

PARATHYROID HORMONE-RELATED PEPTIDE (PTHrP) IM KARDIOVASKULÄREN SYSTEM

ALEXANDRA SPIES

INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

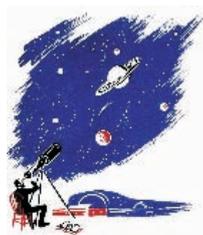
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

aus dem Physiologischen Institut
Fachbereich Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Parathyroid Hormone-related Peptide (PTHrP) im kardiovaskulären System

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

Alexandra Spies, geb. Dolf

Tierärztin aus Zürich/CH

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth
Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 07.März 2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	6
1.1. Geschichte	6
1.2. Allgemeines / PTHrP – ein vielseitiges Peptidhormon.....	7
1.2.1. PTH/PTHrP-Rezeptoren	9
1.2.2. Biologische Effekte von PTHrP	11
1.3. PTHrP im kardiovaskulären System.....	14
1.4. Fragestellung	17
2. Material.....	18
2.1.1. Primer	19
2.2. Geräte	19
2.2.1. Allgemein verwendete Geräte/ Gebrauchsgegenstände.....	19
2.2.2. Spezielle Geräte.....	19
2.3. Verbrauchsmaterial	20
2.4. Tierbedarf.....	20
2.5. EDV.....	20
3. Methoden	21
3.1. Perfusion isolierter Rattenherzen	21
3.1.1. Grundlagen der Perfusion isolierter Rattenherzen	21
3.1.2. Aufbau der LANGENDORFF Anlage.....	21
3.1.3. Präparation der isolierten Herzen.....	23
3.1.4. Versuche	24
3.1.4.1. Versuche unter flusskonstanten Bedingungen.....	24
3.1.5. Erfassung der physiologischen Parameter.....	25
3.2. Perfusion eines Duodenumsegments der Ratte.....	26
3.2.1. Aufbau der Perfusionsanlage.....	26
3.2.2. Versuchstiere	27
3.2.3. Präparation des Darms	27
3.2.4. Versuche	27
3.3. Perfusion isolierter Mäuseherzen.....	28
3.3.1. LANGENDORFF – Anlage	28

3.3.2.	Versuchstiere	28
3.3.3.	Genotypisierung der Mäuse	29
3.3.3.1.	DNA - Gewinnung	29
3.3.3.2.	PCR – Analyse.....	29
3.3.3.3.	Genotyp – Identifizierung	31
3.3.4.	Präparation der Mäuseherzen.....	32
3.3.5.	Versuche	32
3.3.6.	Erfassung der physiologischen Parameter.....	33
3.4.	Statistik.....	33
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Untersuchung an isoliert perfundierten Rattenherzen	34
4.1.1.	Vasodilatation durch PTHrP	34
4.1.2.	Wiederholte Applikation von PTHrP	35
4.1.2.1.	Konzentrationswirkungskurve bei wiederholter Applikation von PTHrP	37
4.1.2.2.	Perfusion mit PTHrP(7-34) und PTHrP(1-34).....	39
4.1.2.3.	Perfusion mit Isoprenalin und PTHrP	41
4.1.2.4.	Kinetik der Vasokonstriktion durch PTHrP	43
4.1.3.	Vasokonstriktion durch PTHrP	45
4.1.3.1.	Konzentrationsabhängigkeit der Vasokonstriktion	45
4.1.3.2.	Applikation von PTHrP(7-34) nach Vorbehandlung mit PTHrP(1-34)	48
4.1.3.3.	Applikation von Isoprenalin nach Vorbehandlung mit PTHrP(1-34)	50
4.1.3.4.	Perfusion mit (Trp ²³ , Tyr ³⁶) PTHrP(1-36) und TIP39	51
4.1.3.5.	Perfusion mit PD142893	53
4.1.3.6.	Applikation von PTHrP und Captopril.....	56
4.1.4.	Perfusion mit PTH.....	57
4.1.4.1.	Perfusion mit PTH und PTHrP	57
4.1.4.2.	Perfusion mit PTHrP und PTH	59
4.1.4.3.	Wiederholte Applikation von PTH	61
4.2.	Untersuchung an isoliert perfundierten Mäuseherzen	63
4.2.1.	Applikation von PTHrP	63
4.2.1.1.	Beispielversuch.....	63

4.2.1.2.	Wirkung von PTHrP	64
4.3.	Untersuchung an Duodenumsegmenten der Ratte	65
4.3.1.	einmalige Applikation von PTHrP	66
4.3.2.	Wiederholte Applikation von PTHrP	66
4.3.3.	Vorbehandlung mit PTHrP(7-34).....	67
5.	Diskussion	69
5.1.	Hauptbefunde.....	69
5.2.	Desensibilisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors	69
5.3.	Desensibilisierung und Paradoxie bedürfen eines intakten N- Terminus des PTHrP	70
5.4.	β -adrenerge Stimulation kann PTHrP nicht imitieren	71
5.5.	Paradoxe Effekt nicht PTH2R abhängig.....	72
5.6.	Paradoxe Effekt nicht Endothelin-vermittelt	72
5.7.	Paradoxe Effekt ist durch ACE-Hemmer nicht aufhebbar	73
5.8.	Keine Desensibilisierung und Paradoxie durch PTH.....	74
5.9.	Perfusion isolierter Mäuseherzen.....	75
5.10.	Keine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die glatte Muskulatur des Darms	76
5.11.	Schlussfolgerung	77
6.	Zusammenfassung.....	79
7.	Summary	80
8.	Literaturverzeichnis	81
9.	Anhang	97
9.1.	Veröffentlichung	97
9.2.	Poster.....	97
9.3.	Erklärung.....	98
9.4.	Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
aqua bidest.	aqua bidestilata
cAMP	3'5'-Cyclo-Adenosinmonophosphat
Ck-BB	Kreatinkinase BB
DiasP	diastolischer Druck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDHF	Endothelium-derived Hyperpolarising Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	E Nitric Oxid Synthase
HE	heterozygot eNOS ^{+/-}
HF	Herzfrequenz
HO	homozygot eNOS ^{-/-}
L-NA	N _ω -Nitro-L-Arginin
LVDP	linksventrikulär entwickelter Druck
MAH	malignancy associated hypercalcemia
MAP-Kinase	mitogen activated protein Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NLS	nuclear localization sequence / nukleäre Kernlokalisationssequenz
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PerfPres	Perfusionsdruck
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTH	Parathormon
PTH1R	PTH1-Rezeptor
PTH2R	PTH2-Rezeptor
PTH2RAG	PTH2-Rezeptorantagonist
PTH3R	PTH3-Rezeptor
PTHrP	parathyroid hormone related peptide
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Stab	Stabilisierung
SysP	systolischer Druck
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TIP 39	Tuberoinfundibular peptide of 39 residues
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
WT	Wildtyp eNOS ^{+/+}
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Geschichte

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde erstmalig eine Form der Hyperkalzämie beschrieben, welche bei Patienten in Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung auftrat (ZONDEK et al. 1924; GUTMAN et al. 1936). Diese Hyperkalzämie wird als „malignancy associated hypercalcemia“ (MAH) bezeichnet und ist eines der häufigsten paraneoplastischen Syndrome. Etwa 40% aller Hyperkalzämien beruhen auf MAH (MEYER-HEIM und STÄUBLI 2002). Ursprünglich wurde sie auf lokale osteolytische Prozesse zurückgeführt. Dagegen sprach aber, dass MAH sowohl bei Patienten auftrat, bei denen keine Knochenmetastasen (GELLHORN und PLIMPTON 1956) nachweisbar waren, als auch in vielen Fällen verschwand nachdem der knochenferne Primärtumor entfernt worden war.

FULLER vermutete 1941, dass die Ursache der MAH in einem ektopischen Hyperparathyroidismus liege, der auf einen humoralen Faktor zurückzuführen sei. Er nahm an, dass dieser Faktor vom Tumor selbst gebildet und in das Blut abgegeben werden müsse. FULLER ging davon aus, dass es sich bei diesem Faktor um das Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckte Parathormon (PTH) oder eine ähnliche Substanz handeln müsse (FULLER 1941). In den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts konnte jedoch nachgewiesen werden, dass PTH als Auslöser der MAH ausscheiden musste, da die Mehrzahl der an MAH erkrankten Patienten erniedrigte oder nicht nachweisbare PTH – Spiegel aufwies und die Tumoren PTH auf mRNA-Ebene nicht exprimierten (ENDRES et al. 1989; SIMPSON et al. 1983).

Nach fast 40 jähriger Suche gelang es 1987 schließlich drei voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen ein Protein aus Tumorzellen zu isolieren, welches an Knochen und Nieren die Wirkungsweise von PTH zu imitieren vermochte (BURTIS et al. 1987; STREWLER et al. 1987; MOSELEY et al. 1987). Aufgrund dieser Tatsache und da dieses Protein eine hohe strukturelle Homologie in der N-terminalen Aminosäuresequenz im Vergleich mit PTH aufweist, wurde es als „parathyroid hormone-related peptide“ (PTHrP) bezeichnet.

Schließlich konnten KUBOTA et al. 2002 zeigen, dass auch bei Tumorerkrankungen des Hundes, welche mit einer Hyperkalzämie einhergehen, erhöhte PTHrP-Konzentrationen im Plasma nachweisbar sind (KUBOTA et al. 2002). Auch bei der Katze scheinen tumoröse Veränderungen, vor allem Karzinome, PTHrP freizusetzen und damit eine Hyperkalzämie auszulösen (BOLLIGER et al. 2002).

1.2. Allgemeines / PTHrP – ein vielseitiges Peptidhormon

Kurz nach der Entdeckung von PTHrP wurde bereits deutlich, dass es sich in vielen Merkmalen von PTH unterscheidet. PTH ist ein Peptidhormon, welches von der Nebenschilddrüse exprimiert und freigesetzt wird. Es spielt eine wichtige Rolle im systemischen Kalziumhaushalt. Klassische Zielzellen sind Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten des Knochengewebes, sowie die Tubuluszellen der Nieren. PTH führt hier zu einer intrazellulären Zunahme von 3',5'-Cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP). Nicht-klassische Zielzellen finden sich im Blut (Erythrozyten und Lymphozyten), in der Leber, den Glattmuskelzellen, den Schrittmacherzellen und den Herzmuskelzellen (SCHLÜTER 1999).

Im Gegensatz zu PTH ist PTHrP unter physiologischen Bedingungen im Blut nicht nachweisbar, wird jedoch auf parakrinem, bzw. autokrinem Wege nahezu ubiquitär, sowohl in normalem als auch in bösartigem Gewebe, freigesetzt. Dazu gehören Epithelzellen, mesenchymales Gewebe, das zentrale Nervensystem (ZNS), endokrine Drüsen, das kardiovaskuläre System und Organe mit einem hohen Anteil an glatter Muskulatur, wie z.B. Darm und Blase (CLEMENS et al. 2001a; YAMAMOTO et al. 1992; MOK et al. 1989a). Unter pathologischen Bedingungen, zum Beispiel bei der MAH, kommt es auch systemisch zu einer Freisetzung von PTHrP als endokrinem Faktor.

Trotz ihrer Ähnlichkeit in der N-terminalen Aminosäuresequenz und ihrer kalziotropen Fähigkeiten werden PTH und PTHrP von zwei unterschiedlichen Genen, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, kodiert. Dabei ist das PTHrP kodierende Gen deutlich komplexer als das PTH-Gen. Während sich letzteres aus nur drei Exons zusammensetzt, besitzt das PTHrP-Gen des Menschen neun Exons, aus welchem unter der Kontrolle von drei unterschiedlichen Promotoren durch

alternatives Splicing bis zu zwölf verschiedene Transkripte und drei unterschiedlich lange initiale Translationsprodukte entstehen können (SOUTHBY et al. 1996; CLEMENS et al. 2001a). Welche dieser drei Isoformen (PTHrP 1-139, 1-141 und 1-173) freigesetzt wird, ist gewebsspezifisch. Hingegen entsteht bei Huhn, Maus und Ratte jeweils nur eine Form des PTHrP, welches sich bei der Ratte aus 141 Aminosäuren und bei Maus und Huhn aus 139 Aminosäuren zusammensetzt. Distal von Aminosäure 111 bestehen speziesspezifisch große Unterschiede, davor jedoch sind die Sequenzen bis auf zwei Ausnahmen identisch (MARTIN et al. 1991).

Beim Menschen erfolgt die Freisetzung, wie auch bei anderen Spezies, größtenteils in glykosilierter Form. Durch Mitglieder der Prohormon–Convertase–Familie werden diese initialen Translationsprodukte in verschiedene, aktive Teilpeptide gespalten.

Beim Menschen sind drei aktive Fragmente bekannt: ein N–terminales (PTHrP 1-36), ein mittregionales (PTHrP 38–94) und ein C–terminales Fragment (PTHrP 107–139) (BURTIS et al. 1992; ORLOFF et al. 1993; SOIFER et al. 1992). Letzteres wird aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf die Knochenresorption auch als Osteostatin bezeichnet (FENTON et al. 1991). Für ein weiteres C-terminales Fragment, PTHrP (141-173) ist bisher keine biologische Wirkung bekannt.

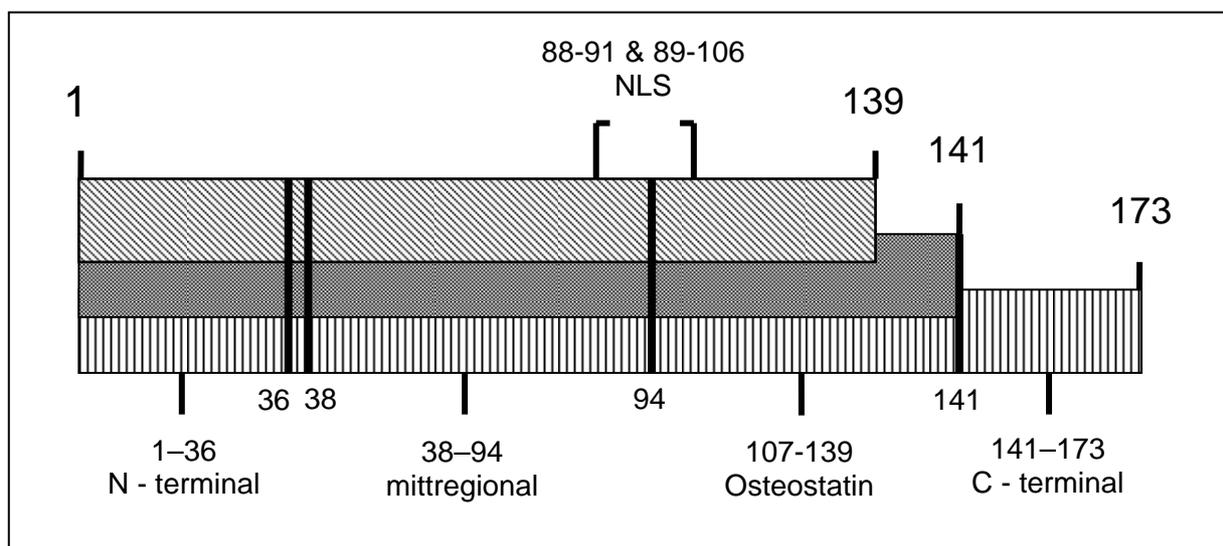


Abb.1.1: Schematische Darstellung der drei PTHrP–Isoformen (PTHrP 1-139, 1-141, 1-173) die durch alternatives Splicing entstehen, sowie der drei bekannten aktiven Teilpeptide (PTHrP 1-36, 38-94, 107-139); NLS steht für Nuclear Localization Sequence/nukleäre Kernlokalisationssequenz (siehe Text)

1.2.1. PTH/PTHrP-Rezeptoren

PTH und PTHrP weisen zwischen den ersten 34 Aminosäuren eine begrenzte Homologie auf. Dabei ist die Homologie zwischen den Aminosäuren 1-13 sehr groß und nimmt danach deutlich ab. Da in diesem Abschnitt (Aminosäuren 1-34) sowohl die Bindungsdomäne, als auch der Bereich zur Aktivierung des Rezeptors liegen, wird hierdurch deutlich, wieso beide Peptide mit gleicher Affinität an einen Rezeptor binden können. Dieser gemeinsame PTH/PTHrP-Rezeptor wird als PTH1-Rezeptor (PTH1R) bezeichnet (JÜPPNER et al. 1991).

Der PTH1R gehört zu einer Untergruppe heptahelikaler, G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, zu der auch die Rezeptoren von Sekretin, Calcitonin, Glukagon und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) gehören (JÜPPNER 1999; GENSURE et al. 2005). Ein typisches Merkmal für diese Klasse-II-Rezeptoren ist die relativ lange, extrazelluläre N-terminale Domäne, die sich aus etwa 150 Aminosäuren zusammensetzt und wichtig für die Ligandenbindung ist (GENSURE et al. 2005). Der PTH1R wird besonders stark in Nieren und Knochen exprimiert, wo er die klassischen Effekte von PTH und PTHrP, nämlich die kalziotrope Wirkung, vermittelt. Eine Expression findet man jedoch auch in zahlreichen anderen Gewebetypen, wo er zur Vermittlung der parakrinen und autokrinen Effekte von lokal gebildetem PTHrP dient (CLEMENS et al. 2001a). Bei einer Aktivierung kommt es zur Stimulierung der Adenylatzyklase, was zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration und damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase A führt (cAMP/PKA-Signalweg). Eine weitere Möglichkeit der Signalübermittlung besteht in der Aktivierung der Phospholipase C und der Proteinkinase C (PLC/PKC-Signalweg), jedoch werden die meisten bisher identifizierten Effekte durch eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs vermittelt (GARDELLA und JÜPPNER 2000). Das PTH1R-Protein ist glykosiliert und unterliegt Agonisten-abhängig einer Phosphorylierung des intrazellulären, C-terminalen Abschnitts. Diese Modifizierung ist möglicherweise ein wichtiger Bestandteil der Rezeptor-Downregulierung und der Rezeptordesensibilisierung (JÜPPNER 1999).

Ein weiterer Rezeptor, welcher PTH *in vitro* bindet, ist der von USDIN et al. 1995 entdeckte PTH2-Rezeptor (PTH2R) (USDIN et al. 1995). Er ist eng mit dem PTH1R verwandt und weist eine 51%ige Homologie der Aminosäuren auf. Jedoch kann PTHrP weder an diesen Rezeptor binden noch ihn aktivieren (USDIN 1997). Wie der PTH1R wird auch der PTH2R in vielen Organen und Geweben exprimiert. So konnte

er im Pankreas und auch in vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden, aber die größte Expression findet sich im Gehirn, so dass eine andere Funktion als die Regulierung des Kalziumhaushalts nahe liegt (GENSURE et al. 2005; CLEMENS et al. 2001a; USDIN et al. 1996).

Die Fähigkeit von PTH an den PTH2 Rezeptor zu binden und ihn zu aktivieren ist speziesabhängig, so vermag PTH den PTH2R der Ratte kaum zu aktivieren (HOARE et al. 1999). Daraus und aus der Erkenntnis, dass sich aus dem Gehirn zwar PTH2R-mRNA, jedoch keine (HOARE et al. 1999) oder nur geringe Mengen (USDIN 1997; HARVEY und FRASER 1993) PTH-mRNA isolieren ließen, entstand die Vermutung, dass es einen anderen Liganden für den PTH2 Rezeptor geben müsse. 1999 konnten USDIN et al. aus dem bovinen Hypothalamus ein Protein isolieren, welches eine geringe strukturelle Homologie mit PTH und PTHrP aufweist und als Tuberoinfundibular peptide of 39 residues, kurz TIP39, bezeichnet wurde (USDIN et al. 1999). TIP39 aktiviert selektiv den PTH2 Rezeptor und somit den Adenylatzyklase-Signalweg deutlich potenter als PTH, so dass TIP39 vermutlich als primärer Ligand des PTH2R anzusehen ist (USDIN 2000).

Ein weiterer Rezeptor, der PTH3R, konnte 1999 von RUBIN et al. beim Zebrafisch nachgewiesen werden, wobei sich zeigte, dass dieser Rezeptor vornehmlich mit PTHrP interagiert (RUBIN und JÜPPNER 1999). Sowohl der PTH1-Rezeptor als auch der PTH2-Rezeptor des Zebrafisches weisen ähnliche funktionelle Eigenschaften auf wie die entsprechenden Rezeptoren der Säugetiere (JÜPPNER 1999). Da es auch bei Säugetieren Hinweise auf einen Rezeptor gibt, dessen hauptsächlicher Ligand das PTHrP ist (YAMAMOTO et al. 1997; YAMAMOTO et al. 1998), liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um ein Äquivalent des PTH3R des Zebrafisches handelt (JÜPPNER 1999).

Weiterhin gibt es Hinweise auf Rezeptoren für die C-terminalen und mittregionalen Fragmente des PTHrP. So konnte ein skelettaler C-terminaler PTHrP-Rezeptor nachgewiesen werden und auch andere C-terminal spezifische Rezeptoren scheinen zu existieren. Auch in Bezug auf die mittregionalen PTHrP Fragmente gibt es Hinweise für die Existenz spezifischer Rezeptoren. Es gilt jedoch sowohl für die C-terminalen Fragmente als auch für die mittregionalen Fragmente, dass über den Aufbau und die Signalwege der entsprechenden Rezeptoren nur wenig bekannt ist (CARE et al. 1990; DIVIETI et al. 2005).

1.2.2. Biologische Effekte von PTHrP

In allen bisher untersuchten Geweben haben die unterschiedlichen Fragmente des PTHrP regulatorische Einflüsse auf Entwicklung, Differenzierung und Wachstum.

In den klassischen PTH-Zielzellen in Knochen und Niere vermag PTHrP die Effekte des N-terminalen Abschnitts von PTH in Bezug auf die Kalziumregulation zu imitieren. So löst PTHrP in der Niere einen Anstieg der Kalziumrückresorption und der Phosphorexkretion aus. Durch eine vermehrte Bildung von 1,25-Dihydroxycholecalciferol aus 22-Hydroxycholecalciferol und durch eine Stimulierung der Knochenresorption nimmt PTHrP(1-34) auch indirekten Einfluss auf die Kalziumregulation (YATES et al. 1988; STREWLER et al. 1987; HORIUCHI et al. 1987).

Im Knochen inhibieren C-terminale Fragmente von PTHrP die Resorption durch Osteoklasten und nehmen so ebenfalls Einfluss auf den Kalziumhaushalt. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch das Osteostatin, PTHrP (107-139), vermittelt, wobei ein anderer Signalweg als bei Calcitonin angenommen wird, da in den Osteoklasten kein Anstieg von cAMP nachgewiesen werden kann (FENTON et al. 1991; CORNISH et al. 1997). Weiterhin stimulieren C-terminale PTHrP-Fragmente Proliferation und Wachstum von Osteoblasten, was gemeinsam mit der Hemmung der Osteoklastenaktivität eine wichtige Regulation der Knochenzellfunktionen und womöglich auch der Knochenmasse darstellt (CORNISH et al. 1999).

Zusätzlich zu der erwähnten Beeinflussung der Knochenresorption und des Knochenaufbaus ist PTHrP auch an der Chondrozytenproliferation und -differenzierung und dadurch an der enchondralen Knochenformation beteiligt (KARAPLIS et al. 1994; LANSKE et al. 1996).

ENDLICH et al. zeigten 1995, dass PTHrP (1-36) in der Niere zu einer Dilatation der präglomerulären Gefäße und somit zu einer Zunahme des glomerulären Blutflusses führt (ENDLICH et al. 1995). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei Ratten der renale Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate und die Diurese durch eine intrarenale Applikation von PTHrP gesteigert werden (MASSFELDER et al. 1996). Auch beim Menschen scheint PTHrP zu den potentesten Vasodilatoren der Niere zu gehören (WOLZT et al. 1997). PTHrP gehört also zu den vasoaktiven

Stoffen, die den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate durch Beeinflussung des renalen Gefäßdrucks und der Reninfreisetzung regulieren (CLEMENS et al. 2001a).

Auch während der Trächtigkeit und in der Plazenta spielen N-terminale und mittregionale Fragmente von PTHrP eine große Rolle. Dazu gehören die Relaxation glatter Muskulatur im Uterus, eine Dilatation der Blutgefäße im Uterus, die Regulation des Kalziumtransfers in der Plazenta, sowie die normale fetale Entwicklung (CLEMENS et al. 2001a).

PTHrP – , bzw. PTH1R – Gen knockout Mäuse, die in utero oder bei der Geburt sterben, geben Hinweise auf eine Beteiligung von PTHrP in der normalen Entwicklung (KARAPLIS et al. 1994; LANSKE et al. 1996). Dabei hat PTHrP großen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung, vor allem bei Knochen- und Mammagewebe, sowie bei zahlreichen anderen Gewebetypen (STREWLER 2000; WYSOLMERSKI und STEWART 1998).

Weiterhin ist bekannt, dass PTHrP den plazentaren Kalziumtransport stimuliert. Im fetalen Kreislauf ist die Kalziumkonzentration in der Regel höher als im maternalen Kreislauf, wobei sowohl PTHrP als auch PTH großen Einfluss darauf nehmen. Der Fetus befindet sich also dem Muttertier gegenüber in einem hyperkalzämischen Zustand (KOVACS und KRONENBERG 1997). Es wird vermutet, dass dieser Effekt durch das mittregionale Fragment, PTHrP (67-86), vermittelt wird (CARE et al. 1990).

In der glatten Muskulatur werden Effekte von PTHrP über den PTH1R vermittelt. Bei der Ratte verhindern N-terminale Fragmente von PTHrP die Acetylcholin-vermittelte Kontraktion der glatten Uterusmuskulatur (BARRI et al. 1992). MOK et al. und BOTELLA et al. konnten zeigen, dass PTH und PTHrP über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und der Proteinkinase A eine Relaxation der intestinalen glatten Muskulatur induzieren (BOTELLA et al. 1994; MOK et al. 1989a). Außerdem bewirkt PTHrP über eine Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur eine Vasodilatation. Auch dieser Effekt wird über den PTH1 Rezeptor vermittelt (CLEMENS et al. 2001a).

