E
- Wang W, Diamond SL
Does elevated nitric oxide production enhance the release of prostacyclin from shear stressed aortic endothelial cells?
Biochem Biophys Res Commun 1997; 233(3):748-751
- Winqvist RJ, Baskin EP, Vlasuk GP
Synthetic tumor-derived human hypercalcemic factor exhibits parathyroid hormone-like vasorelaxation in renal arteries
Biochem Biophys Res Commun 1987; 149:227-232
- Woditsch I, Schrör K
Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia
Am J Physiol 1992; 263:H1390-H1396
- Wolzt M, Schmetterer L, Dorner G, Zelger G, Entlicher J, Kapiotis S, Eichler HG
Hemodynamic effects of parathyroid hormone-related peptide-(1-34) in humans
J Clin Endocrinol Metab 1997; 82(8):2548-2551
- Wu S, Pirola CJ, Green J, Yamaguchi DT, Okano K, Jüppner H, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL
Effects of N-terminal, midregion and C-terminal parathyroid hormone-related peptides on adenosine 3',5'-mono-phosphate 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, Zhou 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 Acad 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
- Yamamoto S, Morimoto I, Yanagihara N, Zeki K, Fujihira T, Izumi F, Yamashita H, Eto S
Parathyroid hormone-related peptide-(1-34) induces vasopressin release from the rat supraoptic nucleus in vitro through a novel receptor distinct from a type I or type II PTH/PTHrP receptor
Endocrinology 1997; 138:2066-2072

Yates AJP, Gutierrez GE, Smolens P, et al.

Effects of a synthetic peptide of a parathyroid hormone-related protein on calcium homeostasis, renal tubular calcium reabsorption and bone metabolism

J Clin Invest 1988; 81:932-938

Ziegelstein RC, Cheng L, Aversano T, Ouyang P, Lakatta EG, Silverman HS

Increase in rat aortic endothelial free calcium mediated by metabolically sensitive calcium release from endoplasmic reticulum

Cardiovasc Res 1994; 28(9):1433-1439

Zondek H, Petrow H, Siebert W

Die Bedeutung der Kalziumbestimmung im Blute für die Diagnose der Niereninsuffizienz

Z Klin Med 1924; 99:129-132

9 Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter nicht nur für die Anregung zu dieser Arbeit, sondern insbesondere auch für seine ständige Gesprächsbereitschaft und seine stets positive Sicht der Dinge,

Herrn Prof. Dr. M. Diener für die unkomplizierte Betreuung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin,

Prof. Dr. Dr. H.M. Piper für konstruktive Kritik und darüberhinaus fast mehr für seine philosophischen als für seine physiologischen Ansätze,

Prof. Dr. R. Schulz und J. Jansen aus dem Institut für Pathophysiologie des Universitätsklinikums Essen und PD Dr. J. Kreuder aus der Kinderklinik des Universitätsklinikums der JLU für die interessante und konstruktive Zusammenarbeit,

allen Technischen Assistenten des Physiologischen Institutes für die freundliche Einarbeitung und ihre Hilfsbereitschaft nicht nur in methodischen Belangen

und den anderen Doktoranden des Physiologischen Institutes vor allen Dingen für ihr reges Interesse an außeruniversitären Aktivitäten, welches dem zügigen Fortgang dieser Arbeit zwar wenig dienlich war, aber erheblich dazu beitrug, daß das Leben seinen Namen verdiente.