Organsystem	Funktion von PTHrP
Niere	Regulation des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate Regulation der Reninfreisetzung Regulation des Kalzium- & Phosphorhaushalts
Knochen	Beeinflussung der Knochenresorption Enchondrale Knochenformation Regulation des Kalziumhaushalts
glatte Muskulatur	Relaxation der glatten Muskulatur des Urogenitaltrakts, des Gefäßsystems und des Intestinaltrakts
Uterus/Plazenta	Relaxation der glatten Uterusmuskulatur Dilatation der Blutgefäße Regulation des Kalziumtransfers in der Plazenta
Fetus	Fetales Wachstum und Differenzierung Entwicklung der Knochen, des Mammagewebes und des kardiovaskulären Systems

Tabelle 1.1: Physiologische Funktionen von PTHrP

Wie bereits erwähnt, zirkuliert PTHrP unter physiologischen Bedingungen kaum im Blut. Die meisten Effekte werden also von lokal produziertem PTHrP über auf der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren vermittelt. Es wurden jedoch auch Wirkungen nachgewiesen, die auf intrakrinen Mechanismen beruhen. 1991 zeigten ROBBINS et al. das PTHrP zwei nukleäre Kernlokalisationssequenzen (Nuclear Localization Sequence, NLS; siehe Abb.1.1) besitzt (ROBBINS et al. 1991). Sie setzen sich aus den Aminosäuren 88-91 und 89-106 zusammen (HENDERSON et al. 1995; MASSFELDER et al. 1997). Bisher sind nicht alle intrakrinen Wirkungen von PTHrP bekannt, jedoch wird eine Beeinflussung zellulärer Mechanismen vermutet (CLEMENS et al. 2001a). Es konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass bei einer nukleären Lokalisation von PTHrP Skelettzellen unter apoptotischen Bedingungen eine höhere Überlebensrate hatten als Kontrollzellen (HENDERSON et al. 1995) und dass bei einer Zellkultur aus vaskulären Glattmuskelzellen die Proliferation stimuliert wurde (MASSFELDER et al. 1997).

1.3. PTHrP im kardiovaskulären System

Zahlreiche Studien haben sich mit der blutdrucksenkenden, vasodilatatorischen und kardialen Wirkung von PTH beschäftigt (MOK et al. 1989c), jedoch gab es immer wieder widersprüchliche Fakten, die nicht eindeutig zu erklären waren. So haben Patienten mit einem primären Hyperparathyroidismus häufig einen erhöhten, keinen niedrigen, Blutdruck, der nach Entfernung der Nebenschilddrüse zu Normalwerten zurückkehrt. Erst die Entdeckung von PTHrP 1987 brachte eine Erklärung für das scheinbar widersprüchliche Verhalten von PTH (CLEMENS et al. 2001a).

PTHrP wird in der glatten Muskulatur produziert, wo es die Kontraktilität und die Proliferation beeinflusst. Im kardiovaskulären System wird es sowohl in den Gefäßen, als auch im Herzen selber exprimiert.

In den Blutgefäßen wird PTHrP hauptsächlich in vaskulären Glattmuskelzellen produziert, es konnte aber auch in kultivierten Endothelzellen nachgewiesen werden (RIAN et al. 1994; ISHIKAWA et al. 1994a).

Durch eine Stimulierung mit vasoaktiven Peptiden wie Angiotensin II, Serotonin, Endothelin, Noradrenalin, Bradykinin und Thrombin kommt es zu einer schnellen und transienten Hochregulierung der PTHrP-Expression in den vaskulären Glattmuskelzellen (PIROLA et al. 1993). Auch durch eine Distension der Rattenaorta mit einem Ballonkatheter (DAIFOTIS et al. 1992) und durch mechanische Stimuli (PIROLA et al. 1994; NODA et al. 1994; DEGENHARDT et al. 2002) kann es zu einer Zunahme der PTHrP-Freisetzung kommen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Expression in spontan hypertensiven Ratten ebenfalls hochreguliert ist (NODA et al. 1997).

Über eine Relaxation der Glattmuskelzellen führt PTHrP zu einer Gefäßdilatation und somit zu einer Regulation des lokalen Blutflusses. Diese vasodilatierende Wirkung von PTHrP im Gefäßsystem ist auf eine Aktivierung des PTH1-Rezeptors zurückzuführen, welcher bei Ratten an der Oberfläche vaskulärer Glattmuskelzellen exprimiert wird (NICKOLS et al. 1990). Dabei wirkt PTHrP hauptsächlich über den cAMP/PKA-Signalweg (MASSFELDER und HELWIG 2003). So kommt es bei einer Relaxation einer Aortenpräparation zu einer gesteigerten Ansammlung von cAMP (ISHIKAWA et al. 1994b) und auch die Glattmuskelzellen einer Rattenaorta reagieren auf N-terminale PTHrP-Fragmente mit einer erhöhten cAMP-Produktion (WU et al.

1993). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine durch PTHrP ausgelöste Vasodilatation auch über andere Signalwege vermittelt wird. So konnte an isolierten Endothelzellen aus der bovinen Pulmonalarterie nachgewiesen werden, dass die Freisetzung von NO über den PTH1-Rezeptor vermittelt wird und eine Stimulierung von cAMP und des Kalzium/Calmodulin-Signalwegs beinhaltet. Möglicherweise handelt es sich bei NO also um einen second messenger im PTHrP-Signalweg in Endothelzellen (MASSFELDER und HELWIG 2003; KALINOWSKI et al. 2001). Auch der Endothelium-derived Hyperpolarising Factor (EDHF) scheint in einigen Fällen an einer durch PTHrP ausgelösten Vasodilatation beteiligt zu sein (MASSFELDER und HELWIG 2003).

Im adulten Herzen findet man die höchste PTHrP-Expression in den Vorhöfen und in den kardialen Gefäßen. Die atrialen Kardiomyozyten exprimieren PTHrP (BURTON et al. 1994), im Gegensatz zu den ventrikulären Myozyten, bei denen dies nicht der Fall ist (SCHLÜTER et al. 2000). In koronaren Endothelzellen wird PTHrP wiederum exprimiert (CLEMENS et al. 2001a) und auch in Endothelzellen anderer Lokalisation konnte eine Expression nachgewiesen werden (RIAN et al. 1994). Zu den Zielzellen von PTHrP, sowie auch von PTH, zählen atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten, Endothelzellen, Glattmuskelzellen, sowie Schrittmacherzellen (SCHLÜTER 1999; MASSFELDER und HELWIG 2003).

Am isoliert perfundierten Rattenherzen führt PTHrP zu einer Steigerung der Herzfrequenz (positive Chronotropie) und zu kontraktile Effekten (positive Inotropie), wobei letzteres ein alleiniger Effekt von PTHrP zu sein scheint, der positive chronotrope Effekt aber auch durch PTH herbeigeführt werden kann (NICKOLS et al. 1989; OGINO et al. 1995). Der erwähnte positive inotrope Effekt von PTHrP wird durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase in ventrikulären Kardiomyozyten ausgeübt (NICKOLS et al. 1989; SCHLÜTER et al. 1997). Weiterhin führt PTHrP bei isoliert perfundierten Rattenherzen zu einer deutlicheren Steigerung des koronaren Perfusionsflusses als PTH (NICKOLS et al. 1989).

Koronare Endothelzellen setzen sowohl bei mechanischen Stimuli als auch unter hypoxischen oder unter Energie-verbrauchenden Bedingungen PTHrP frei (SCHLÜTER et al. 2000; DEGENHARDT et al. 2002). Aus den Koronarzellen gewonnenes PTHrP ist, wie bereits erwähnt, glykosiliert und biologisch aktiv. Es übt einen kontraktile Effekt auf isolierte Kardiomyozyten aus, was die Vermutung nahe

legt, dass es sich bei PTHrP um einen aus dem Endothel freigesetzten Regulator der ventrikulären Funktionen handeln könnte (MASSFELDER und HELWIG 2003).

Außerdem ist PTHrP an der Ausbildung einer Herzhypertrophie beteiligt. Das C-terminale Ende des PTHrP weist Charakteristika eines Wachstumsfaktors für adulte Kardiomyozyten auf, da es über die Proteinkinase C zu einer Steigerung der Proteinsynthese, der totalen Proteinmasse und des Zellvolumens führt. Weiterhin fördert PTHrP (107-111), vermittelt über die mitogen activated protein (MAP) Kinase, die Aktivität der fetalen Kreatinkinase-Isoform Kreatinkinase BB (Ck-BB), die bei einer kardialen Hypertrophie reexprimiert wird (SCHLÜTER et al. 1997). Intrakrin übt PTHrP, durch eine Translokation in den Nukleus über seine NLS, einen proliferativen Effekt auf vaskuläre Glattmuskelzellen aus (MASSFELDER und HELWIG 1999; DE MIGUEL et al. 2001). Auf autokrinem/parakrinem Wege hingegen hemmt PTHrP die Proliferation der vaskulären Glattmuskelzellen durch eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs sowie durch eine Blockade des Zellzyklus (STUART et al. 2000).

NYBY et al. konnten 1995 nachweisen, dass eine verlängerte Exposition von PTH oder PTHrP zu einer verminderten Ansprechbarkeit des vaskulären Gewebes gegenüber diesen Peptiden führt. Sie vermuten, dass hierzu eine Stimulierung des Rezeptors mit daraus resultierender Desensibilisierung notwendig ist. Durch die erwähnte Desensibilisierung kommt es zu einer verminderten cAMP-Antwort und, indem die regulierende Wirkung auf den Angiotensin II-Signalweg unterdrückt wird, zu einem Verlust der vasorelaxierenden Eigenschaften von PTH und PTHrP in isolierten Arterien (NYBY et al. 1995). Auch VILARDAGA et al. beobachteten 2001 dass es nach einer Anlagerung des Proteins β -Arrestin an den PTH1R zuerst zu einer Aktivierung und anschließend zu einer Sequestrierung mit darauf folgender Internalisierung kommt (VILARDAGA et al. 2001). Für diese Internalisierung des Rezeptors scheint eine Aktivierung notwendig zu sein, was wiederum eine Aktivierung des PKC- und des PKA- Signalwegs voraussetzt. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass Aktivierung und Internalisierung zellspezifisch vollkommen unabhängig voneinander sein können (SNEDDON et al. 2004).

Auch an der fetalen Entwicklung des kardiovaskulären Systems ist PTHrP vermutlich beteiligt (siehe Tab.1.1). Denn obwohl sich das kardiovaskuläre System in PTHrP-knock-out-Mäusen normal zu entwickeln scheint, kommt es bei einer homologen Deletion des PTH1-Rezeptors zu einer erhöhten fetalen Sterblichkeit. Diese tritt an den Tagen 9-10 der Gravidität auf, an welchen auch die Entwicklung des Herzens und der großen Blutgefäße beginnt (PHILBRICK et al. 1996; CLEMENS et al. 2001b). Transgene Mäuse mit einer Überexpression von sowohl PTHrP als auch vom PTH1R in den vaskulären Glattmuskelzellen sterben am 9.-10. Tag der Trächtigkeit mit deutlich verdünnten Ventrikeln und einer Unterbrechung der ventrikulären Trabekel (QIAN et al. 1999).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass PTHrP ein wichtiger Bestandteil der lokalen Regulation vieler physiologischer Prozesse ist. Im kardiovaskulären System wird PTHrP sowohl in den Gefäßen als auch im Herzen exprimiert und führt dort über eine Relaxation der Glattmuskelzellen zu einer Vasodilatation. Diese vasodilatative Wirkung wird über den PTH1 Rezeptor vermittelt, dessen Aktivierung im Herzen sowohl einen positiv chronotropen als auch positiv inotropen Effekt auslöst. Eine verlängerte Exposition von PTHrP im vaskulären Gewebe führt zu einer Desensibilisierung und somit zu einer Verminderung weiterer durch PTHrP auslösbarer Effekte.

1.4. Fragestellung

Folgenden Fragen wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen:

1. Welche Rolle spielt PTHrP bei der Koronarperfusion isolierter Rattenherzen?
2. Über welche Signalwege werden die Funktionen von PTHrP vermittelt?
3. Welcher Rezeptor ist an den von PTHrP ausgelösten Effekten beteiligt?
4. Welchen Einfluss hat PTHrP auf die Koronarperfusion isolierter Mäuseherzen?
5. Lassen sich die Erkenntnisse über die Koronarperfusion auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltrakts übertragen?

2. Material

2.1. Chemikalien

(Trp ²³ , Tyr ³⁶) PTH related Peptide (1-36)	Bachem AG, CH - Bubendorf
Acetylcholin Chlorid	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Invitrogen, Schottland, UK
100 bp Ladder	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Captopril	Synopharm, Barsbüttel
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Diethylether	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dneasy®Tissue Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
EDTA - Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Isoprenalin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
N _ω -Nitro-L-Arginin	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Parathyroid Hormon (1-34)	Calbiochem, Darmstadt
PD 142893	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PTH related Peptide (1-34)	Bachem AG, CH - Bubendorf
PTH related Peptide (7-34)	Bachem AG, CH - Bubendorf
PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads	Amersham Biosciences, Freiburg
TIP 39	Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg
Tris/HCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität bei den Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und Merck KGaA (Darmstadt) bezogen und verwendet. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde, falls nicht anders angegeben, Aqua demin. als Lösungsmittel verwendet.

2.1.1. Primer

Alle eingesetzten Primer stammen von der Firma Invitrogen, Karlsruhe.

2.2. Geräte

2.2.1. Allgemein verwendete Geräte/ Gebrauchsgegenstände

Aqua bidest - Anlage	Millipore, Eschborn
Glasware	Schott, Mainz
Laborwaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Magnet - Heizrührer	IKA® Werk, Staufen i.Br.
Minishaker	IKA® Werk, Staufen i.Br.
Stereolupe	Nikon, Düsseldorf
Pipetten	Eppendorf – Netheler – Hinz, Hamburg
Thermoblock	Labtech International, Burkhardtsdorf
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Beckmann Coulter®, Krefeld

2.2.2. Spezielle Geräte

Anlage zur Darmperfusion	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Instituts, Gießen
Gelkammer	ABgene, Hamburg

Kamera	INTAS®, Göttingen
LANGENDORFF - Apparatur	Eigenbau, Werkstatt des Physiologischen Instituts, Gießen
Netzgerät	Biometra, Göttingen
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Thermocycler	Techne, UK

2.3. Verbrauchsmaterial

Latexballon Größe 5	Harvard Apparatus, Qbiogene GmbH, Heidelberg
Leinen Operationszwirn Et. Nr. 40	Gruschwitz, Neu - Ulm
Pipettenspitzen	Eppendorf – Netheler – Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/ 1,5/ 2,0 ml)	Eppendorf – Netheler – Hinz, Hamburg

2.4. Tierbedarf

Standarddiät	Altromin, Lage - Lippe
Tiereinstreu Granulat	Altromin, Lage - Lippe

2.5. EDV

Chart v4.2 Power Lab®	AD Instruments
Microsoft Excel® 2000	Microsoft Corp., USA
Microsoft Power Point® 2000	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows® 2000	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word® 2000	Microsoft Corp., USA
SPSS 15.0 für Statistik	SPSS Inc., USA

3. Methoden

3.1. Perfusion isolierter Rattenherzen

3.1.1. Grundlagen der Perfusion isolierter Rattenherzen

Der Physiologe OSKAR LANGENDORFF (1853-1908) entwickelte 1895 eine Methode für Untersuchungen am isolierten, schlagenden Säugetierherzen. Dabei wird Perfusat über die Aorta ascendens herzwärts gedrückt und bedingt durch die daraus resultierende retrograde Perfusion des Organs den Schluss der Aortenklappen, so, wie bei einem Herzen in situ. Dies führt zu einer Umleitung des Perfusionsmediums in die Koronararterien und stellt somit eine ausreichende Versorgung des Myokards sicher. Der Abfluss des Perfusats erfolgt über den im rechten Vorhof liegenden Sinus coronarius. Die Ventrikel bleiben weitgehend leer (DÖRING und DEHNERT 1985).

Ein intaktes Reizleitungssystem im Zusammenhang mit der Versorgung des Myokards ist die Grundlage für diese spontan schlagende Herzpräparation.

3.1.2. Aufbau der LANGENDORFF Anlage

Zur Perfusion der isolierten Rattenherzen wurde eine Perfusionsanlage nach LANGENDORFF eingesetzt. Hierbei befinden sich die Herzen in einer beheizten (37 °C) und geschlossenen Kammer. In einem über dieser Kammer gelegenen Pufferreservoir wird Perfusat mit Carbogen®, einem Gemisch aus 95% Sauerstoff (O₂) und 5% Kohlendioxid (CO₂), begast, danach durch einen Wärmetauscher geleitet und dabei ebenfalls auf 37°C erwärmt. Zwischengeschaltete Dreiwegehähne ermöglichen das Zuführen unterschiedlicher Lösungen.

Perfusionslösung

modifizierte Tyrode – Lösung

pH 7,4 bei einer Temperatur von 37°C und bei Anwesenheit von O₂ und CO₂

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 mM
Glucose	5,0 mM
CaCl ₂ x H ₂ O	1,8 mM
NaHCO ₃	24 mM

Ein Latexballon, der im linken Ventrikel platziert wird, sowie die Perfusionskanüle sind jeweils mit Druckaufnehmern verbunden und dienen der Messung und Protokollierung. Dabei werden der Perfusionsdruck (PerfPres), auch diastolischer Aortendruck genannt, der linksventrikuläre systolische (SysP) und der linksventrikuläre diastolische Druck (DiasP), sowie die Herzfrequenz (HF) aufgezeichnet. Zur Bestimmung des mittleren Perfusionsflusses wird abfließendes Perfusat mit einem Messzylinder aufgefangen.

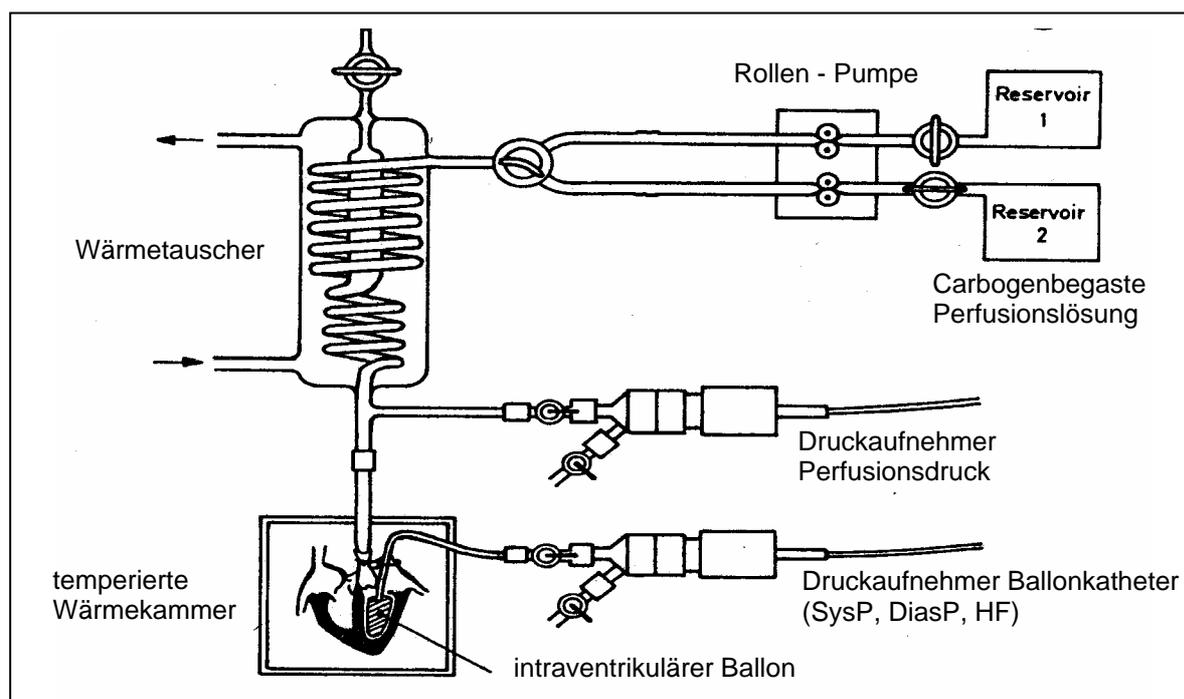


Abbildung 3.1.: Aufbau der Perfusionsanlage nach Langendorff (DÖRING und DEHNERT 1985)

Die Herzen wurden aus weiblichen, drei bis vier Monate alten Wistar – Hannover – Ratten mit einem Lebendgewicht von $200\text{g} \pm 20\text{g}$ (Schwankungsbreite) entnommen. Diese Ratten wurden im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus – Liebig – Universität gezüchtet und aufgezogen. Sie wurden in Gruppen von 7 Tieren in $34 \times 55 \times 21$ cm (Breite \times Tiefe \times Höhe) großen Käfigen auf Tiereinstreu Granulat gehalten. Die Umgebungstemperatur lag bei $24 \pm 2^\circ\text{C}$ und es wurde ein Tag – Nacht – Rhythmus von zwölf Stunden eingehalten. Futter (Standarddiät: Altromin®) und Wasser standen ihnen ad libitum zur Verfügung.

3.1.3. Präparation der isolierten Herzen

Durch eine kurze Diethylethernarkose wurden die Ratten in den Zustand einer tiefen Bewusstlosigkeit versetzt. Die Tiefe der Narkose wurde durch den Cornealreflex und eine Kontrolle des Muskeltonus überprüft. Daraufhin wurden die Ratten durch Genickbruch getötet und das Abdomen wurde eröffnet. Nach dem Entfernen des Zwerchfells wurde das Herz mit den anhängenden Organen entnommen und sofort in eine Petrischale mit physiologischer, 4°C kalter Kochsalzlösung gegeben um alle Stoffwechselprozesse zu verlangsamen und so eine Ischämie zu verhindern.

Nun wurde die Lunge entfernt und die Aorta ascendens dargestellt. Hierzu wurden die Reste des Ösophagus, der Trachea und des Thymus durch vorsichtige Präparation entfernt und die Aorta im Aortenbogen abgesetzt. Anschließend wurde das Herz im Aortenbogen an einer Perfusionskanüle aus Edelstahl ($\varnothing 1,8$ mm) der LANGENDORFF – Perfusionsanlage mit einer Klemme befestigt und mit Operationszwirn (Nr. 40) endgültig fixiert. Dabei durfte die Kanüle nicht zu tief eingeführt werden um den Schluss der Aortenklappen nicht zu beeinträchtigen und die Coronarostien nicht zu verschließen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Herzen bereits mit erwärmtem, Carbogen® - begastem Standardpuffer versorgt. Die Ausgangsrate betrug $2,5$ ml/min und wurde während der Stabilisation auf einen mittleren Fluss, der einem Perfusionsdruck von 50mm Hg entsprach, gesteigert. Zuletzt wurde der Latexballon (Größe 5) in den linken Ventrikel eingeführt.

3.1.4. Versuche

3.1.4.1. Versuche unter flusskonstanten Bedingungen

Eine Kontraktion oder Relaxation der glatten Muskulatur der Coronararterien kommt in einer Änderung des Gefäßradius zum Ausdruck. Dies führt bei einer Perfusion mit konstantem Fluss zu einer umgekehrt proportionalen Änderung des Perfusionsdrucks (DÖRING und DEHNERT 1985).

Bei den Versuchen unter flusskonstanten Bedingungen wurde der mittlere Fluss, nach einer Stabilisierungsphase, von einer zwischen Pufferreservoir und Herz geschalteten Rollenpumpe konstant gehalten.

Nach dem Anhängen des isolierten Herzens begann die oben erwähnte Stabilisierungsphase von 20 Minuten. Während dieser wurden der Füllungsgrad des Ballons und die Flussrate langsam auf den Basalwert eingestellt. Dieser betrug für den diastolischen Druck 11 – 12 mm Hg, was einem physiologischen diastolischen Druck entspricht, und stellte eine mittlere Flussrate dar, die einem Perfusionsdruck von 50 mm Hg entsprach.

In situ werden Warmblüterherzen mit einem Druck perfundiert, der weitgehend dem diastolischen Aortendruck (70 – 90 mm Hg) entspricht. Allerdings wäre dieser Perfusionsdruck für das isolierte Herz zu hoch. Ein basaler Perfusionsdruck von 50 mm Hg wurde aus mehreren Gründen gewählt. Bei salinen Lösungen ist der Fluss doppelt so hoch wie bei der Verwendung von Vollblut oder Plasma, da der Strömungswiderstand der salinen Perfusionslösung nur etwa 50% des Plasmawerts beträgt. Weiterhin kann es durch die konstante unphysiologische Belastung der Aortenklappen zum Durchschlagen kommen. Zusätzlich würde das Auftreten des Gewebeödems, welches durch den fehlenden kolloidosmotischen Druck ohnehin entsteht, verstärkt (DÖRING und DEHNERT 1985).

Nach 20 Minuten Äquilibrationszeit hatten die gemessenen Herzfunktionen ein stabiles Plateau erreicht und der Versuch wurde gestartet.

Dabei erfolgte je nach Protokoll (Versuchsprotokolle siehe Ergebnisteil) die Perfusion mit unterschiedlichen Substanzen, die der Perfusionslösung in den verschiedenen Pufferreservoirs zugefügt worden waren. Jedoch wurde bei allen Versuchen L-NA, kurz für N_ω-Nitro-L-Arginin, in einer Konzentration von 100µM eingesetzt. L-NA ist ein

NO-Synthase-Inhibitor, der der Vorkonstringierung der Koronargefäße diene. Die Perfusionsdauer wurde je nach Protokoll variiert.

3.1.5. Erfassung der physiologischen Parameter

Es wurden fünf unterschiedliche physiologische Parameter erhoben: der Fluss, der Perfusionsdruck, die Herzfrequenz, der systolische sowie der diastolische Druck. Der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) entspricht der Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck. Die Messung des systolischen, bzw. des diastolischen Drucks und der Herzfrequenz erfolgte über den im linken Ventrikel positionierten Latexballon. Dieser war mit aqua bidest. gefüllt und mit einem Druckaufnehmer verbunden. Durch den Füllungsgrad des Ballons wurde der Druck innerhalb des Ventrikels auf einen Basalwert zwischen 11 – 12 mm Hg eingestellt. Diese Füllung des Ballons wurde für den Rest des Versuchs konstant gehalten.

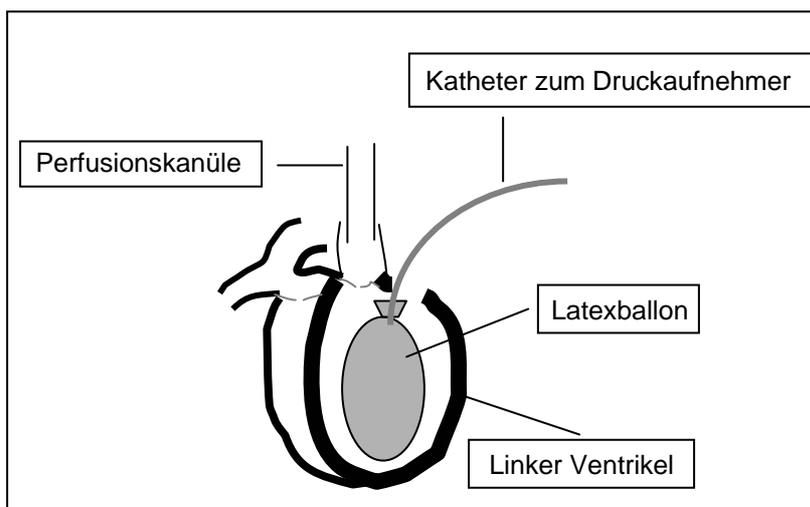


Abb.3.2.: Schematische Darstellung der Lage des Ballons

Die gemessenen Impulse wurden über einen externen Aufnehmer und einen Analog – Digital – Wandler zu einem PC übermittelt.

Der Perfusionsdruck wurde über ein mit aqua bidest. gefülltes Kathetersystem, welches oberhalb der Perfusionskanüle abzweigt und wiederum mit einem Druckaufnehmer verbunden ist, protokolliert.

3.2. Perfusion eines Duodenumsegments der Ratte

3.2.1. Aufbau der Perfusionsanlage

Die Anlage zur Darmperfusion besteht aus einem doppelwandigen, thermoregulierbarem Versuchsgefäß, welches über ein Wasserbad mit Pumpe bei einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten wird. Dieses Versuchsgefäß fasst etwa 50 ml und wird mit physiologischem Darmpuffer, der auf 37°C vorgewärmt wurde, aufgefüllt.

Darmpuffer

pH 7,4 bei einer Temperatur von 37°C und bei Anwesenheit von O₂ und CO₂

NaCl	137 mmol/l
KCl	2,7 mmol/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 mmol/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mmol/l
Glucose	5,5 mmol/l
CaCl ₂ x H ₂ O	1,8 mmol/l
NaHCO ₃	11,9 mmol/l

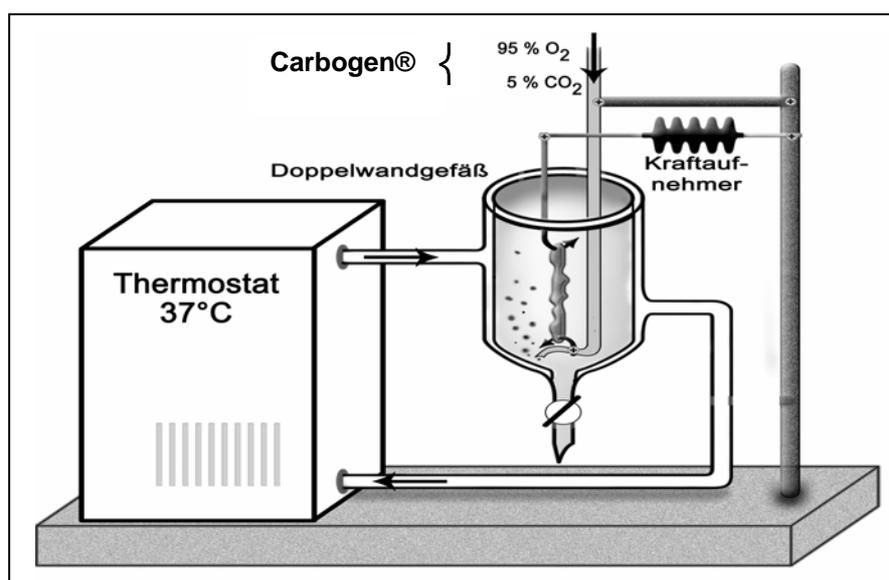


Abb.3.3.: Schematische Darstellung der Anlage zur Darmperfusion

In das Versuchsgefäß wird außerdem ein Glasrohr geführt, über welches der Puffer mit Carbogen® begast wird und an dem das eine Ende des Darmsegments befestigt wird.

Das andere Ende des Darmsegments wird mit einem Kraftaufnehmer verbunden, der wiederum an einen PC angeschlossen ist. Dieser dient der Aufzeichnung der registrierten Daten über Kontraktionsstärke und Kontraktionsfrequenz.

3.2.2. Versuchstiere

Zur Reduzierung des Tierbedarfs wurde der Darm Tieren entnommen, die zur Durchführung von Herzperfusionsexperimenten betäubt und getötet wurden. Die Ratten entstammten hierbei dem gleichen Kollektiv wie schon unter 3.1.3. beschrieben.

3.2.3. Präparation des Darms

Die Ratten wurden durch eine kurze Diethylethernarkose in den Zustand einer tiefen Bewusstlosigkeit versetzt. Anhand des Cornealreflexes und durch eine Kontrolle des Muskeltonus wurde die Tiefe der Narkose überprüft. Daraufhin wurden die Ratten durch Genickbruch getötet und das Abdomen wurde eröffnet.

Etwa 2 cm hinter dem Pylorus wurde ein circa 10 cm langes Duodenumsegment entnommen und sofort in 4°C kalte, physiologische Kochsalzlösung verbracht.

Dann wurde ein etwa 4 cm langes Duodenumsegment an beiden Enden mit Operationszwirn ligiert, wobei der Darminhalt im Darm verblieb um die durch den mechanischen Reiz des Darminhalts ausgelösten Kontraktionen zu ermöglichen. Anschließend wurde das Darmpräparat in das Versuchsgefäß überführt und an Kraftaufnehmer, bzw. Glasrohr befestigt.

3.2.4. Versuche

Nach Befestigung des Darms im Versuchsgefäß wurde der Versuch mit einer Stabilisierungsphase von 10 min begonnen. In dieser Zeit entwickelten sich die Eigenkontraktionen des Darms, die durch die kalte Kochsalzlösung unterbunden worden waren. Nach Beendigung der Stabilisierung wurden, je nach Protokoll, dem

Darmpuffer im Versuchsgefäß unterschiedliche Substanzen zugesetzt, bzw. der Darmpuffer komplett ausgetauscht. Dabei wurden die Veränderungen der Kontraktionsstärke über den Kraftaufnehmer aufgezeichnet. Die Protokolle sind im Ergebnissteil näher beschrieben.

3.3. Perfusion isolierter Mäuseherzen

3.3.1. LANGENDORFF – Anlage

Auch zur Perfusion der isolierten Mäuseherzen wurde eine Anlage nach LANGENDORFF verwendet. Sie entsprach in ihrem Aufbau der Anlage zur Perfusion isolierter Rattenherzen (siehe 3.1.2. Aufbau der LANGENDORFF Anlage).

3.3.2. Versuchstiere

Die Herzen wurden aus weiblichen, vier bis acht Monate alten Mäusen isoliert. Es handelte sich bei den Tieren um eNOS – „knock – out“ – Mäuse, sie wiesen eine partielle (heterozygot eNOS^{+/-}), eine vollständige (homozygot eNOS^{-/-}) oder keine (Wildtyp eNOS^{+/+}) Deletion des eNOS – Gens auf. Bei der Entwicklung von eNOS – „knock – out“ – Mäusen wurde das eNOS – Gen deaktiviert indem das Exon 12 durch andere Sequenzen, die das Neomycin – Resistenz – Gen enthalten, ersetzt wurde. Dies unterbricht die Calmodulin – Bindungsdomäne, die für die eNOS Funktion essentiell ist (SHESELY et al. 1996).

Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus – Liebig – Universität gezüchtet und aufgezogen. Sie wurden in Gruppen von 3 - 4 Tieren in 21 x 39 x 16 cm (Breite x Tiefe x Höhe) großen Käfigen auf Tiereinstreu Granulat gehalten. Die Umgebungstemperatur lag bei 24 ± 2°C und es wurde ein Tag – Nacht – Rhythmus von zwölf Stunden eingehalten. Ihnen standen Futter (Standarddiät: Altromin®) und Wasser ad libitum zur Verfügung.

Bevor die Tiere für die Perfusion der isolierten Mäuseherzen eingesetzt wurden, wurden sie einer Genotypisierung unterzogen. Sowohl homozygot, als auch heterozygot getestete Tiere wurden für die Perfusion verwendet.

3.3.3. Genotypisierung der Mäuse

3.3.3.1. DNA - Gewinnung

Nach Kriterien des §9(2), Abs.4b) des Tierschutzgesetzes (Aktenzeichen: IVMr46-533 30.03UGI 36.12.02 (Gentechnik Tierstall) & V 54-19 c 20-15(1) GI 20/1 (Tierversuch)) wurde ein Eingriff ohne Betäubung an den Tieren vorgenommen. Durch ein Schwanzspitzenbioptat wurde DNA zur Genotypisierung gewonnen. Der durch eine Betäubung zugeführte Schmerz wäre hierbei schwerwiegender und langwieriger gewesen, als der durch den Eingriff ausgelöste Schmerz.

Per Scherenschlag wurde den Mäusen ohne Betäubung die Schwanzspitze amputiert und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Die Mäuse wurden anschließend separiert und zur Identifizierung in gekennzeichneten Käfigen untergebracht.

Zur DNA – Gewinnung wurde ein DNeasy Kit® herangezogen. Im Gegensatz zu einer herkömmlichen DNA – Isolierung erhielt man durch das Befolgen der im DNeasy Kit® beschriebenen Arbeitsschritte mit den enthaltenen Ingredienzien ein Produkt von deutlich höherer Reinheit bei weniger Zeitaufwand.

3.3.3.2. PCR – Analyse

Anhand einer PCR – gestützten Analyse genomischer DNA wurde der Nachweis des Genotypus ermittelt. Da die Sequenzen des Neomycin – Resistenz – Gens in der „knock – out“ Maus auftreten, und die des Exon 12 des eNOS – Gens in der Wildtyp – Maus vorkommen, wurden diese Sequenzen zur Unterscheidung amplifiziert.

	homozygot	heterozygot	Wildtyp
Neomycin - Resistenz - Gen	Positiv	Positiv	negativ
Exon 12	Negativ	Positiv	positiv

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen um eine Kontamination der genomischen DNA zu verhindern.

Bei der PCR zur Amplifizierung der DNA wurden PCR – Beads® eingesetzt. Jeweils eine der PCR – Beads® wurde mit 23 µl Primer - Mix in ein Reaktionsgefäß gegeben

und für 5 Sekunden gevortext. Nun wurden 2 µl DNA – Probe dazugegeben und durch vortexen (5 Sekunden) mit den aufgelösten PCR – Beads® und dem Primer – Mix vermengt. Die Proben wurden anschließend bei einer für den Primer spezifischen Zykluszahl und Temperatur im Thermocycler behandelt.

Primer

WT – Sense	GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC
WT – Antisense	GAC CCA TAC AGA TGG TTG CC
MUB	TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC
MUF	CTC GAC GTT GTC ACT GAA GC

Primer – Mix

WT – Sense	5 µl
WT – Antisense	5 µl
MUB	5 µl
MUF	5 µl
Aqua bidest.	3 µl
DNA – Probe	<u>2 µl</u>

Σ 25 µl/PCR – Bead®

Folgende Programme wurden im Thermocycler durchlaufen:

<u>Programm 1:</u>	Denaturierung	94°C, 6 min
(1 Zyklus)		
<u>Programm 2:</u>	Denaturierung	94°C, 1 min
(34 Zyklen)	Annealing	55°C, 1 min
	Amplifikation	72°C, 2 min
<u>Programm 3:</u>	Kühlen	4°C

Die Proben wurden nun zur Auftrennung der PCR – Amplifikate auf ein horizontales 2%iges Agarose – Gel aufgetragen.

Dazu wurden 1,5 g Agarose und 75 ml 1xTAE – Puffer (Tris – Acetat/EDTA – Puffer) in einem Erlenmeyerkolben vermischt und bis zur vollkommenen Lösung der Agarose erhitzt. Anschließend wurden 3,8 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das

Gemisch in eine Gelkammer mit Profilformer gegeben. Nach dem vollständigen Aushärten des Gels wurde es mit 1xTAE – Puffer überschichtet und mit den Proben beladen. Diese bestanden aus 8 µl PCR – Amplifikat vermengt mit 2 µl TAE – Auftragspuffer. Ein 100 Basenpaarmarker wurde mit auf das Gel aufgetragen und diente zur Identifizierung der Fragmentgröße der zu untersuchenden Proben.

10xTAE – Puffer:

Tris/HCl	40 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

Agarosegel:

Agarose	1,5 g
1xTAE – Puffer	75 ml
Ethidiumbromid	3,8 µl

TAE – Auftragspuffer (farblos):

10xTAE – Puffer	x ml
Saccharose	50 % (wt/vol)

Die Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 75 mA statt. Nach einer ausreichenden Auftrennung des Markers (nach etwa 1 – 1,5 h) fand eine Betrachtung unter UV – Beleuchtung (312 nm) statt. Der in die DNA – Fragmente interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid fluoreszierte violett. Das Gel wurde fotografiert, ausgedruckt, ausgewertet und archiviert.

3.3.3.3. Genotyp – Identifizierung

Nach der erfolgreichen Auftrennung der PCR – Produkte ergab sich immer mindestens eine Bande. Für das Neomycin – Resistenz – Gen stand dabei eine 542 bp – Bande (homozygote Tiere (HO)), während das intakte eNOS – Gen durch eine 256 bp – Bande (Wildtyp – Tiere (WT)) angezeigt wurde. Heterozygote Tiere (HE) wiesen beide Banden auf. Nun konnten die Tiere, nach erfolgreich

abgeschlossener Genotypisierung, für Versuche oder eine Nachzucht verwendet werden.



Abb.4: Genotyp - Identifizierung

3.3.4. Präparation der Mäuseherzen

Die Präparation der Mäuseherzen erfolgte analog zu der Präparation der Rattenherzen (siehe 3.1.4. Präparation der isolierten Herzen), jedoch wurde die Entfernung von Thymus und Geweberesten unter einer Stereolupe mit einer 13,5-fachen Vergrößerung durchgeführt. Außerdem betrug der Durchmesser der Perfusionskanüle 0,8 mm und es wurde auf das Einführen eines Latexballons verzichtet.

Auch bei der Perfusion der Mäuseherzen wurde der Perfusionspuffer wie unter 3.1.4. erwähnt verwendet.

3.3.5. Versuche

Die Versuche wurden unter flusskonstanten Bedingungen durchgeführt. Dies wurde durch eine Rollenpumpe, die zwischen Pufferreservoir und Herz geschaltet war, ermöglicht. Nach dem Anhängen des isolierten Mäuseherzens begann wieder eine Stabilisierungsphase von 20 Minuten. Während dieser wurde der mittlere Fluss langsam auf einen Basalwert eingestellt, der einem Perfusionsdruck von etwas 70 mm Hg entsprach.

Nach der Beendigung der 20 - minütigen Stabilisierung wurde der Versuch gestartet. Dabei erfolgte je nach Protokoll die Perfusion mit unterschiedlichen Substanzen, die der Perfusionslösung in verschiedenen Pufferreservoirs zugefügt wurden. Auch die Perfusiondauer wurde je nach Protokoll (siehe Ergebnisteil) variiert.

3.3.6. Erfassung der physiologischen Parameter

Bei der Perfusion der isolierten Mäuseherzen wurde auf das Einführen eines Latexballons verzichtet. Daher konnten nur der Perfusionsdruck sowie der Perfusionsfluss erfasst werden. Dieser wurde über ein mit aqua bidest. gefülltes Schlauchsystem, welches oberhalb der Perfusionskanüle abzweigte und wiederum mit einem Druckaufnehmer verbunden war, protokolliert.

3.4. Statistik

Die quantitativen Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm dem Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Einzelexperimenten angegeben. Bei Veränderungen des Perfusionsdrucks oder der Herzfrequenz wurde eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls Test durchgeführt. $p < 0,05$ wurde als Signifikanzniveau verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchung an isoliert perfundierten Rattenherzen

4.1.1. Vasodilatation durch PTHrP

Um die Wirkung von PTHrP auf den koronaren Widerstand zu untersuchen, wurden isolierte Rattenherzen flusskonstant perfundiert und Perfusionsdruck (PerfPres), Herzfrequenz (HF), sowie systolischer und diastolischer Druck aufgezeichnet. Nach der 20minütigen Stabilisierungsphase, in der ein Aortendruck von etwa 50 mm Hg erreicht wurde, wurde für 20 Minuten mit Standardpuffer und L-NA (100 μ M) perfundiert. Der am Ende dieser Phase aufgezeichnete Perfusionsdruck wurde als Basalwert (100%) eingesetzt. Es folgte eine zehnminütige Perfusion mit Standardpuffer, dem L-NA (100 μ M) und PTHrP(1-34) (100nM) zugesetzt waren. Wie in Abbildung (Abb.) 4.1 dargestellt, war eine deutliche Vasodilatation nach Gabe des PTHrP zu erkennen (52,2 \pm 6,0 in % von Basal bei n=6).

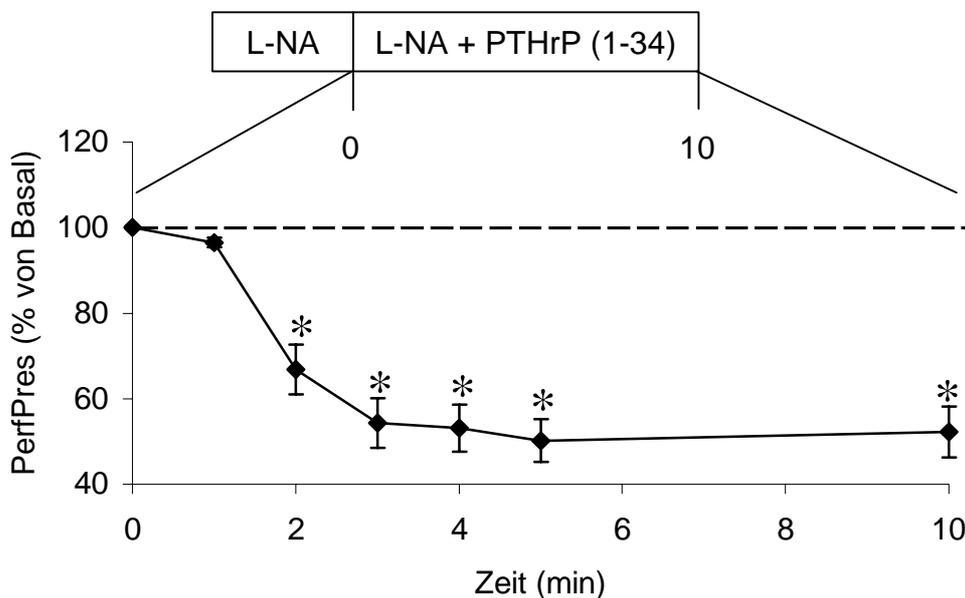


Abb. 4.1: Vasodilatation nach einer einmaligen PTHrP-Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=6 Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

Der Einfluss des PTHrP auf die Herzfrequenz wird in Abb. 4.2 dargestellt, wo nach der PTHrP-Applikation ein positiv chronotroper Effekt deutlich zu erkennen ist ($120,9 \pm 3,0$ in % von Basal bei $n=6$).

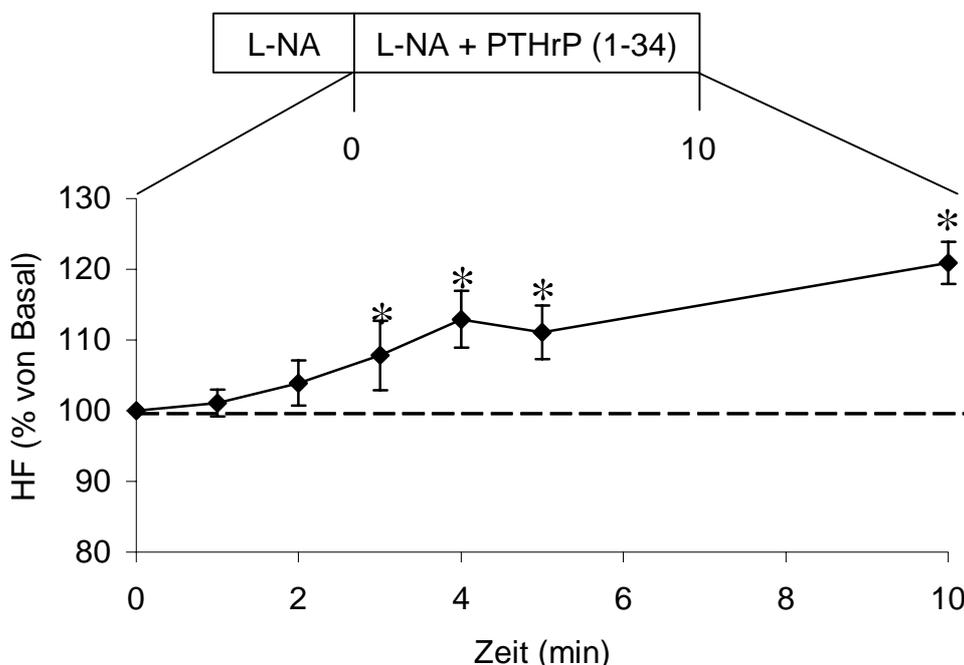


Abb. 4.2: Auftreten eines positiv chronotropen Effekts nach einmaliger Applikation von PTHrP; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=6$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.1.2. Wiederholte Applikation von PTHrP

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde der Einfluss einer wiederholten Applikation von PTHrP auf den koronaren Widerstand beurteilt. Hierbei wurden die Rattenherzen ebenfalls flusskonstant perfundiert. Perfusionsdruck, Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Druck wurden aufgezeichnet. Nach einer 20minütigen Stabilisierungsphase, während welcher ein konstanter Aortendruck von etwa 50 mm Hg erreicht wurde, wurden dem Standardpuffer unterschiedliche Substanzen zugefügt. Sowohl bei dieser, als auch bei den folgenden Versuchsreihen wurde wieder L-NA zu Vorkonstringierung der Koronargefäße eingesetzt. So wurden die Herzen zuerst für 20 Minuten mit L-NA ($100\mu\text{M}$) und PTHrP(1-34) (100nM) und anschließend für weitere 20 Minuten ausschließlich mit L-NA ($100\mu\text{M}$) perfundiert.

Dabei kam es zu einem Anstieg des Aortendrucks, wobei der am Ende dieser Perfusionsphase aufgezeichnete Druck als Basalwert (100%) eingesetzt wurde. Daraufhin wurde für 10 Minuten wieder mit L-NA (100 μ M) und PTHrP(1-34) (100nM) perfundiert, woraufhin ein weiterer Anstieg des Aortendrucks beobachtet werden konnte (117,6 \pm 4,1 in % von Basal bei n=10). Diese Vasokonstriktion ist in Abb. 4.3 dargestellt.

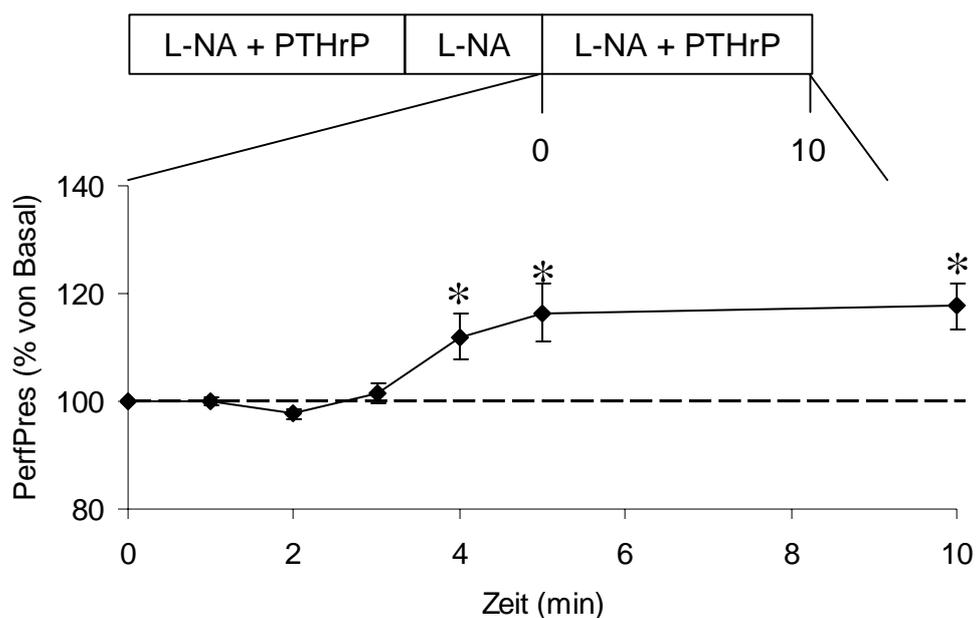


Abb. 4.3: Einfluss einer wiederholten Applikation von PTHrP(1-34) auf den Aortendruck (PerfPres); die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=10 Herzen, *: p<0,05 vs. Basal

Weiterhin konnte bei diesem Versuchsprotokoll bei der Beobachtung der Herzfrequenz (Abb. 4.4) kein positiv chronotroper Effekt nach der wiederholten PTHrP–Applikation festgestellt werden ($100,9 \pm 3,1$ in % von Basal bei $n=9$).

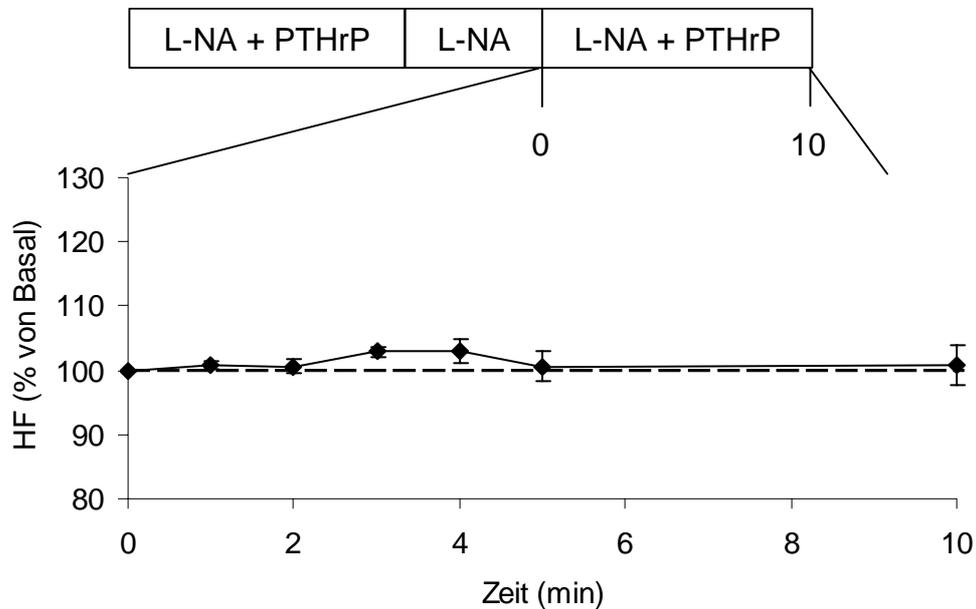


Abb. 4.4: Einfluss einer wiederholten Applikation von PTHrP(1-34) auf die Herzfrequenz; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=9$ Herzen

4.1.2.1. Konzentrationswirkungskurve bei wiederholter Applikation von PTHrP

In der folgenden Versuchsreihe blieb der Zeitablauf unverändert, jedoch wurde die Konzentration bei der ersten PTHrP-Applikation variiert (Abb. 4.5). Auch hier wurde der nach 20minütiger Perfusion mit L-NA ($100\mu\text{M}$) gemessenen Perfusionsdruck als Basalwert (100%) eingesetzt. Bei der ersten Applikation wurde PTHrP(1-34) also in den Konzentrationen 0nM, 10nM, 50nM und 100nM eingesetzt, die zweite Applikation erfolgte immer in einer Konzentration von 100nM. Hier konnte festgestellt werden, dass es nur bei einer Vorbehandlung mit einer Konzentration von 100nM zu einer Vasokonstriktion bei der wiederholten Applikation von PTHrP kam ($117,6 \pm 4,1$ in % von Basal bei $n=10$).

Bei einer Vorbehandlung mit 50nM blieb der Perfusionsdruck nahezu unverändert ($95,7 \pm 3,4$ in % von Basal bei $n=8$), bei einer Vorbehandlung mit 10nM und 0nM kam

es zu einem Abfall des Aortendrucks ($74,6 \pm 4,6$ in % von Basal bei $n=8$ und $52,2 \pm 6,0$ in % von Basal bei $n=8$).

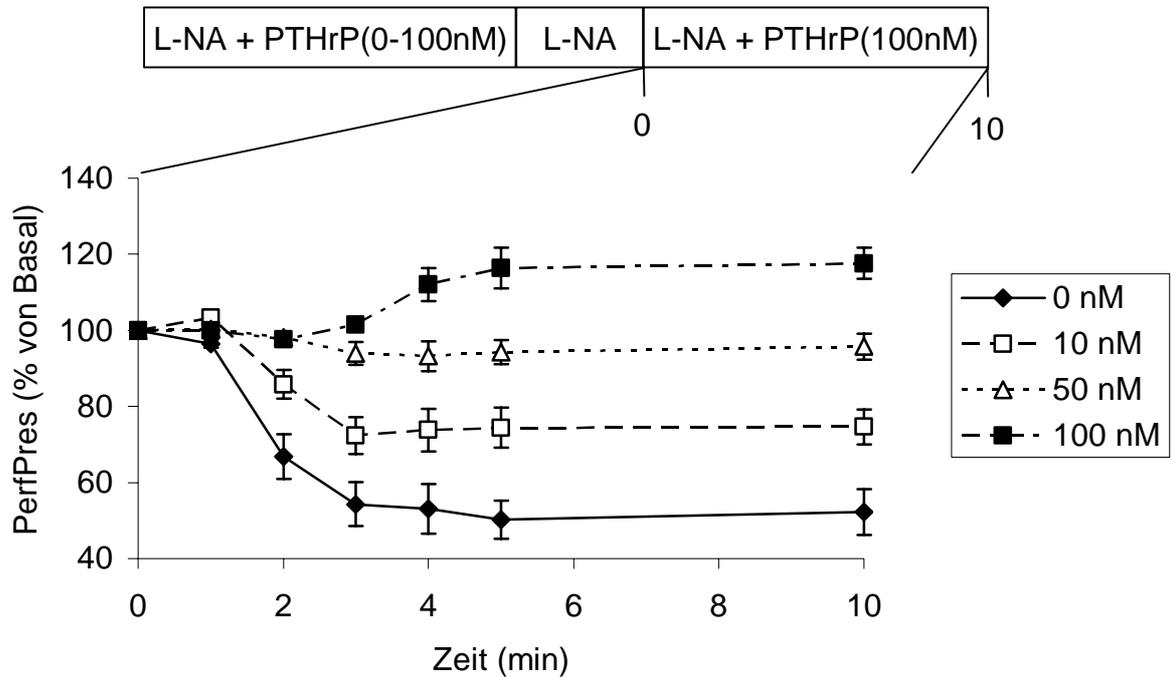


Abb. 4.5: Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Desensibilisierung; Variation der PTHrP-Konzentration bei der ersten Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$, bzw. $n=10$ (100nM) Herzen

Bei der Auswertung der Herzfrequenz (Abb. 4.6) zeigte sich, dass es bei einer PTHrP-Konzentration von 0nM ($123,7 \pm 1,8$ in % von Basal bei n=8), 10nM ($126,9 \pm 6,5$ in % von Basal bei n=8), und 50 nM ($105,8 \pm 1,2$ in % von Basal bei n=8) zu einer Steigerung der Herzfrequenz nach der zweiten Applikation von PTHrP kam, was jedoch bei einer Konzentration von 100nM nicht der Fall war ($100,9 \pm 9,2$ in % von Basal bei n=10).

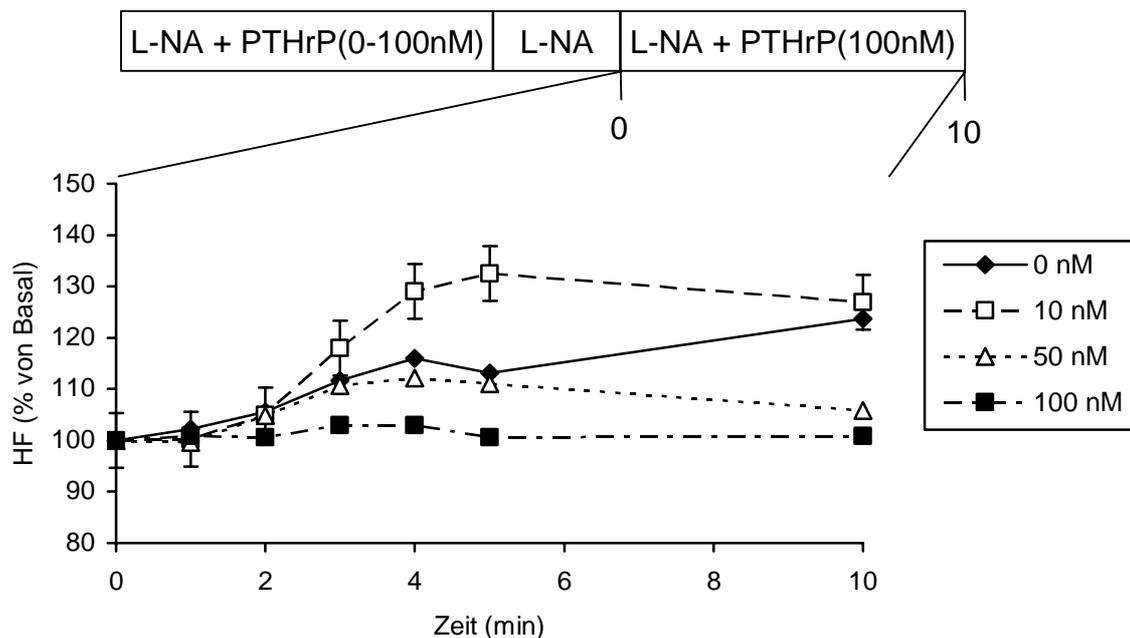


Abb. 4.6: Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf die Herzfrequenz; Variation der PTHrP-Konzentration bei der ersten Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=8, bzw. n=10 (100nM) Herzen

4.1.2.2. Perfusion mit PTHrP(7-34) und PTHrP(1-34)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde bei der ersten Applikation PTHrP (7-34), ebenfalls in einer Konzentration von 100nM, statt des PTHrP (1-34) verwendet. Der Zeitablauf des Protokolls blieb unverändert, die zweite Applikation erfolgte wiederum mit PTHrP (1-34) in einer Konzentration von 100nM.

In Abbildung 4.7 ist deutlich zu erkennen, dass es bei einer Vorbehandlung mit PTHrP (7-34) nicht zu einer Vasokonstriktion, sondern zu einem Abfall des Aortendrucks kam ($70,7 \pm 7,1$ % von Basal bei $n=9$).

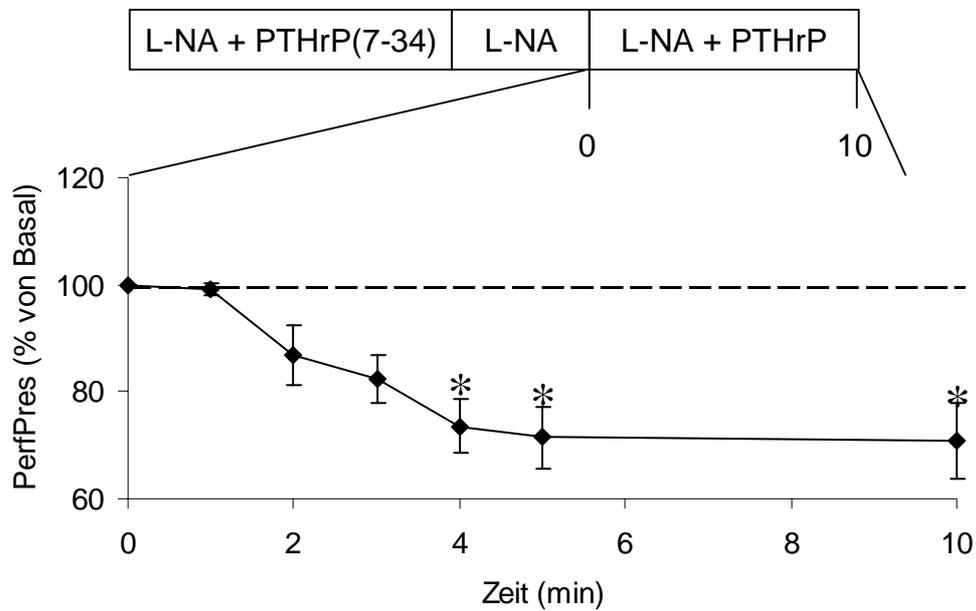


Abb.4.7: Darstellung des Einflusses einer Vorbehandlung mit PTHrP(7-34) auf den Aortendruck; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=9$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

Bei Betrachtung der Herzfrequenz in Abbildung 4.8 wird das Auftreten eines positiv chronotropen Effekts nach der Applikation von PTHrP (1-34) deutlich (bei Minute 5: $130,0 \pm 7,6$ % von Basal bei $n=9$).

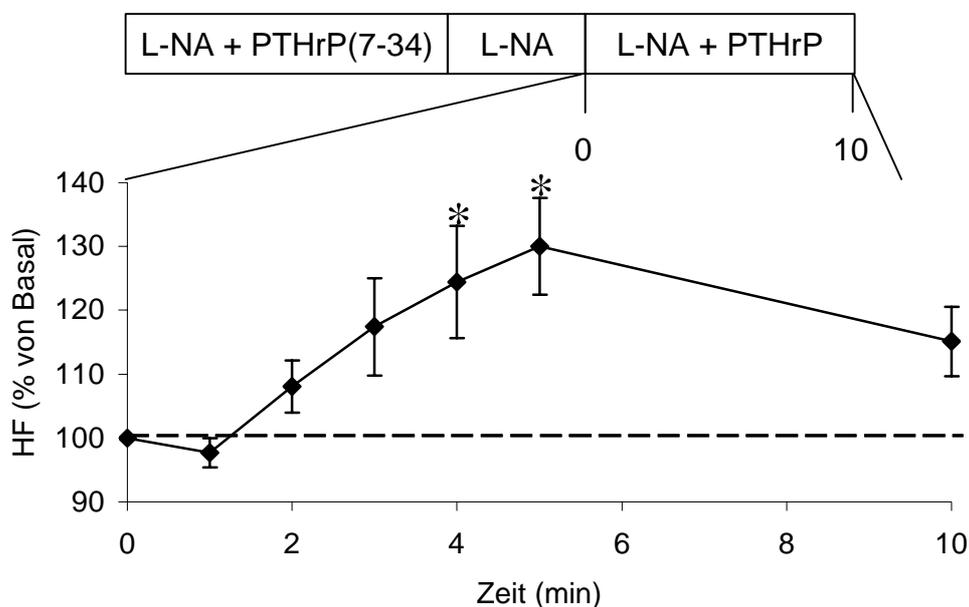


Abb.4.8: Positiv chronotroper Effekt nach Vorbehandlung mit PTHrP(7-34); die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=9$ Herzen, *: $p<0,05$ vs. Basal

4.1.2.3. Perfusion mit Isoprenalin und PTHrP

Bei gleichem Zeitablauf des Protokolls wurden dem Standardpuffer zur Vorbehandlung L-NA ($100\mu\text{M}$) und Isoprenalin ($10\mu\text{M}$), ein β -Adrenozeptoragonist, welcher über cAMP zu einer Vasodilatation führt, zugesetzt. Die zweite Applikation wurde wiederum mit L-NA ($100\mu\text{M}$) und PTHrP (1-34) (100nM) durchgeführt. Auch hier wurde wieder der Perfusionsdruck nach 20minütiger Perfusion mit L-NA ($100\mu\text{M}$) als Basalwert (100%) eingesetzt.

Nach der zehnmütigen Perfusion mit PTHrP konnte, wie in Abb. 4.9 dargestellt, ein deutlicher Abfall des Perfusionsdrucks festgestellt werden ($82,2 \pm 6,5$ % von Basal bei $n=12$).

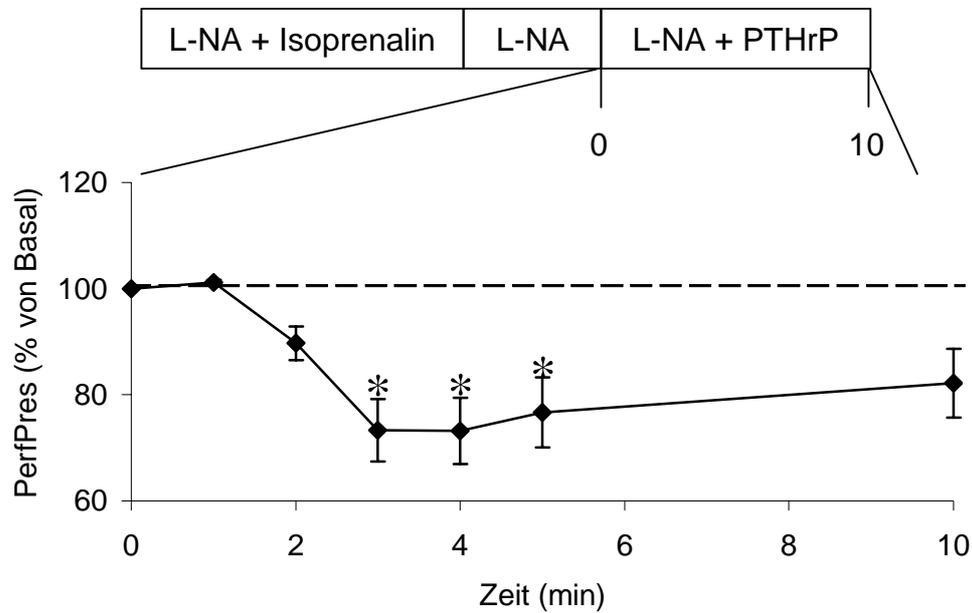


Abb.4.9: Darstellung der Vasodilatation nach Vorbehandlung mit Isoprenalin und Applikation von PTHrP; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=12$ Herzen, *: $p<0,05$ vs. Basal

Bei der Auswertung der Herzfrequenz (Abb. 4.10) wurde deutlich, dass nach einer Vorbehandlung mit Isoprenalin ein positiv chronotroper Effekt auftrat (bei Minute 5: $113,4 \pm 4,7$ % von Basal bei $n=12$).

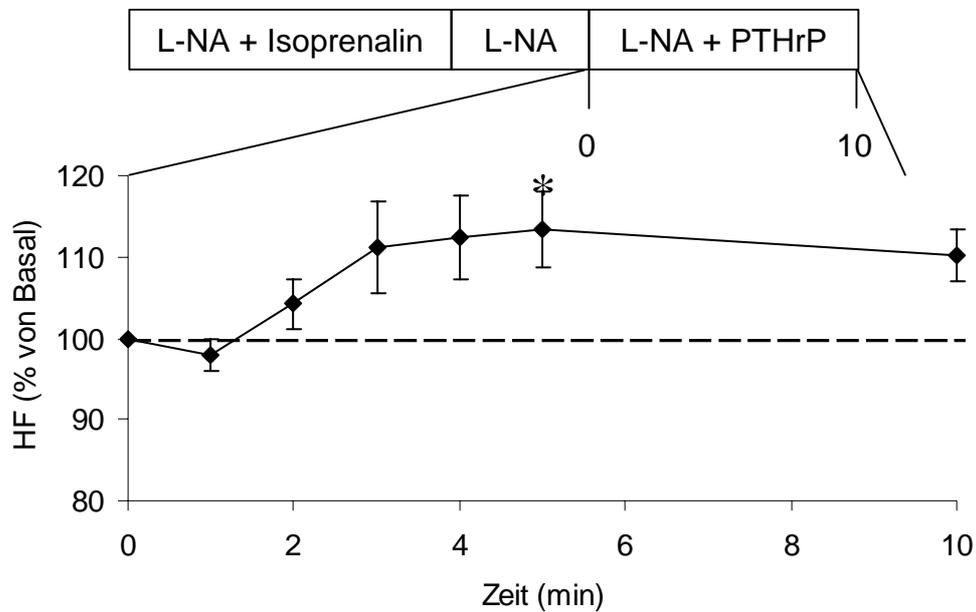


Abb.4.10: Darstellung des positiv chronotropen Effekts nach Vorbehandlung mit Isoprenalin; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=12$ Herzen, *: $p<0,05$ vs. Basal

4.1.2.4. Kinetik der Vasokonstriktion durch PTHrP

Nach einer 20 Minuten dauernden Stabilisierung wurde den flusskonstant perfundierten Herzen mit dem Standardpuffer für 20 Minuten L-NA ($100\mu\text{M}$) zugefügt. Nun wurden für eine Minute PTHrP (1-34) (100nM) und L-NA ($100\mu\text{M}$) appliziert. Es folgte eine 15minütige Perfusion mit Standardpuffer und L-NA ($100\mu\text{M}$). Beginnend mit der einminütigen Applikation von PTHrP wurde diese Perfusionsabfolge insgesamt fünfmal durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine Versuchsreihe anhand des gleichen Protokolls durchgeführt, jedoch wurde statt fünfmal einer Minute jeweils für zwei Minuten mit PTHrP (1-34) (100nM) perfundiert. Als Basalwert (100%) wurde der Messwert zu Beginn der PTHrP-Applikation abzüglich des Stabilisierungswerts (50mm Hg) eingesetzt. Zur weiteren Auswertung wurden die Werte, die zwei, fünf und zehn Minuten nach Beginn der PTHrP-Applikation aufgezeichneten wurden,

herangezogen und, ebenfalls abzüglich des Stabilisierungswerts, prozentuell auf den Basalwert bezogen. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach jeder erneuten Applikation des PTHrP der Umfang der auftretende Vasodilatation abnahm und dass dieser Effekt bei der zweiminütigen Applikation deutlicher ausfiel (Abb.4.11). So sank der Aortendruck nach der ersten, einminütigen Applikation von PTHrP auf $8,0 \pm 3,4$ in % von Basal (n=4 Herzen) und bei der fünften Applikation auf $65,7 \pm 10,7$ in % von Basal. Im Unterschied dazu sank der Aortendruck nach der ersten, zweiminütigen Applikation von PTHrP auf $12,4 \pm 3,4$ in % von Basal und bei der fünften Applikation auf $84,7 \pm 1,0$ in % von Basal (n=4 Herzen).

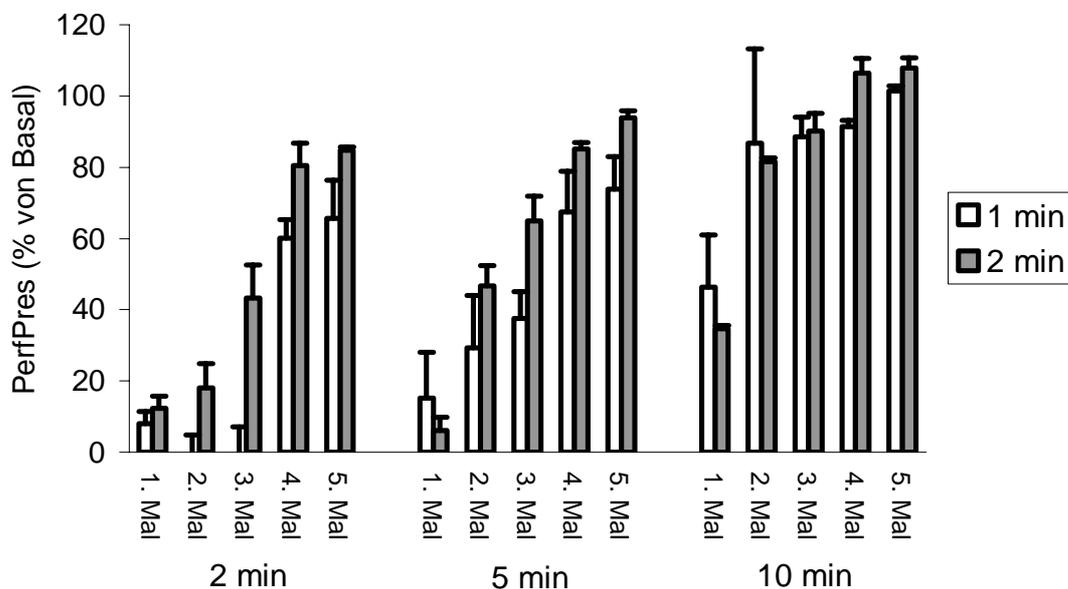


Abb.4.11: Vasokonstriktion nach fünfmaliger Applikation von PTHrP über ein, bzw. zwei Minuten, Messung jeweils zwei, fünf und zehn Minuten nach PTHrP-Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von n=4 Herzen

Bei der Darstellung der Herzfrequenz wurde als Basalwert (100%) die bei Beginn der PTHrP-Applikation gemessene Herzfrequenz eingesetzt und die nach zwei, fünf und zehn Minuten gemessenen Werte darauf bezogen. Im Diagramm zur Entwicklung der Herzfrequenz (Abb. 4.12) wird sichtbar, dass ein positiv chronotroper Effekt nur bei der erstmaligen Applikation von PTHrP auftrat (1 min: $122,6 \pm 3,5$ in % von Basal; 2 min: $126,4 \pm 3,5$ in % von Basal, jeweils n=4), bei den weiteren Applikationen blieb

die Herzfrequenz nahezu unverändert (1 min: $101,7 \pm 1,5$ in % von Basal; 2 min: $102,9 \pm 2,0$ in % von Basal, jeweils $n=4$). Weiterhin gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen der einminütigen und der zweiminütigen PTHrP-Applikation.

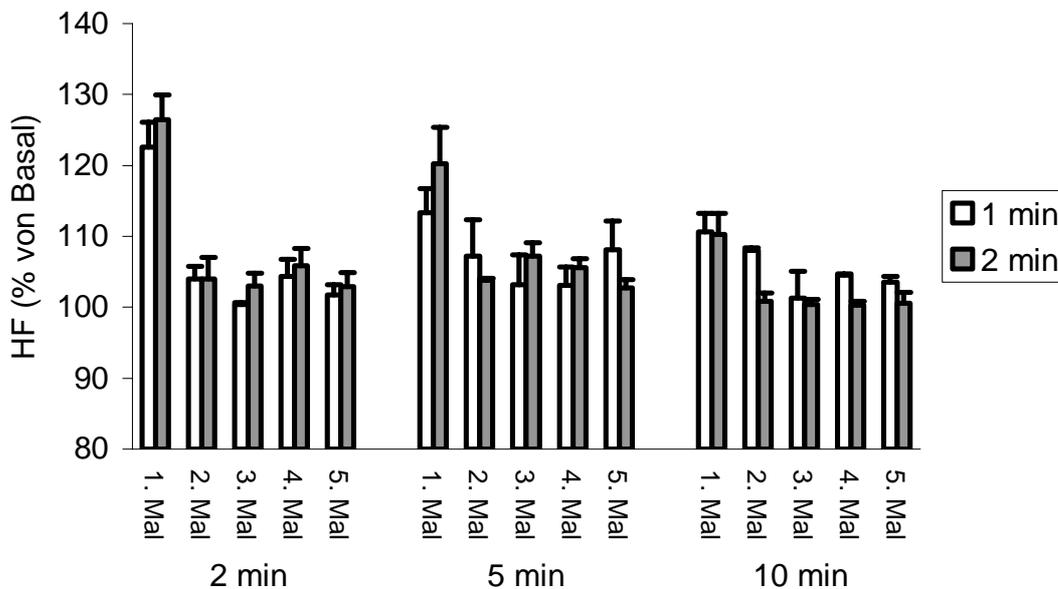


Abb.4.12: Darstellung der Herzfrequenz nach fünfmaliger Applikation von PTHrP über ein, bzw. zwei Minuten, Messung jeweils zwei, fünf und zehn Minuten nach PTHrP-Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von $n=4$ Herzen

4.1.3. Vasokonstriktion durch PTHrP

Zur genaueren Untersuchung des in Abb. 4.3 dargestellten vasokonstriktorisches Effekts nach einer wiederholten PTHrP-Applikation wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt.

4.1.3.1. Konzentrationsabhängigkeit der Vasokonstriktion

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Zeitablauf der Versuche aus 4.1.2. übernommen.. Es wurde also wieder mit einer 20minütigen Stabilisierung begonnen, gefolgt von einer 20 Minuten dauernden Perfusion mit Standardpuffer, dem L-NA ($100\mu\text{M}$) und PTHrP (1-34) (100nM) zugesetzt wurden. Anschließend wurde für 20 Minuten mit Standardpuffer und L-NA ($100\mu\text{M}$) perfundiert, bevor über zehn Minuten

Standardpuffer, L-NA (100 μ M) und PTHrP (1-34) appliziert wurden, hierbei wurde jedoch die Konzentration bei der zweiten PTHrP-Applikation variiert. Auch hier wurde der Perfusionsdruck nach 20minütiger Perfusion mit L-NA(100 μ M) als Basalwert (100%) eingesetzt. Bei der ersten Applikation wurde PTHrP (1-34), wie beschrieben, immer in einer Konzentration von 100nM eingesetzt, die zweite Applikation erfolgte mit variierenden Konzentrationen von 10nM, 50nM und 100nM. Wie in Abb. 4.13 dargestellt, konnte dabei festgestellt werden, dass es nur, wenn bei der zweiten Applikation PTHrP in einer Konzentration von 100nM eingesetzt wurde, zu einem erneuten Anstieg des Perfusionsdrucks kam (117, 6 \pm 4,1 in % von Basal bei n=10). Wurde bei der zweiten Applikation von PTHrP jedoch eine Konzentration von 50nM, bzw. 10nM eingesetzt, blieb der Perfusionsdruck nahezu unverändert (94,0 \pm 12,9 in % von Basal bei n=9, bzw. 103,9 \pm 8,9 in % von Basal bei n=8).

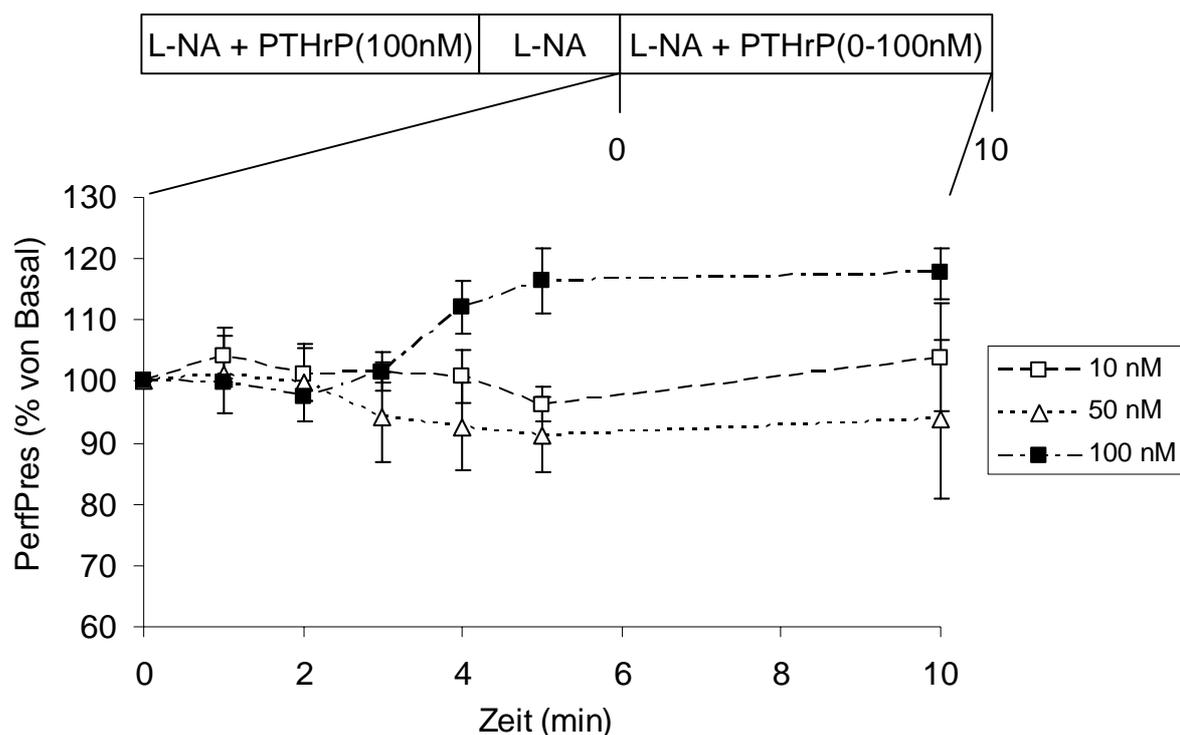


Abb. 4.13: Konzentrationswirkungskurve; Variation der PTHrP-Konzentration bei der zweiten Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=8 (10nM), n=9 (50nM), bzw. n=10 (100nM) Herzen

Bei der Aufzeichnung der Herzfrequenz (Abb. 4.14) konnte festgestellt werden, dass nach der zweiten PTHrP-Applikation eine Steigerung der Herzfrequenz nur bei der

Verwendung von einer PTHrP-Konzentration von 50nM auftrat ($106,8 \pm 2,7$ in % von Basal bei $n=9$). Beim Einsatz von PTHrP in einer Konzentration von 10nM, bzw. 100nM war keine Veränderung der Herzfrequenz zu beobachten ($99,2 \pm 1,3$ in % von Basal bei $n=8$, bzw. $100,9 \pm 19,2$ in % von Basal bei $n=10$).

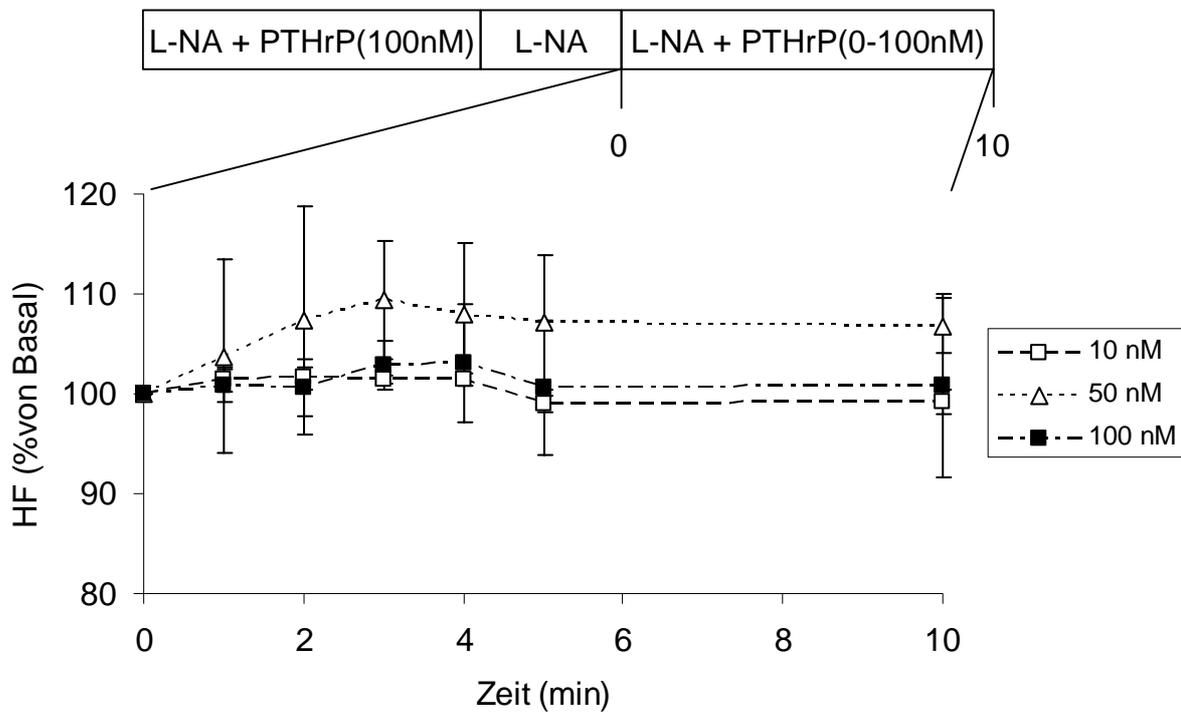


Abb. 4.14: Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf die Herzfrequenz; Variation der PTHrP-Konzentration bei der zweiten Applikation; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ (10nM), $n=9$ (50nM), bzw. $n=10$ (100nM) Herzen

4.1.3.2. Applikation von PTHrP(7-34) nach Vorbehandlung mit PTHrP(1-34)

In dieser Versuchsreihe wurde zur Vorbehandlung wieder PTHrP (1-34), in einer Konzentration von 100nM, eingesetzt. Bei der zweiten Applikation wurde jedoch statt des PTHrP(1-34) das PTHrP(7-34), ebenfalls in einer Konzentration von 100nM, verwendet. Der Zeitablauf des Protokolls blieb unverändert.

In Abb. 4.15 ist deutlich zu erkennen, dass es bei der Behandlung mit PTHrP(7-34) nicht zu einer Vasokonstriktion, sondern zu einem unveränderten Aortendruck kam ($99,1 \pm 4,6$ % von Basal bei $n=8$).

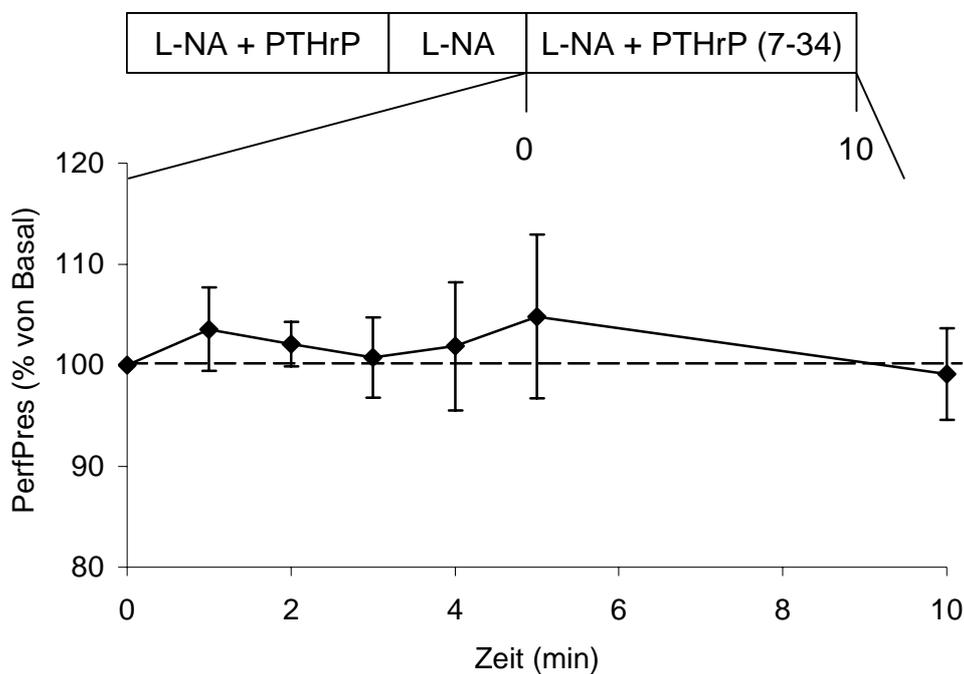


Abb. 4.15: Perfusionsdruck nach Vorbehandlung mit PTHrP(1-34) und Applikation von PTHrP(7-34); die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ Herzen

Bei der Beobachtung der Herzfrequenz, dargestellt in Abb. 4.16, war nach Einsatz des PTHrP(7-34) zur wiederholten Perfusion kein positiv chronotroper Effekt festzustellen ($100,0 \pm 4,3$ % von Basal bei $n=8$).

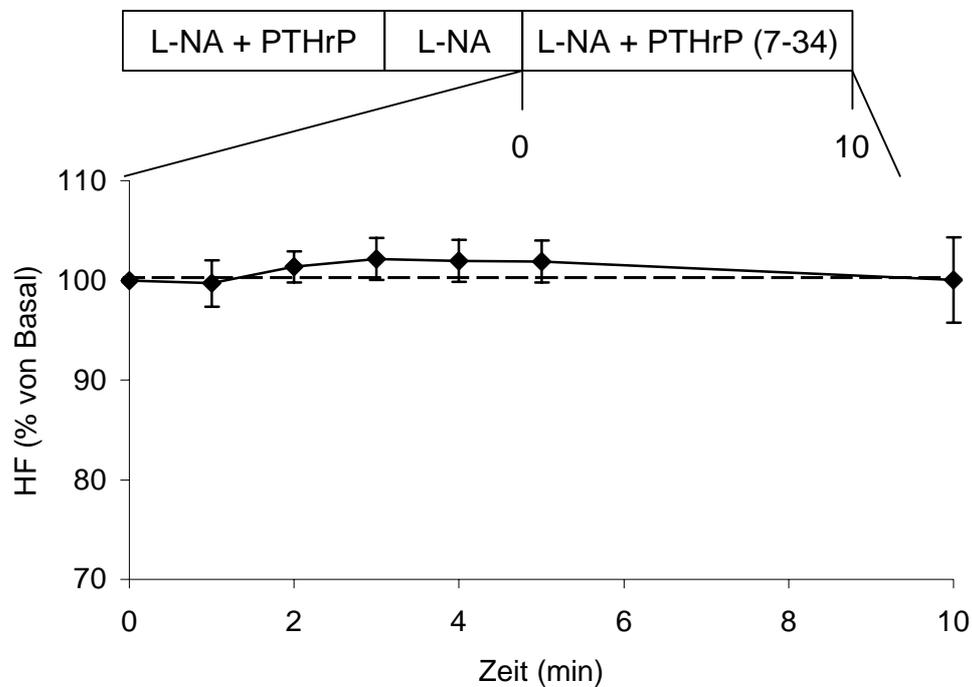


Abb. 4.16: Darstellung der Herzfrequenz nach Einsatz von PTHrP 7-34 zur wiederholten Perfusion; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ Herzen

4.1.3.3. Applikation von Isoprenalin nach Vorbehandlung mit PTHrP(1-34)

Bei gleichem Zeitablauf des Protokolls wurden dem Standardpuffer zur Vorbehandlung L-NA (100 μ M) und PTHrP 1-34 (100nM) zugesetzt. Die zweite Applikation wurde jedoch mit L-NA (100 μ M) und Isoprenalin (10 μ M) durchgeführt. Auch wurde wieder der Perfusionsdruck nach 20minütiger Perfusion mit L-NA (100 μ M) als Basalwert eingesetzt.

Nach der zehninütigen Perfusion mit Isoprenalin (Abb. 4.17) wurde deutlich, dass ein signifikanter Abfall des Perfusionsdrucks auftrat (75,4 \pm 5,7 % von Basal bei n=7).

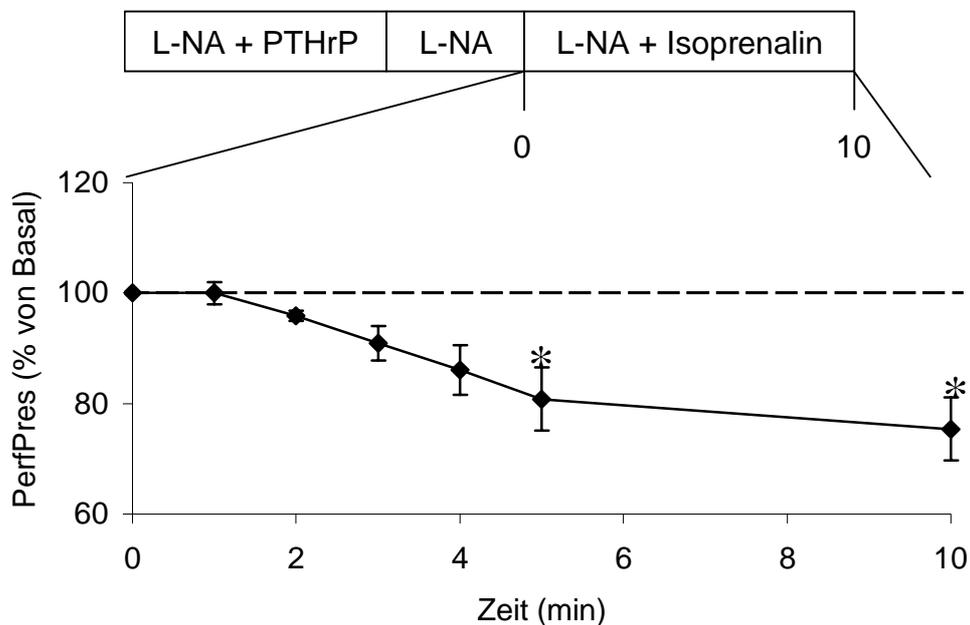


Abb. 4.17: Keine Vasokonstriktion nach Stimulation mit Isoprenalin; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=7 Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

Das Auftreten eines positiv chronotropen Effekts ($121,9 \pm 4,5$ % von Basal bei $n=7$) nach Vorbehandlung mit PTHrP und anschließender Applikation von Isoprenalin wird in Abb. 4.18 deutlich.

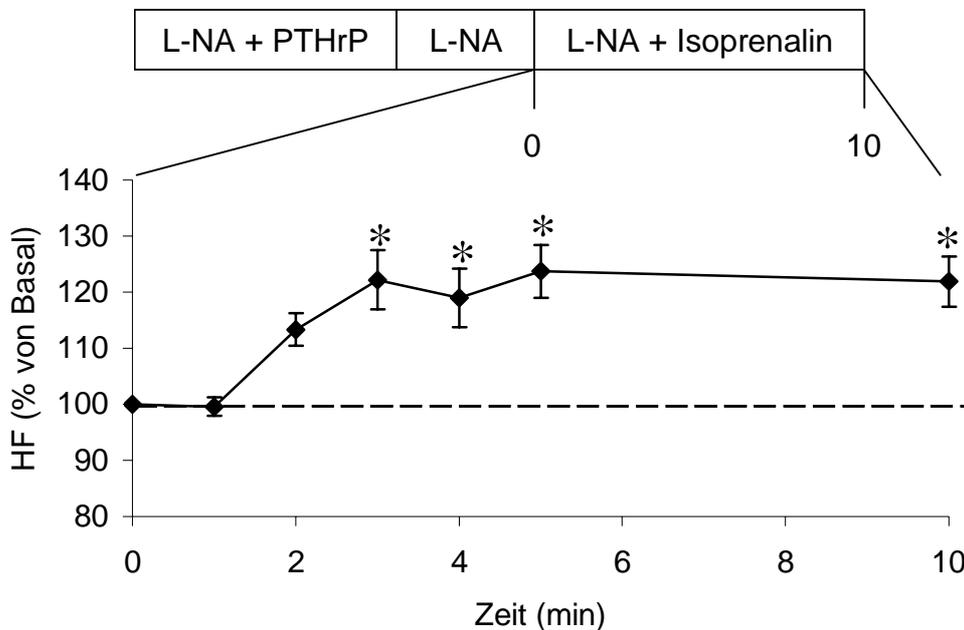


Abb. 4.18: Positiv chronotroper Effekt nach Stimulation mit Isoprenalin; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=7$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.1.3.4. Perfusion mit (Trp²³, Tyr³⁶) PTHrP(1-36) und TIP39

In der folgenden Versuchsreihe wurde nach einer 20minütigen Stabilisierungsphase für weitere 20 Minuten mit Standardpuffer und L-NA (100 μ M) zur Vorkonstringierung perfundiert. Standardpuffer und L-NA (100 μ M) wurden während des gesamten Versuchs unverändert eingesetzt, zusätzlich wurde über die nächsten zehn Minuten (Trp²³, Tyr³⁶) PTHrP(1-36) in einer Konzentration von 100nM appliziert. Dem schloss sich eine 20minütige Auswaschphase, also eine Perfusion mit Standardpuffer und L-NA (100 μ M), an, bevor für zehn Minuten zusätzlich TIP39 (100nM) zugeführt wurde. Als Basalwert (100%) wurde der am Ende der Auswaschphase aufgezeichnete Messwert eingesetzt.

In Abbildung 4.19. der Darstellung des Perfusionsdrucks, ist zu erkennen, dass dieser nach einer Vorbehandlung mit (Trp²³,Tyr³⁶) PTHrP(1-36) und einer Perfusion mit TIP39 nahezu unverändert bleibt ($99,8 \pm 14,9$ % von Basal bei n=6).

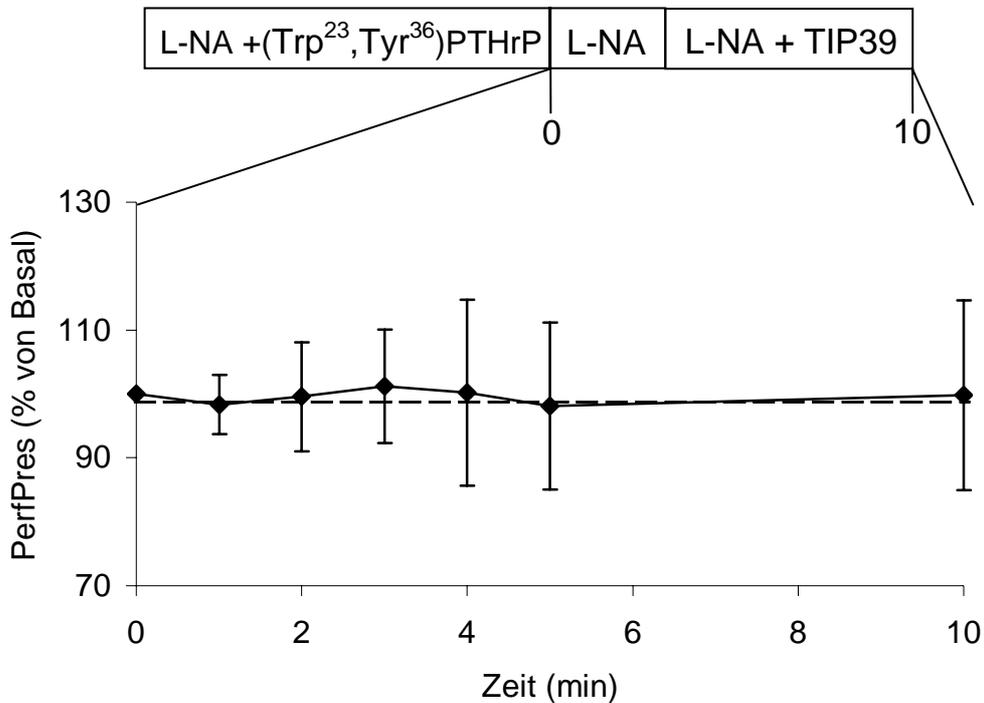


Abb.4.19: Entwicklung des Perfusionsdrucks nach Perfusion mit (Trp²³,Tyr³⁶) PTHrP (1-36) und TIP39; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=6 Herzen

Abbildung 4.20 zeigt die Entwicklung der Herzfrequenz bei der Perfusion mit $(\text{Trp}^{23}, \text{Tyr}^{36})\text{PTHrP}(1-36)$ und TIP39, wobei zu erkennen ist, dass es zu keiner Veränderung der Frequenz nach der Applikation von TIP39 kam ($101,8 \pm 5,2$ % von Basal bei $n=6$).

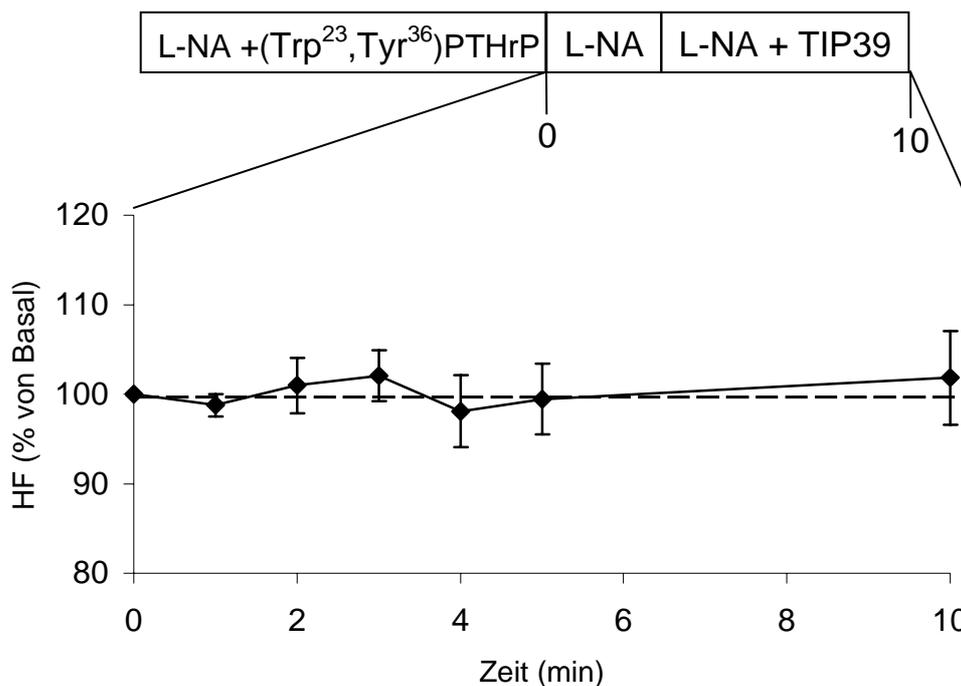


Abb. 4.20: Darstellung der Herzfrequenz nach Perfusion mit $(\text{Trp}^{23}, \text{Tyr}^{36})\text{PTHrP}(1-36)$ und TIP39; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=6$ Herzen

4.1.3.5. Perfusion mit PD142893

Diese Versuchsreihe wurde wieder anhand des Standardprotokolls durchgeführt. Nach der 20minütigen Stabilisierungsphase wurde für weitere 20 Minuten mit Standardpuffer, dem L-NA ($100\mu\text{M}$) und $\text{PTHrP}(1-34)$ (100nM) zugesetzt wurden, perfundiert. Daraufhin folgte eine zwanzigminütige Perfusion mit Standardpuffer und L-NA ($100\mu\text{M}$), bevor für zehn Minuten mit Standardpuffer, L-NA ($100\mu\text{M}$), $\text{PTHrP}(1-34)$ (100nM) und PD 142893 (200nM) perfundiert wurde.

In Abb. 4.21 ist zu erkennen, dass es bei der Perfusion mit PD142893 und PTHrP zu einer Vasokonstriktion kam ($114,4 \pm 4,1$ in % von Basal bei $n=8$).

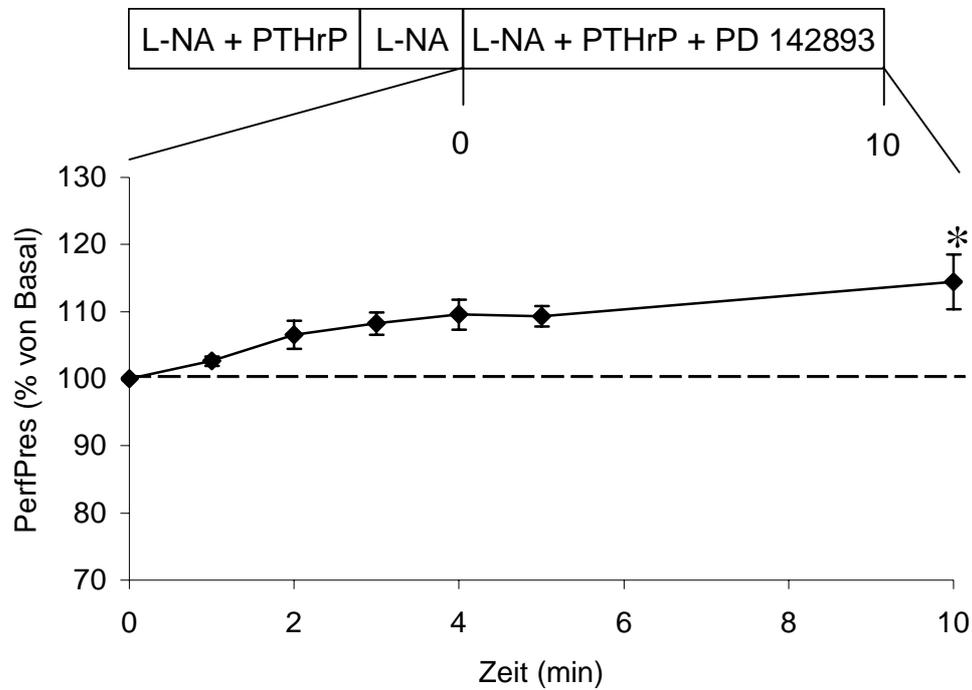


Abb. 4.21: Auftreten einer Vasokonstriktion bei Einsatz von PD142893; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ Herzen, *: $p<0,05$ vs. Basal

In der Darstellung der Herzfrequenz (Abb. 4.22) wird deutlich, dass unter Einsatz von PD142893 eine geringe Steigerung der Herzfrequenz zu beobachten war ($110,6 \pm 2,7$ in % von Basal bei $n=6$).

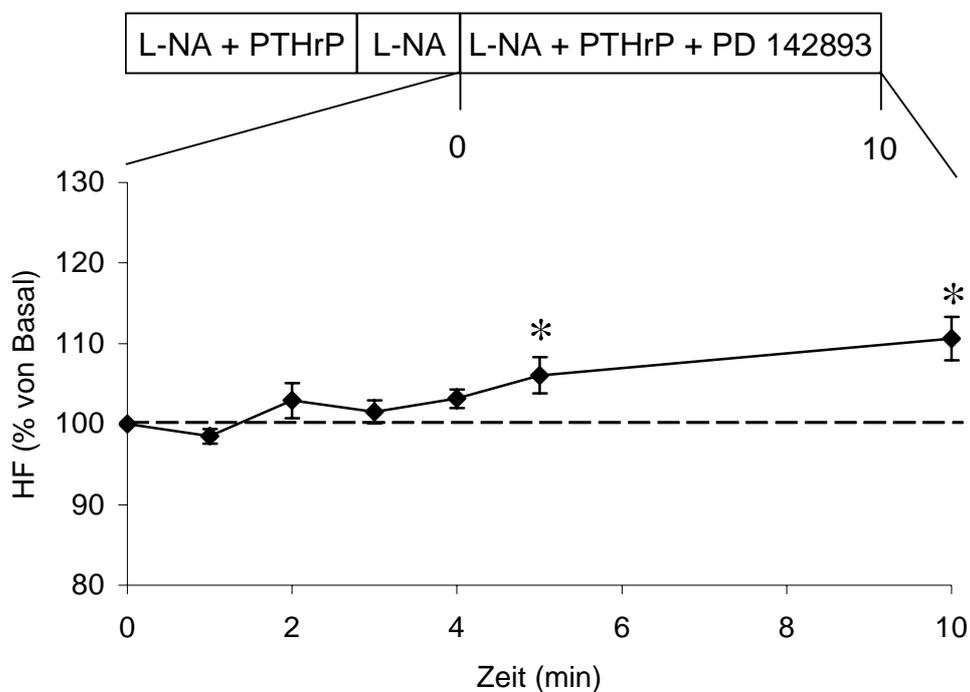


Abb. 4.22: Auftreten eines positiv chronotropen Effekts bei Einsatz von PD142893; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.1.3.6. Applikation von PTHrP und Captopril

Wiederum wurde nach Standardprotokoll perfundiert. Bei der zweiten Applikation wurde dem Standardpuffer zusätzlich zu L-NA (100 μ M) und PTHrP (1-34) (100nM) noch Captopril in einer Konzentration von 300 μ M zugesetzt. Während des Einsatzes von Captopril und PTHrP kam es bei der zweiten PTHrP-Perfusion zu einem deutlichen Anstieg des Perfusionsdrucks ($137,7 \pm 4,5$ in % von Basal bei n=5) (Abb. 4.23).

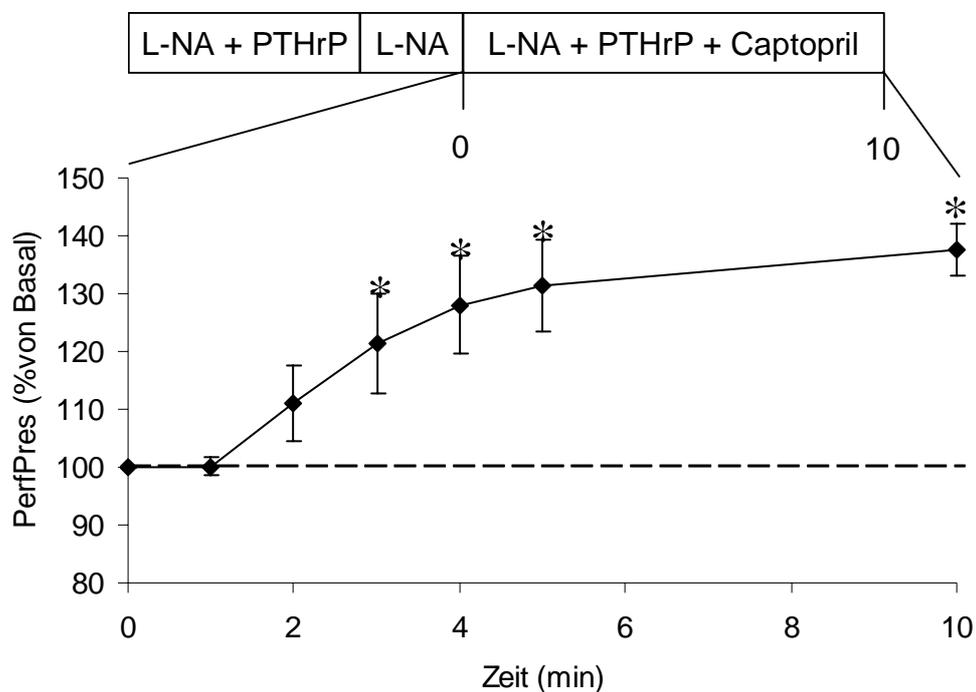


Abb. 4.23: Auftreten einer Vasokonstriktion bei zusätzlicher Perfusion mit Captopril; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von n=5 Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

In Abb. 4.24, der Darstellung der Herzfrequenz, wird deutlich, dass beim Einsatz von Captopril die Herzfrequenz nach der zweiten Perfusion mit PTHrP unverändert blieb, es kam zu keinem positiv chronotropen Effekt ($95,9 \pm 3,0$ in % von Basal bei $n=5$).

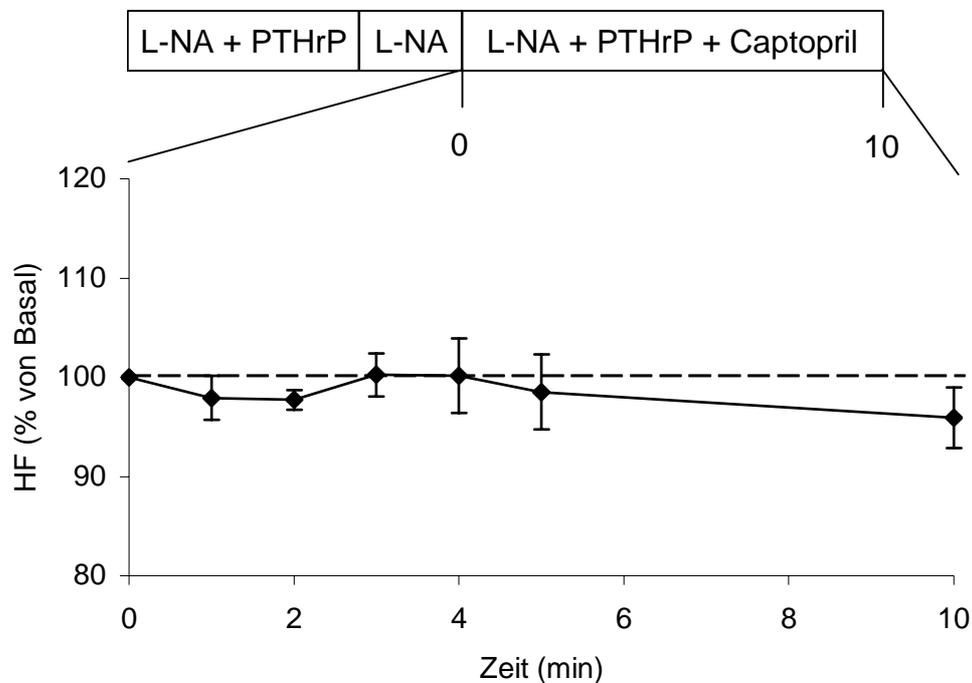


Abb. 4.24: Kein positiv chronotroper Effekt bei einem Einsatz von Captopril; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=5$ Herzen

4.1.4. Perfusion mit PTH

4.1.4.1. Perfusion mit PTH und PTHrP

Bei der folgenden Versuchsreihe wurde sowohl mit PTH als auch mit PTHrP perfundiert. Hierbei wurde nach der 20minütigen Stabilisierung für zehn Minuten mit L-NA ($100\mu\text{M}$) und PTH(1-34), in einer Konzentration von 100nM , perfundiert. Für weitere 20 Minuten erfolgte eine Perfusion mit L-NA ($100\mu\text{M}$), bevor für zehn Minuten L-NA ($100\mu\text{M}$) und PTHrP(1-34) (100nM) appliziert wurden.

Nach dieser letzten Perfusionsphase (Abb.4.25) kam es zu einem deutlichen und signifikanten Abfall des Perfusionsdrucks ($52,3 \pm 8,3$ in % von Basal bei $n=6$).

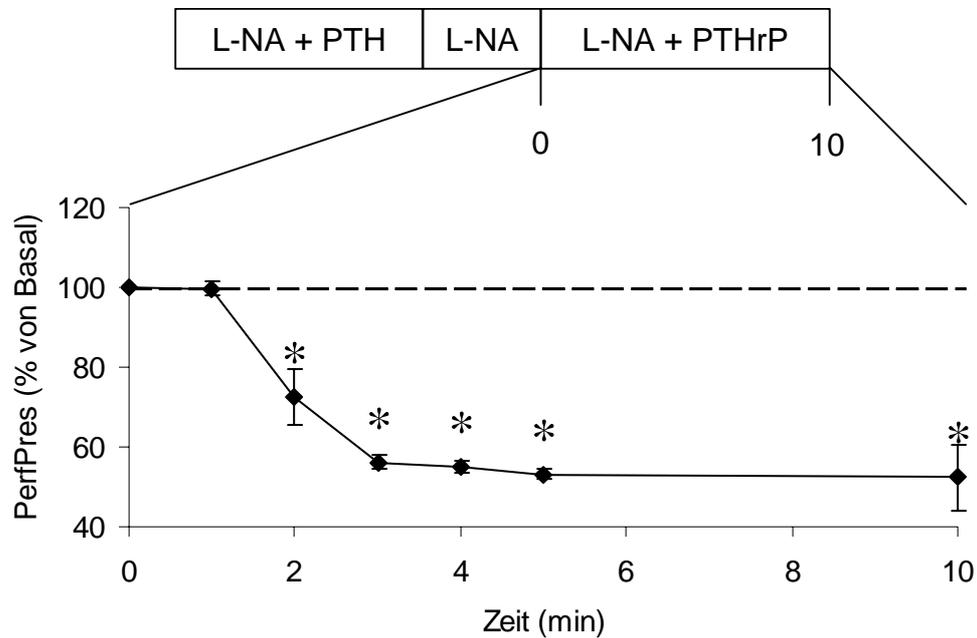


Abb. 4.25: Darstellung der Vasodilatation nach Applikation von PTHrP nach einer Vorbehandlung mit PTH; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=6$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

Bei der Applikation von PTHrP(1-34) kam es, nach einer Vorbehandlung mit PTH(1-34), zum Auftreten eines positiv chronotropen Effekts, der in Abb. 4.26 dargestellt ist ($111,9 \pm 4,4$ in % von Basal bei $n=6$).

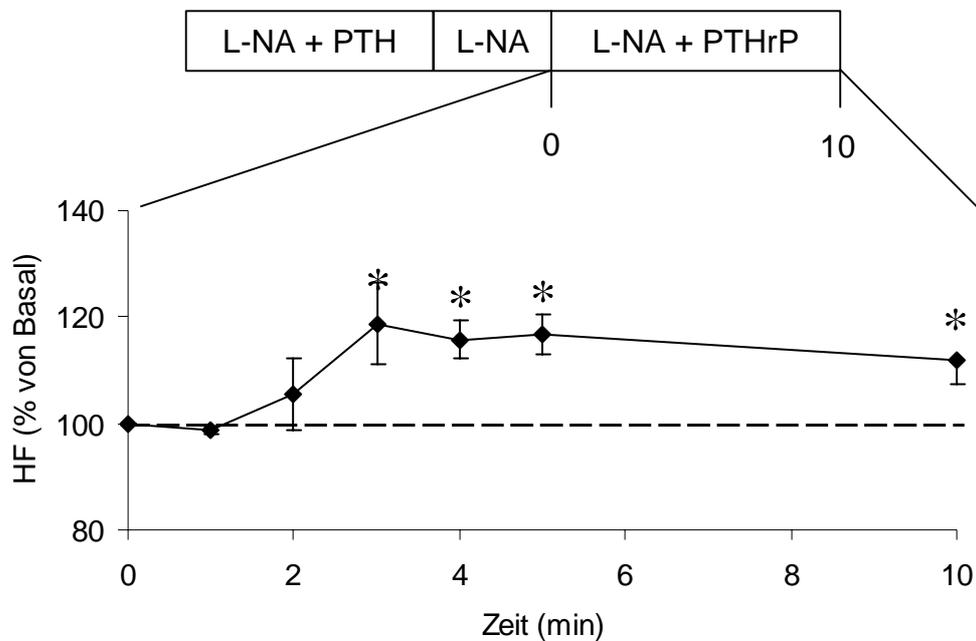


Abb. 4.26: Darstellung des positiv chronotropen Effekts nach einer Vorbehandlung mit PTH und anschließender Applikation von PTHrP; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=6$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.1.4.2. Perfusion mit PTHrP und PTH

Auch diese Versuche wurden anhand des Standardprotokolls durchgeführt. Bei der in Abb. 4.27 und Abb. 4.28 dargestellten Versuchsreihe wurde nach der Stabilisierung für 20 Minuten mit PTHrP(1-34) (100nM) und L-NA (100 μ M) vorbehandelt, worauf eine 20minütige Perfusion mit L-NA (100 μ M) folgte. Anschließend wurde für zehn Minuten mit PTH(1-34) (100nM) und L-NA (100 μ M) perfundiert.

Während dieser letzten Perfusionsphase kam es zu einem allerdings nicht signifikanten Abfall des Aortendrucks (Abb. 4.27) und somit zu einer Vasodilatation (bei Minute 5: $90,7 \pm 5,0$ in % von Basal bei $n=8$).

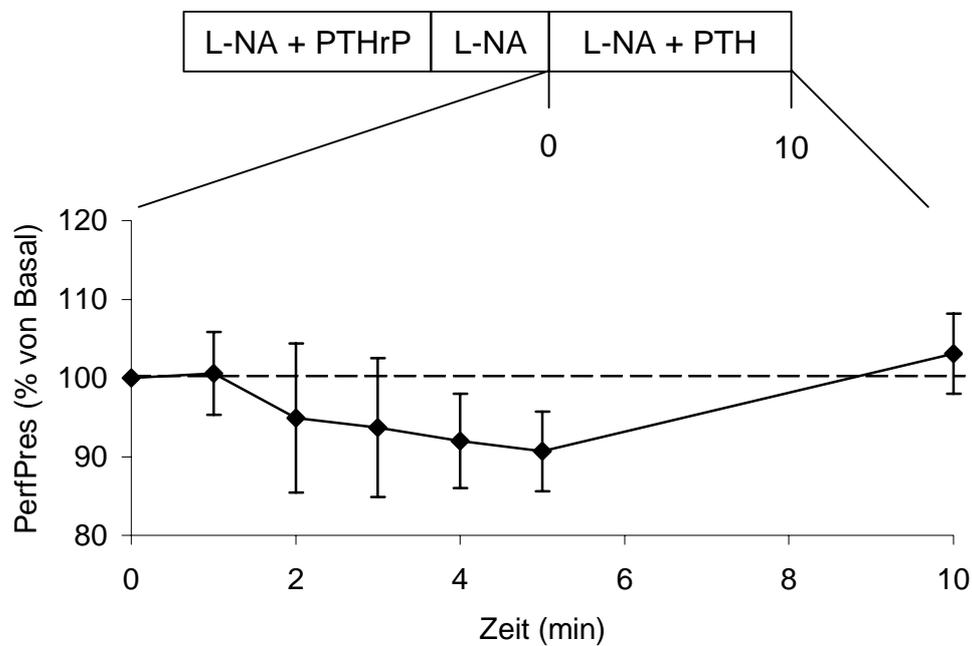


Abb. 4.27: Vasodilatation nach Vorbehandlung mit PTHrP und darauf folgender Applikation von PTH; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ Herzen

In Abb. 4.28 ist die Entwicklung der Herzfrequenz nach der Vorbehandlung mit PTHrP(1-34) (100nM) und der anschließenden Applikation von PTH(1-34) dargestellt, wobei zu erkennen ist, dass es zu keiner deutlichen Veränderung kam ($99,6 \pm 3,5$ in % von Basal bei $n=8$).

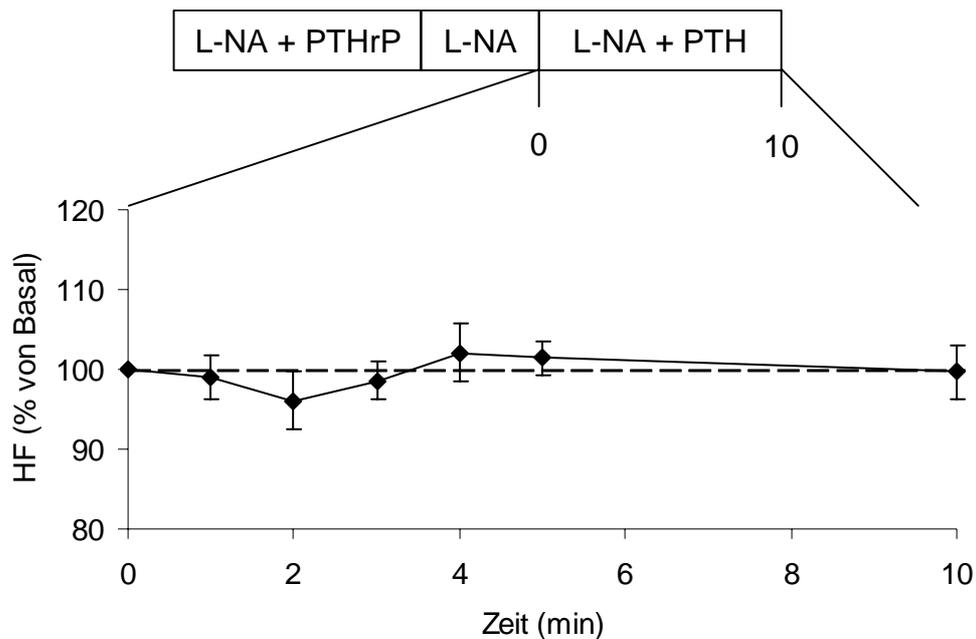


Abb. 4.28: Darstellung der Herzfrequenz nach Vorbehandlung mit PTHrP und darauf folgender Applikation von PTH; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=8$ Herzen

4.1.4.3. Wiederholte Applikation von PTH

Um die Effekte einer wiederholten Perfusion mit PTH zu untersuchen, wurde in dieser Versuchsreihe sowohl für die Vorbehandlung, als auch für die wiederholte Applikation PTH(1-34) eingesetzt. Der Versuchsablauf folgte dem Standardprotokoll. Nach der Stabilisierung wurde also für 20 Minuten mit PTH(1-34) (100nM) und L-NA (100 μ M) perfundiert. Es folgte eine 20minütige Auswaschphase, während welcher mit L-NA (100 μ M) perfundiert wurde. Anschließend erfolgte wiederum eine zehn Minuten dauernde Perfusion mit PTH(1-34) (100nM) und L-NA (100 μ M).

Wie in Abb. 4.29 dargestellt, kam es während dieser zweiten Applikation von PTH(1-34) zu einem signifikanten Abfall des Perfusionsdrucks ($81,7 \pm 7,6$ in % von Basal bei $n=12$).

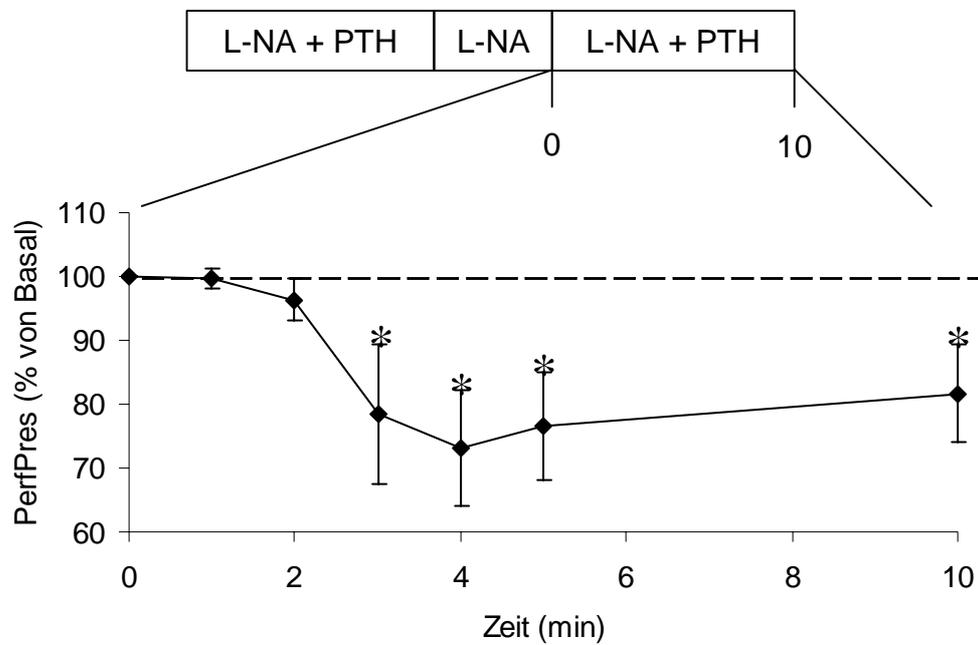


Abb. 4.29: Darstellung der Vasodilatation nach wiederholter Applikation von PTH(1-34); die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=12$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

Abb. 4.30 zeigt die Entwicklung der Herzfrequenz. Bei der wiederholten Applikation von PTH(1-34) wurde ein positiv chronotroper Effekt sichtbar ($109,6 \pm 6,1$ in % von Basal bei $n=12$).

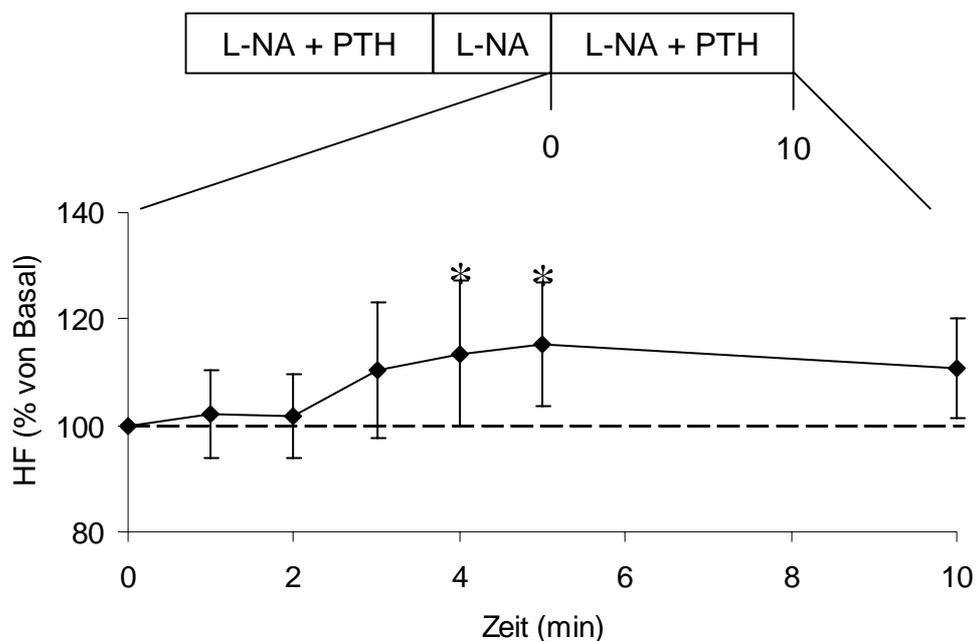


Abb. 4.30: Positiv chronotroper Effekt nach wiederholter Applikation von PTH; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von $n=12$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.2. Untersuchung an isoliert perfundierten Mäuseherzen

4.2.1. Applikation von PTHrP

4.2.1.1. Beispielversuch

Bei den Versuchsreihen mit isolierten Mäuseherzen erfolgte die Perfusion bei den heterozygoten $eNOS^{+/-}$ -Tieren und den homozygoten $eNOS^{-/-}$ Tieren anhand desselben Protokolls. Nach der zwanzigminütigen Stabilisierung (Stab.), während welcher ein Perfusionsdruck von durchschnittlich 70 mm Hg erreicht wurde, wurde für 20 Minuten mit L-NA in einer Konzentration von $100\mu M$ und anschließend mit L-NA der Konzentration $300\mu M$ über zehn Minuten perfundiert. Daraufhin folgte eine zwanzigminütige Perfusion mit L-NA ($100\mu M$) und PTHrP(1-34) ($100nM$), so dass es

zu einer Versuchslänge von 50 Minuten kam. Als Basalwert (100%) wurde der am Ende der Stabilisierung gemessene Perfusionsdruck eingesetzt. In Abb. 4.31 ist ein Beispielversuch anhand des Herzens einer heterozygoten (HE) und des Herzens einer homozygoten (HO) Maus dargestellt. Hier wird der während des gesamten Versuchs höhere Aortendruck der HE-Maus im Vergleich zur HO-Maus deutlich (bei Minute 25: 123,5 in % von Basal (HE), bzw. 94,7 in % von Basal (HO)).

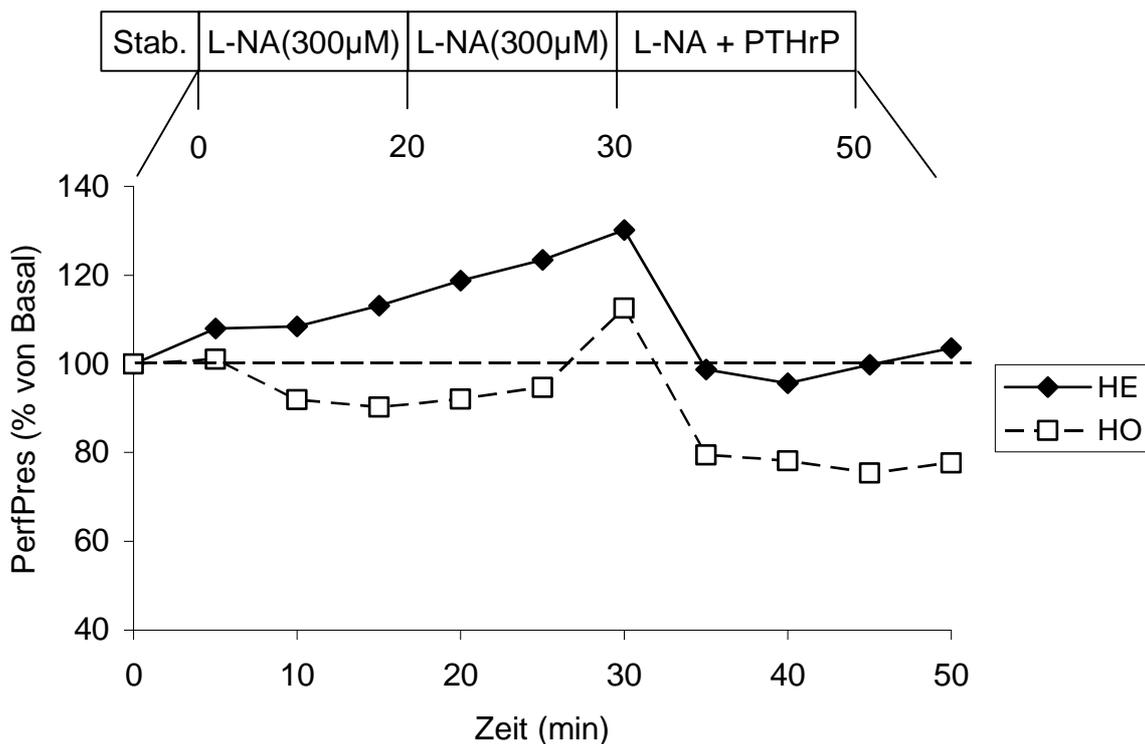


Abb. 4.31: Darstellung des Versuchsablaufs einer Perfusion eines isolierten Mäuseherzens einer HE-, bzw. HO-Maus anhand eines Beispielversuchs; die dargestellten Werte sind bezogen auf den 0 min Wert

4.2.1.2. Wirkung von PTHrP

In Abb. 4.32 ist die Entwicklung des Perfusionsdrucks nach der Applikation von PTHrP(1-34) dargestellt. Der Versuchsablauf erfolgte wie in 4.2.1.1. beschrieben, die Ergebnisse der heterozygoten $eNOS^{+/-}$ -Tiere und der homozygoten $eNOS^{-/-}$ -Tiere sind vergleichend dargestellt. Auch hier wurde der gemessene Perfusionsdruck am Ende der Stabilisierung als Basalwert (100%) eingesetzt. Sowohl bei den Herzen der HE- als auch der HO-Tiere zeigte sich nach Zugabe von PTHrP eine Vasodilatation (bei

Minute 5: $89,7 \pm 5,5$ in % von Basal (HE), bzw. $86,2 \pm 5,9$ in % von Basal (HO) jeweils $n=4$), die insbesondere bei den HE-Herzen nur transient auftrat (bei Minute 20: $103,2 \pm 7,6$ in % von Basal (HE), bzw. $88,9 \pm 7,4$ in % von Basal (HO) jeweils $n=4$).

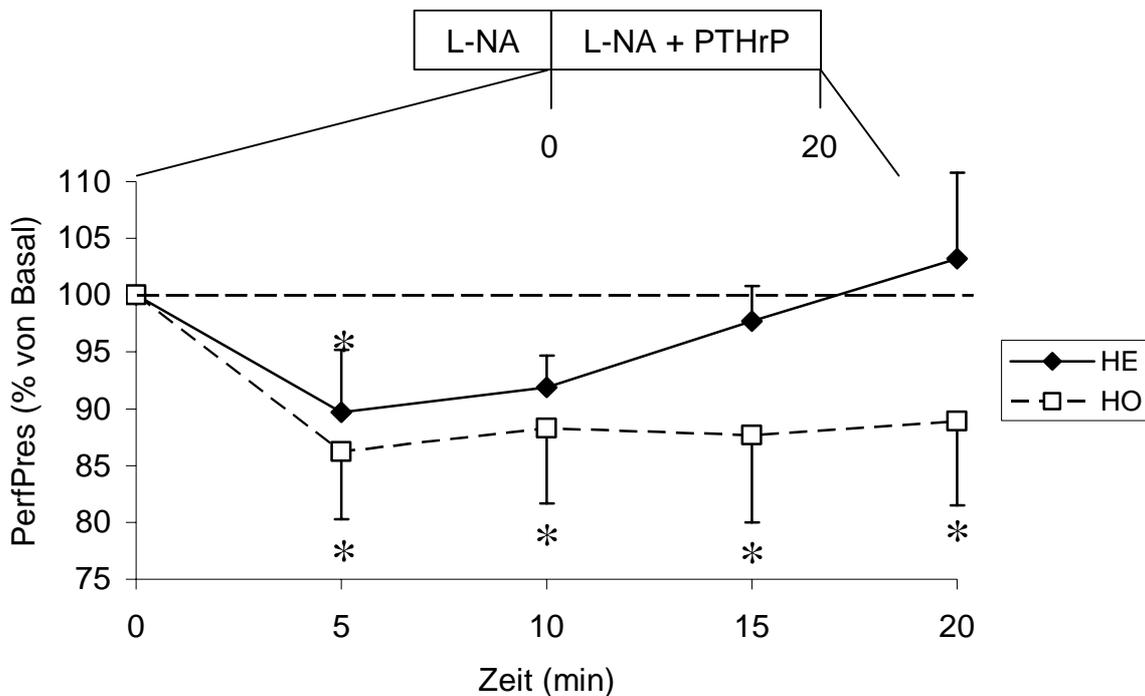


Abb. 4.32: Darstellung der Entwicklung des Perfusionsdrucks bei der Perfusion isolierter Mäuseherzen von HE-, bzw. HO-Mäusen; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von jeweils $n=4$ Herzen, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.3. Untersuchung an Duodenumsegmenten der Ratte

Um die Wirkung von PTHrP auf die glatten Muskelzellen anderer Organe zu untersuchen, wurden Duodenumsegmente der Ratte isoliert und in einem Pufferbad perfundiert. Zur Auswertung wurde die Kontraktionskraft aufgezeichnet, wobei als Basalwert (100%) der am Ende der Stabilisierungsphase gemessene Wert eingesetzt wurde.

4.3.1. einmalige Applikation von PTHrP

Auch die Darmperfusion wurde mit einer Stabilisierungsphase, welche zehn Minuten andauerte, eingeleitet. Wie in Abbildung 4.33 dargestellt, wurde dem Darmpuffer anschließend für drei Minuten Acetylcholin (ACh, 100 μ M) zugesetzt, was zu einer Konstriktion der glatten Darmmuskulatur führte (102,1 \pm 0,7 in % von Basal bei n=5). Anschließend wurde für weitere fünf Minuten PTHrP(1-34) (100nM) hinzugefügt, wobei es zu einer Abnahme der Kontraktionskraft kam (99,6 \pm 0,4 in % von Basal bei n=5).

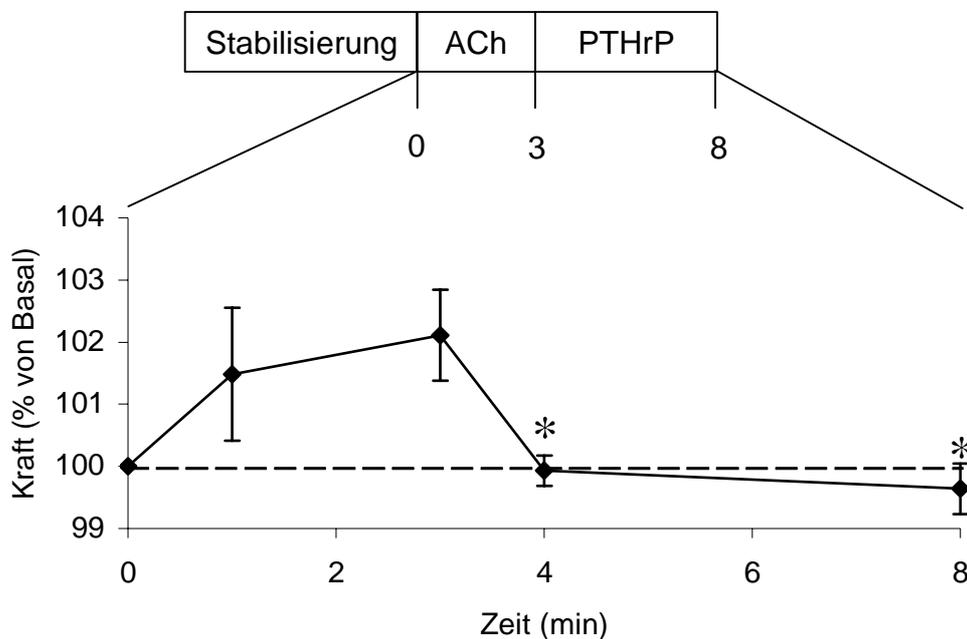


Abb. 4.33: Abnahme der Kontraktionskraft nach einmaliger Applikation von PTHrP; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von jeweils n=5 Duodenumsegmenten, *: p<0,05 vs. ACh

4.3.2. Wiederholte Applikation von PTHrP

Bei dieser Versuchsreihe wurde nach der zehnminütigen Stabilisierung für fünf Minuten mit PTHrP(1-34) (100nM) perfundiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und eine weitere zehnminütige Stabilisierungsphase (Stab) in unverändertem Darmpuffer durchgeführt. Der am Ende dieser Phase gemessene

Wert wurde als Basalwert (100%) eingesetzt. Es folgte eine dreiminütige Perfusion mit ACh (100 μ M), bevor für fünf Minuten mit PTHrP(1-34) (100nM) perfundiert wurde. Wie in Abbildung 4.34 gezeigt, kommt es auch nach wiederholter Applikation von PTHrP zu einer Abnahme der Kontraktionskraft ($99,4 \pm 0,3$ in % von Basal bei $n=5$) im Vergleich zu den unter ACh-Einfluss gemessenen Werten.

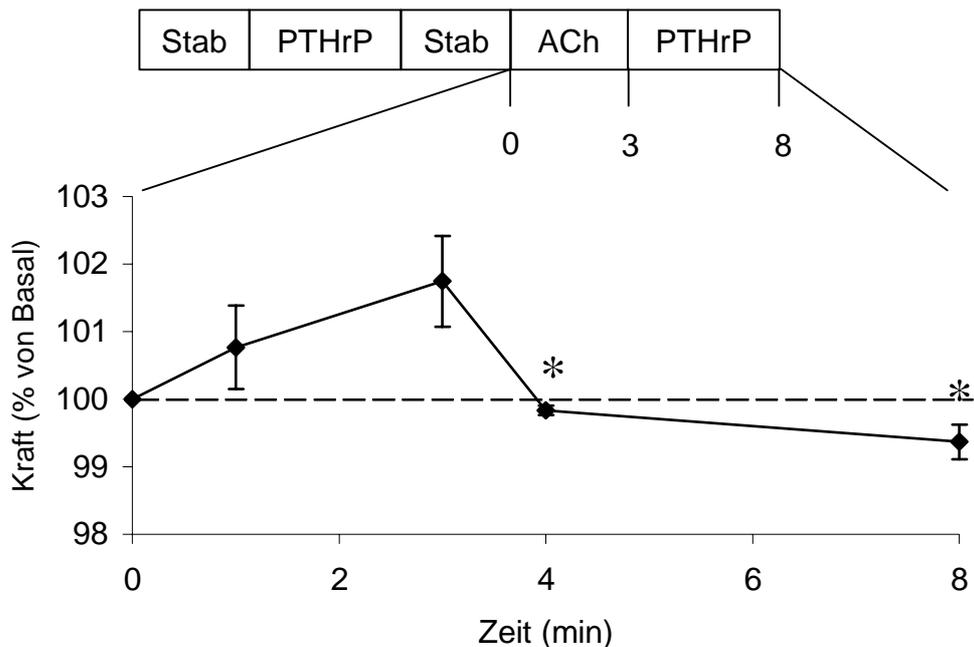


Abb. 4.34: Abnahme der Kontraktionskraft nach wiederholter Applikation von PTHrP; die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von jeweils $n=5$ Duodenumsegmenten, *: $p < 0,05$ vs. Basal

4.3.3. Vorbehandlung mit PTHrP(7-34)

In der in Abbildung 4.35 dargestellten Versuchsreihe wurde zur Vorbehandlung PTHrP(7-34) in einer Konzentration von 100nM eingesetzt. Der Versuchsablauf entspricht dem in 4.3.2. beschriebenen. Auch hier wurde der am Ende der zweiten Stabilisierungsphase (Stab) gemessene Wert als Basalwert (100%) eingesetzt, ACh (100mM) wurde wiederum zur Vorkonstriktion benutzt ($102,3 \pm 0,5$ in % von Basal bei $n=5$), die zweite Applikation erfolgte mit PTHrP(1-34) (100nM).

Auch hier kam es nach der Applikation von PTHrP(1-34) zu einer Abnahme der Kontraktionskraft ($99,5 \pm 0,2$ in % von Basal bei $n=5$).

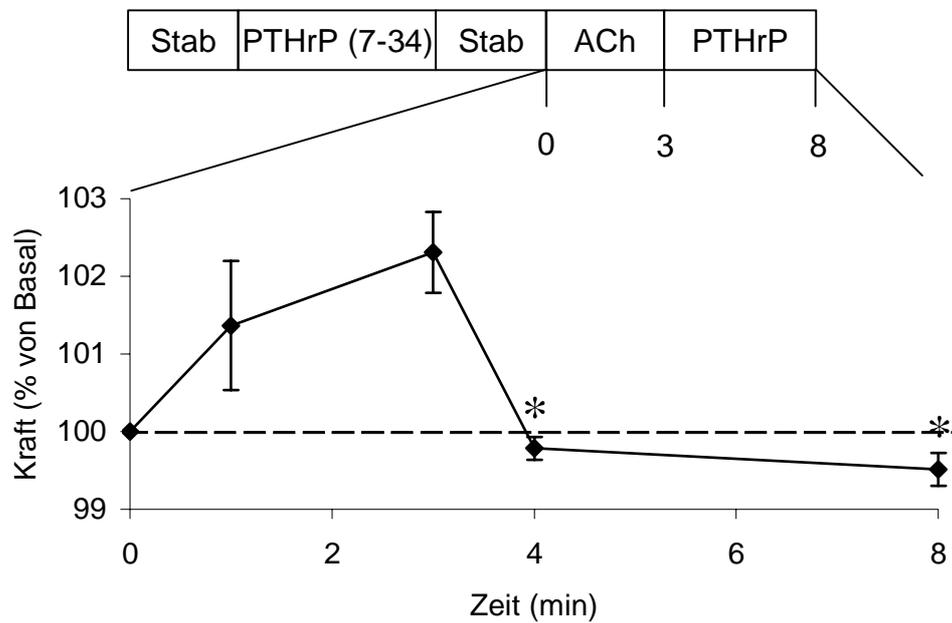


Abb. 4.35: Abnahme der Kontraktionskraft nach Vorbehandlung mit PTHrP (7-34); die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler bezogen auf den 0 min Wert von jeweils $n=5$ Duodenumsegmenten, *: $p < 0,05$ vs. Basal

5. Diskussion

5.1. Hauptbefunde

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von PTHrP auf die Koronargefäße von isoliert perfundierten Herzen untersucht. Dabei konnte bei einer einmaligen Applikation von PTHrP der bekannte vasodilatierende Effekt (CLEMENS et al. 2001a) bestätigt werden. Bei einer wiederholten Applikation führte PTHrP jedoch über eine Rezeptordesensibilisierung zu einem paradoxen Effekt, nämlich zu einer Vasokonstriktion.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Desensibilisierung, als auch der paradoxe Effekt konzentrationsabhängig sind und einer intakten Bindungsdomäne bedürfen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die paradoxe Wirkung von PTHrP weder durch β -adrenerge Stimulation, noch durch PTH imitieren lässt. Eine Vermittlung der paradoxen Vasokonstriktion über Endothelin, Angiotensin II oder den PTH2-Rezeptor konnte ausgeschlossen werden.

Bei der Untersuchung an isoliert perfundierten Mäuseherzen konnte festgestellt werden, dass der Beitrag von PTHrP zur Koronarperfusion in Mäusen geringer und transient ausfällt, aber nicht NO-vermittelt ist.

Schlussendlich konnte nachgewiesen werden, dass sich die gewonnenen Erkenntnisse über das Auftreten eines paradoxen Effekts nicht auf die glatte Muskulatur des Duodenums übertragen lassen.

5.2. Desensibilisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors

PTHrP ist ein bekannter Vasodilator und auch der positiv chronotrope Effekt des PTHrP ist nachgewiesen worden (OGINO et al. 1995). In einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihe mit einer einmaligen Perfusion isolierter Rattenherzen mit PTHrP konnten sowohl der vasodilatative Effekt, als auch die positive Chronotropie des PTHrP bestätigt werden.

Jedoch berichteten NYBY et al. nach Versuchen mit isolierten Arteriensegmenten und kultivierten vaskulären Glattmuskelzellen, dass eine verlängerte Exposition mit PTHrP zu einer Desensibilisierung des vaskulären Gewebes in Bezug auf weitere

Effekte des Peptids führt (NYBY et al. 1995). Daher wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Perfusion mit PTHrP wiederholt durchgeführt. Bei dieser wiederholten Stimulation des PTH/PTHrP-Rezeptors kommt es jedoch nicht wie erwartet zu einer Vasodilatation. Die zweimalige Perfusion isolierter Rattenherzen mit PTHrP führte zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion, also einem paradoxen Effekt. Auch die positive Chronotropie, die bei einer einmaligen Stimulation mit PTHrP auftritt, ist nach einer zweimaligen Applikation nicht nachzuweisen. Demnach zeigt diese Arbeit, dass es durch die erste Applikation von PTHrP zu einer Desensibilisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors kommt, welche sich im Auftreten des paradoxen Effekts während der zweiten PTHrP-Applikation zeigt.

In weiteren Versuchsreihen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Auftreten der Rezeptordesensibilisierung, als auch das Erscheinen des paradoxen Effekts abhängig von der zur Stimulation eingesetzten PTHrP-Konzentration ist. Eine niedrige Dosierung führt also bei der ersten Perfusion nicht zu einer Desensibilisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors, so dass es bei der zweiten Applikation (in Standarddosierung) weder zu einer Vasokonstriktion, noch zur völligen Aufhebung der positiven Chronotropie kommt. Ähnlich verhält es sich im umgekehrten Fall. Nach der Rezeptordesensibilisierung durch die PTHrP-Applikation in Standarddosierung reicht eine niedrigere Dosierung bei der zweiten Applikation nicht aus, um einen paradoxen Effekt auszulösen.

In Versuchen zur Kinetik der Rezeptordesensibilisierung konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine mehrmals wiederholte, kurzzeitige Applikation von PTHrP zu einer Abnahme des vasodilatativen Effekts führte. Eine Auswertung der Herzfrequenz zeigt, dass auch das Auftreten der positiven Chronotropie nach mehrmaliger, kurzzeitiger Perfusion mit PTHrP zum Erliegen kommt. Demnach tritt eine sich langsam entwickelnde Desensibilisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors auf.

5.3. Desensibilisierung und Paradoxie bedürfen eines intakten N-Terminus des PTHrP

Um den Vorgang der Rezeptordesensibilisierung genauer zu untersuchen, wurde PTHrP(7-34) als Rezeptorantagonist eingesetzt. Da diesem die

Adenylatcyclaseaktivierungsdomäne für den cAMP/PKA-Signalweg fehlt, kann PTHrP(7-34) zwar an den PTH/PTHrP-Rezeptor binden, diesen allerdings nicht aktivieren (HOARE und USDIN 2000). Da eine Vorbehandlung mit PTHrP(7-34) bei der nachfolgenden Perfusion mit PTHrP(1-34) zu keinem paradoxen Effekt führte, konnte somit gezeigt werden, dass zur Desensibilisierung des Rezeptors eine vorherige Aktivierung notwendig ist.

In den weiteren Untersuchungen zur Abhängigkeit des paradoxen Effekts von der Vollständigkeit des N-Terminus des PTHrP, konnte nach einer Desensibilisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors mit PTHrP(1-34) und einer Applikation von PTHrP(7-34) kein Anstieg des Perfusionsdrucks festgestellt werden. Das Fehlen dieser paradoxen Vasokonstriktion weist daraufhin, dass eine vollständige Adenylatcyclase-aktivierende Domäne nicht nur für die Rezeptordesensibilisierung, sondern auch für das Auslösen der Paradoxie notwendig ist.

5.4. β -adrenerge Stimulation kann PTHrP nicht imitieren

Es wurde bereits gezeigt, dass die meisten der bisher bekannten Effekte von PTHrP durch eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs vermittelt werden (GARDELLA und JÜPPNER 2000). Um festzustellen, ob eine einfache Stimulation des cAMP/PKA-Signalwegs ausreicht, um zu einer Rezeptordesensibilisierung zu führen, sowie eine Paradoxie auszulösen, wurde in weiteren Versuchsreihen Isoprenalin (Synonym Isoproterenol) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Katecholamin, welches über β -Rezeptoren zu einer adrenergen Stimulation des cAMP/PKA-Signalwegs führt, jedoch kaum Wirkung auf α -Rezeptoren ausübt. Isoprenalin wirkt am Herzen sowohl positiv inotrop als auch positiv chronotrop und führt zu einer peripheren Vasodilatation (LÖSCHER et al. 2003).

So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit Isoprenalin bei der anschließenden Applikation von PTHrP nicht zu einer Vasokonstriktion führte. Auch der positiv chronotrope Charakter des PTHrP blieb erhalten.

Daraufhin wurde im Verlauf dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob eine Rezeptordesensibilisierung durch PTHrP(1-34) mit anschließender Applikation von Isoprenalin zu einem gesteigerten Perfusionsdruck führen würde. Auch in diesem

Fall konnte jedoch festgestellt werden, dass eine mehrmalige Stimulation des cAMP/PKA-Signalwegs nicht ausreicht um eine Paradoxie zu bewirken, so dass deutlich wird, dass eine β -adrenerge Stimulation die Wirkung einer wiederholten PTHrP-Applikation nicht zu imitieren vermag.

5.5. Paradoxe Effekt nicht PTH2R abhängig

Der bisher bekannte Rezeptor, welcher der Vermittlung der bisher untersuchten PTHrP-Effekte dient, ist der PTH/PTHrP-Rezeptor, auch als PTH1R bezeichnet (JÜPPNER et al. 1991; CLEMENS et al. 2001a). Es besteht jedoch eine enge Verwandtschaft zum PTH2R, welcher, da er eine hohe Liganden-Selektivität besitzt, scheinbar nicht durch PTHrP aktiviert werden kann (USDIN 1997). Um festzustellen, ob die Ursache des paradoxen Effekts möglicherweise in einer Beteiligung dieses PTH2R liegen könnte, wurden weitere Versuche mit (Trp²³,Tyr³⁶) PTHrP(1-36) und TIP39 durchgeführt. (Trp²³,Tyr³⁶)PTHrP(1-36) ist ein PTH2-Rezeptor-Antagonist und ein PTH1-Rezeptor-Agonist. Es bindet mit einer hohen Affinität an den PTH2R ohne diesen Rezeptor zu aktivieren, aktiviert aber gleichzeitig den PTH1R (BERGWITZ et al. 1997). Bei TIP39 handelt es sich um ein 1999 von USDIN et al. isoliertes Protein, welches potent und selektiv den PTH2-Rezeptor aktiviert (USDIN et al. 1999; GOOLD et al. 2001).

Bei einer Perfusion zuerst mit (Trp²³,Tyr³⁶) PTHrP(1-36) und anschließend mit TIP39 konnte festgestellt werden, dass nach einer ausschließlichen Aktivierung des PTH1R eine anschließende Stimulation mit TIP39 nicht zu einer paradoxen Vasokonstriktion führt, das Auftreten dieser Paradoxie also unabhängig von einer Beteiligung des PTH2R ist. Dies geht konform mit der oben erwähnten Erkenntnis von USDIN, der 1997 beschrieben hatte, dass eine Aktivierung des PTH2R durch PTHrP(1-34) nicht möglich ist (USDIN 1997).

5.6. Paradoxe Effekt nicht Endothelin-vermittelt

Endothelin ist ein aus 21 Aminosäuren zusammengesetztes Peptid, welches über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, ET_A und ET_B, kardiovaskuläre Wirkung aufweist. Über den ET_A-Rezeptor, der sich in Glattmuskelzellen befindet, wirkt Endothelin über den Phospholipase C-Signalweg als hochwirksamer, lang

anhaltender Vasokonstriktor. Der ET_B -Rezeptor findet sich in deutlich geringeren Anteilen in Glattmuskelzellen, wo er an der Entstehung einer Vasokonstriktion beteiligt ist. Weitaus häufiger ist er in Endothelzellen nachzuweisen, wo er durch eine NO-Freisetzung zu einer Vasodilatation führt (LÜSCHER und BARTON 2000; DAVENPORT 2002). SCHLÜTER et al. konnten 2001 nachweisen, dass ein N-terminales PTHrP-Peptid, welchem die PTH/PTHrP-Rezeptorbindungsdomäne fehlt, an den kardialen ET_A -Rezeptor binden und ihn außerdem aktivieren kann (SCHLÜTER et al. 2001). Daher wurde bei den für diese Arbeit stattfindenden Untersuchungen PD142893 eingesetzt, um eine Mitwirkung von endogen freigesetztem Endothelin an der Entstehung des paradoxen Effekts auszuschließen. Bei PD142893 handelt es sich um ein Hexapeptid, welches nicht selektiv als ET_A - und ET_B -Rezeptorantagonist wirkt (MIZUGUCHI et al. 1997).

Eine Beteiligung von Endothelin an der Entstehung der paradoxen Vasokonstriktion kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da es trotz Hemmung der ET_A - und ET_B -Rezeptoren durch PD14293 während der zweiten Perfusionsphase mit PTHrP(1-34) zum Auftreten der paradoxen Vasokonstriktion kommt.

5.7. Paradoxe Effekt ist durch ACE-Hemmer nicht aufhebbar

In der Angiotensinkaskade wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Angiotensin I in das aktive Angiotensin II überführt. Angiotensin II ist eines der stärksten körpereigenen vasokonstriktorisches Peptidhormone, welches außerdem eine positiv inotrope Wirkung besitzt. Weiterhin führt ACE zu einer Inaktivierung von Bradykinin, einem endogenen Vasodilator (LÖSCHER et al. 2003). Durch den Einsatz eines ACE-Hemmers wird diese Kaskade unterbrochen und eine mögliche Beteiligung von Angiotensin II an der Entstehung der paradoxen Vasokonstriktion durch PTHrP könnte ausgeschlossen werden. Captopril, der Prototyp der ACE-Hemmer (LÖSCHER et al. 2003), wurde also eingesetzt um die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II zu unterbinden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass auch unter Einsatz eines ACE-Hemmers bei einer wiederholten Perfusion mit PTHrP eine ausgeprägte Vasokonstriktion deutlich wird und zusätzlich keine positive Chronotropie mehr

auftritt, somit also die Angiotensinkaskade keinen Einfluss auf die Ausbildung des paradoxen Effekts durch PTHrP hat.

5.8. Keine Desensibilisierung und Paradoxie durch PTH

PTH ist ein Peptidhormon, welches von der Nebenschilddrüse freigesetzt wird. Es ist mit PTHrP strukturell eng verwandt, beide haben in zahlreichen Zielzellen ähnliche Funktionen (SCHLÜTER 1999). Die klassischen Zielzellen von PTH befinden sich in den Knochen und den Nieren, sie werden über den cAMP/PKA-Signalweg aktiviert (GARDELLA und JÜPPNER 2000). Zu den nicht klassischen Zielzellen gehören sowohl Schrittmacherzellen, als auch Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen. Letztere werden ebenfalls über cAMP und PKA aktiviert, die Aktivierung der Herzmuskelzellen erfolgt jedoch über den PLC/PKC-Signalweg (SCHLÜTER 1999). Im kardiovaskulären System wirkt PTH positiv chronotrop und führt über eine Relaxation glatter Muskelzellen zu einer Vasodilatation und ist somit hypotensiv (SHAN et al. 1994).

Da PTH und PTHrP zwischen den ersten 34 Aminosäuren eine teilweise Homologie aufweisen, vor allem die ersten 13 Aminosäuren stimmen nahezu überein, und in diesem Abschnitt sowohl die Bindungsdomäne, als auch der Bereich zur Rezeptoraktivierung liegen, wird deutlich, wieso sie an den gleichen Rezeptor, den PTH1R, binden können (GARDELLA und JÜPPNER 2000; CLEMENS et al. 2001a). Nachdem im Rahmen dieser Arbeit festgestellt wurde, dass für das Auftreten des paradoxen PTHrP-Effekts eine Desensibilisierung des PTH1R durch PTHrP(1-34) notwendig ist, stellte sich anschließend die Frage, ob diese auch mit einer Stimulation durch PTH zu erreichen ist.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine primäre Applikation von PTH bei der nachfolgenden Perfusion mit PTHrP nicht zu einer paradoxen Konstriktion führte und somit also nicht zu einer für das Auftreten dieses Effekts notwendigen Rezeptordesensibilisierung. Auch eine Perfusion in umgekehrter Reihenfolge, Vorbehandlung mit PTHrP und anschließende Stimulation mit PTH, führte zu keinem paradoxen Effekt. PTH besitzt also weder die Fähigkeit den entsprechenden Rezeptor zu desensibilisieren, noch, nach erfolgter Desensibilisierung, eine paradoxe Vasokonstriktion auszulösen. Diese Ergebnisse wurden durch die Versuchsreihe mit wiederholter PTH-Perfusion untermauert. Auch hier konnte kein paradoxer Effekt

beobachtet werden. Zusammengefasst scheinen die Erkenntnisse aus den PTH-Versuchsreihen daraufhin zu weisen, dass der bereits für PTH und PTHrP beschriebene PTH1-Rezeptor (GARDELLA und JÜPPNER 2000) nicht für das paradoxe Verhalten von PTHrP verantwortlich sein kann, sondern dass an dessen Auftreten Rezeptoren, bzw. Rezeptoruntereinheiten beteiligt sein müssen, die von PTH nicht aktiviert und desensibilisiert werden können.

5.9. Perfusion isolierter Mäuseherzen

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Freisetzung von NO über den PTH1-Rezeptor vermittelt werden kann, und somit NO als möglicher second messenger im PTHrP-Signalweg in Frage kommt (KALINOWSKI et al. 2001; MASSFELDER und HELWIG 2003). Bei der NO-Synthetase lassen sich drei Isozyme unterscheiden, welche in verschiedenen Zelltypen der Produktion von NO dienen. eNOS ist hiervon die wichtigste im Herzen exprimierte Isoform. Es kommt hauptsächlich in vaskulären, aber auch in endokardialen Endothelzellen, sowie in vaskulären Glattmuskelzellen vor. Unter physiologischen Bedingungen ist das in Endothelzellen produzierte NO an der Erhaltung des vaskulären Tonus beteiligt und wirkt vasodilatatorisch. eNOS ist also essentiell für die Erhaltung eines normalen Blutdrucks und einer stabilen Herzfrequenz. Konform gehend mit dieser eNOS-Funktion konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass homozygote eNOS^{-/-}-„knock-out“-Mäuse sowohl einen erhöhten Blutdruck, als auch eine verminderte Herzfrequenz aufweisen (SHESELY et al. 1996; MUNGRUE et al. 2002). Bei den für diese Arbeit verwendeten eNOS-„knock-out“-Mäusen wurde das eNOS-Gen durch einen Austausch des Exons 12 deaktiviert und somit die für die eNOS-Funktion notwendige Calmodulin-Bindungsdomäne unterbrochen (SHESELY et al. 1996). Für die gezeigte Versuchsreihe, bei welcher vor der einmaligen PTHrP-Applikation mit L-NA vorkonstringiert wurde, wurden sowohl heterozygote eNOS^{+/-}-Mäuse, als auch homozygote eNOS^{-/-}-Tiere eingesetzt, so dass ein direkter Vergleich der PTHrP-Wirkung möglich war. Bei beiden Gruppen kam es nach der Stimulation mit PTHrP zu einer deutlichen Vasodilatation, einer bereits erwähnten Wirkungsweise von PTHrP, allerdings trat diese vor allem bei den heterozygoten eNOS^{+/-}-Mäusen nur vorübergehend auf.

Somit konnte bei der Untersuchung an isoliert perfundierten Mäuseherzen festgestellt werden, dass der Einfluss von PTHrP bei der Koronarperfusion in Mäusen deutlich geringer und transient ausfällt und nicht durch NO vermittelt wird.

5.10. Keine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die glatte Muskulatur des Darms

1989 konnten MOK et al. an Ratten und Schweinen zeigen, dass PTHrP zu einer deutlich Relaxierung von Glattmuskelzellen in unterschiedlichen Bereichen des Gastrointestinaltrakts führt (MOK et al. 1989a; MOK et al. 1989b). Diese Erkenntnisse konnten von BOTELLA et al. bestätigt werden, die 1994 ebenfalls eine durch PTHrP ausgelöste Relaxation intestinaler Glattmuskelzellen feststellen konnten. Sie wiesen weiterhin nach, dass für diesen Effekt die Aminosäuresequenz 1-34 benötigt wird und dass die beschriebene Relaxation über eine Aktivierung der Adenylatzyklase und der PKA vermittelt wird (BOTELLA et al. 1994). Der wahrscheinliche Rezeptor für die relaxierenden Effekte des PTHrP an intestinalen Glattmuskelzellen ist der PTH1R. Eine verbreitete Expression von PTH1-Rezeptorgenen konnte 1995 von LI et al. nachgewiesen werden (LI et al. 1995). WATSON et al. konnten PTH1R-Proteine sowie zugehörige mRNA im Dünndarm nachweisen (WATSON et al. 2000) und GENTILI et al. wiederum zeigten das Vorhandensein des PTH1R sowohl in absorptiven Endothelzellen, als auch in anderen Duodenalzellen (GENTILI et al. 2003).

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte sich die Frage, ob eine wiederholte Stimulation mit PTHrP auch bei der intestinalen glatten Muskulatur, analog zur glatten Muskulatur des vaskulären Systems, einen paradoxen Effekt auszulösen vermag, die bisherigen Ergebnisse also auch auf andere Organe mit glatter Muskulatur übertragbar sind.

In einer ersten Versuchsreihe mit isolierten Duodenumfragmenten konnte der oben beschriebenen Effekt, die relaxierende Wirkung von PTHrP, bestätigt werden. Nach einer Vorkonstriktion durch ACh führte eine einmalige Applikation von PTHrP(1-34) zu einer deutlich Abnahme der Kontraktionskraft. Auch in der zweiten Versuchsreihe, bei der erst mit PTHrP(1-34) vorbehandelt, anschließend wiederum ACh zur Konstriktion eingesetzt wurde, bevor ein weiteres mal mit PTHrP(1-34) perfundiert wurde, kam es nach der zweiten PTHrP-Applikation zu einer deutlichen Relaxation

des isolierten Duodenumsegments. Es kommt also, im Gegensatz zur Perfusion isolierter Herzen, zu keiner paradoxen Konstriktion der glatten Muskulatur. Auch eine Vorbehandlung mit PTHrP(7-34), welches, wie bereits unter 5.1. beschrieben, als PTH1R Rezeptorantagonist fungiert, beeinflusst die nach der zweiten Perfusion mit PTHrP(1-34) auftretende Relaxation nicht.

Somit zeigen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse eindeutig, dass die Erkenntnisse aus der Herzperfusion nicht auf die glatte intestinale Muskulatur übertragbar sind. Das Fehlen eines paradoxen Effekts bei der Darmperfusion weist also daraufhin, dass es sich bei diesem um einen herzspezifischen Effekt handelt.

5.11. Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse geben neue Einblicke über die Wirkung von PTHrP im kardiovaskulären System. Der bisher noch nicht beschriebene paradoxe Effekt legt nahe, dass PTHrP am Herzen nicht als reiner Vasodilator wirkt, sondern auch vasokonstriktorisch auf die Koronarperfusion Einfluss nimmt. Weiterhin unterstreichen die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen die bereits von SCHLÜTER beschriebenen Ergebnisse, dass PTH und PTHrP trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit und ähnlicher Wirkungsweisen auch im kardiovaskulären System unterschiedliche Funktionen innehaben (SCHLÜTER 1999).

Der genaue Signalweg der von PTHrP ausgelösten paradoxen Vasokonstriktion konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht hinreichend geklärt werden, jedoch konnte unter anderem deutlich gemacht werden, dass zu ihrem Auftreten eine vollständige Bindungs- und Aktivierungsdomäne des PTHrP benötigt wird. Ausgeschlossen werden konnten durch die dargestellten Untersuchungen außerdem eine Vermittlung des paradoxen Effekts über Endothelin, sowie über die Angiotensin-Kaskade. Weiterhin konnte eine Beteiligung des PTH2-Rezeptors an der Entstehung der Paradoxie ausgeschlossen werden. Dies, und die Erkenntnis, dass der vasokonstriktorische Effekt des PTHrP nicht durch PTH zu imitieren ist, scheinen Hinweise darauf zu sein, dass ein anderer Rezeptor, als die bisher beschriebenen PTH1- und PTH2-Rezeptoren, bzw. eine bisher unbekannte Rezeptoruntereinheit, an den beschriebenen PTHrP-Effekten beteiligt ist.

Da die Erkenntnisse über die vasokonstriktorisches Fähigkeiten des PTHrP in den in dieser Arbeit beschriebenen Darmpräparationen nicht reproduzierbar waren, scheinen sie nicht ohne weiteres auf andere Glattmuskelzellen übertragbar zu sein, so dass es sich hierbei vermutlich um eine herzspezifische Wirkungsweise des PTHrP handelt.

6. Zusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit wurde die Wirkung von parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) auf das kardiovaskuläre System untersucht. Dazu wurde eine Perfusion isolierter Ratten- und Mäuseherzen nach Langendorff durchgeführt. Weiterhin wurde durch die Perfusion isolierter Duodenumfragmente der Einfluss von PTHrP auf die glatte Muskulatur im Gastrointestinaltrakt von Ratten beobachtet.

PTHrP ist ein Peptidhormon, welches nahezu ubiquitär im Körper produziert wird, wobei es im kardiovaskulären System hauptsächlich in Glattmuskelzellen, aber auch in Endothelzellen exprimiert wird. Hier führt PTHrP über eine Relaxation der Glattmuskelzellen zu einer Gefäßdilatation und somit zu einer Regulation des lokalen Blutflusses. Dieser Effekt ist auf eine Aktivierung des PTH1-Rezeptors zurückzuführen, wobei PTHrP hauptsächlich über den cAMP/PKA-Signalweg wirkt. Weiterhin übt PTHrP sowohl positiv chronotrope, als auch positiv inotrope Effekte aus. Letztere werden durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase in ventrikulären Kardiomyozyten ausgelöst. Kommt es zu einer verlängerten Exposition von PTHrP im vaskulären Gewebe führt dies zu einer Desensibilisierung und zu einer Abnahme weiterer auslösbarer Effekte.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte Exposition von PTHrP zu einer Rezeptordesensibilisierung mit anschließendem paradoxen Effekt führt. Dieser paradoxe Effekt ist durch eine Vasokonstriktion und die Aufhebung der positiven Chronotropie gekennzeichnet. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Auftreten dieses Effekts weder über Endothelin, Angiotensin II noch über den PTH2-Rezeptor vermittelt wird. Weiterhin wird eine intakte Bindungsdomäne benötigt und eine Imitation der Paradoxie durch PTH oder eine β -adrenerge Stimulation war nicht möglich.

Eine Übertragbarkeit der Befunde auf die glatte Darmmuskulatur konnte nicht nachgewiesen werden.

Somit scheint für die Ausbildung der paradoxen Vasokonstriktion ein anderer Rezeptor oder ein anderer Signalweg als die bisher beschriebenen verantwortlich zu sein.

7. Summary

In the present study the influence of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) on the coronary vasculature was explored. Experiments were performed with isolated rat and mice hearts which were perfused in the Langendorff mode. Also the contraction of small rat intestine segments perfused with PTHrP were measured.

PTHrP is a member of the parathyroid hormone (PTH)-peptide family which is expressed in various mammalian tissues. Among cardiovascular cells PTHrP is mostly expressed by smooth muscle cells, but also by endothelial cells. PTHrP release contributes to the decrease of blood pressure by acting directly on smooth muscle cells. This effect is mainly caused by an activation of the PTH1-receptor and the cAMP/PKA-pathway. Furthermore besides its vasodilatory effects PTHrP exerts positive inotropic and positive chronotropic effects on ventricular cardiomyocytes. A prolonged exposition of PTHrP to vasculare tissues causes a desensitisation.

The present study shows that a repeated perfusation of rat hearts with PTHrP causes not only a receptor desensitisation but also generates an adverse effect leading to vasoconstriction. It could be shown that this effect could not be mimicked by β - adrenergic stimulation or by administration of PTH. As well it could be demonstrated that endothelin, angiotensin II and the PTH2-receptor do not participate in the development of the observed paradoxical vasoconstriction.

In contrast to the cardiac smooth muscle there is no paradox constriction in smooth muscles of the intestinal tract.

Therefore it seems that receptors or pathways distinct from the ones already described are responsible for the paradox vasoconstriction.

8. Literaturverzeichnis

Barri, M. E., Abbas, S. K., Care, A. D.

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

Exp Physiol 1992; 77: 481-490

Bergwitz, C., Jusseaume, S. A., Luck, M. D., Jüppner, H. et al.

Residues in the membrane-spanning and extracellular hoop regions of the parathyroid hormone (PTH)-2 receptor determine signalling selectivity for PTH and PTH-related peptide

J Biol Chem 1997; 272(46): 28861-28868

Bolliger, A. P., Graham, P. A., Richard, V., Rosol, T. J. et al.

Detection of parathyroid hormone-related protein in cats with humoral hypercalcemia of malignancy

Vet Clin Pathol 2002; 31(1): 3-8

Botella, A., Rekik, M., Delvaux, M., Davicco, M. J. et al.

Parathyroid hormone (PTH) and PTH - related peptide induce relaxation of smooth muscle cells from guinea pig ileum: interaction with vasoactive intestinal peptide receptors

Endocrinology 1994; 135(5): 2160-2167

Burtis, W. J., Fodero, J. P., Gaich, G., Debeysey, M. et al.

Preliminary characterization of circulating amino - and carboxyl - terminal fragments of parathyroid hormone - related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy

J Clin Endocrinol metab 1992; 75(4): 1110-1114

Burtis, W. J., 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

Burton, P. B., Brandt, D. W., Deftos, L. J.

Parathyroid hormone - related protein in the cardiovascular system

Endocrinology 1994; 135: 253-261

Care, A. D., Abbas, S. K., Pickard, D. W., Barri, M. et al.

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

Clemens, T. L., Cormier, S., Eichinger, A., Endlich, K. et al.

Parathyroid hormon-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets

British Journal of Pharmacology 2001a; 134: 1113-1136

Clemens, T. L., Qian, J., Colbert, M. C.

Editorial: prenatal lethality in PTH type 1 receptor null mice - interrogating the usual suspects

Endocrinology 2001b; 142: 5056-5058

Cornish, J., Callon, K. E., Lin, C., Xiao, C. et al.

Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein

J Bone Miner Res 1999; 14(6): 915-922

- Cornish, J., Callon, K. E., Nicholson, G. C., Reid, I. R.
Parathyroid hormone - related protein (107-139) inhibits bone resorption in vivo
Endocrinology 1997; 138(3): 1299-1304
- Daifotis, A. G., Weir, E. C., Dreyer, B. E., Broadus, A. E.
Stretch - induced parathyroid hormone - related peptide gene expression in the rat
uterus
J Biol Chem 1992; 267: 23455-23458
- Davenport, A. P.
International Union of Pharmacology. XXIX. update on endothelin receptor
nomenclature
Pharmacol Rev 2002; 54: 219-226
- de Miguel, F., Fiaschi-Taesch, N., Lopez-Talavera, J. C., et al.
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
- Degenhardt, H., Jansen, J., Schulz, R., Sedding, D. et al.
Mechanosensitive release of parathyroid hormone-related peptide from coronary
endothelial cells
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: H1489-1496
- Divieti, P., Geller, A. I., Suliman, G., Jüppner, H. et al.
Receptors specific for the carboxyl-terminal region of parathyroid hormone on bone-
derived cells: determinants of ligand binding and bioactivity
Endocrinology 2005; 146(4): 1863-1870
- Döring, H. J. und Dehnert, H.
Das isolierte perfundierte Warmblüter - Herz nach LANGENDORFF
Methoden der experimentellen Physiologie und Pharmakologie 1985; 1: 1-24

Endlich, K., Massfelder, T., Helwig, J. J., Steinhausen, M.

Vascular effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone - related protein in the split hydronephrotic rat kidney

J Physiol (Lond) 1995; 483: 481-490

Endres, D. B., Villanueva, R., Sharp, C. F. jr., Singer, F. R.

Measurement of parathyroid hormone

Endocrinol Metab Clin North Am 1989; 18: 611-629

Fenton, A. J., Kemp, B. E., Hammonds, R. G., Mitchelhill, K. et al.

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

Fuller, A.

Case records of the Massachusetts General Hospital (case 27461)

N Engl J Med 1941; 225: 789-791

Gardella, T. J. und Jüppner, H.

Interaction of PTH and PTHrP with their receptors

Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 2000; 1: 317-329

Gellhorn, A. und Plimpton, C. H.

Hypercalcemia in malignant disease without evidence of bone destruction

Am.J.Med. 1956; 21: 750-759

Gensure, R. C., Gardella, T. J., Jüppner, H.

Parathyroid hormone and parathyroid hormone - related peptide, and their receptors

Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 328: 666-678

Gentili, C., Morelli, S., Russo de Boland, A.

Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: effects of ageing

Journal of Cellular Biochemistry 2003; 88: 1157-1167

Goold, C. P., Usdin, T. B., Hoare, S. R. J.

Regions in rat and human parathyroid

hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonist ligands

J Pharmacol Exp Ther 2001; 299: 678-690

Gutman, A. B., Tyson, T. L., Gutman, E. B.

Serum calcium, inorganic phosphorus and phosphatase activity in

hyperparathyroidism, paget's disease, multiple myeloma and neoplastic disease of bone

Archives of internal medicine 1936; 57: 379-413

Harvey, S. und Fraser, R. A.

Parathyroid hormone: neural and neuroendocrine perspectives

J Endocrinol 1993; 139: 353-361

Henderson, J. E., Amizuka, N., Warshawsky, H., Biasotto, D. et al.

Nuclear localization parathyroid hormone - related peptid enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death

Mol Cell Biol 1995; 15: 4064-4075

Hoare, S. R. J., Bonner, T. I., Usdin, T. B.

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

Hoare, S. R. J. und Usdin, T. B.

Tuberoinfundibular peptide (7-39) [TIP(7-39)], a novel, selective, high-affinity

antagonist for the parathyroid hormone-1 receptor with no detectable agonist activity

J Pharmacol Exp Ther 2000; 295: 761-770

Horiuchi, N., Caulfield, M., Fisher, J. E., et al.

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

Science 1987; 238: 1566-

Ishikawa, M., Ouchi, Y., Akishita, M., Kozaki, K. et al.

Immunocytochemical detection of parathyroid hormone - related protein in vascular endothelial cells

Biochem Biophys Res Commun 1994a; 199: 5447-5451

Ishikawa, M., Ouchi, Y., Han, S. Z., Akishita, M. et al.

Parathyroid hormone - related protein reduces cytosolic free Ca²⁺ level and tension in rat aortic smooth muscle

Eur J Pharmacol 1994b; 269: 311-317

Jüppner, H.

Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone - related peptide:

Exploration of their biological importance

Bone 1999; 25: 87-90

Jüppner, H., Abou - Samra, A. B., Freeman, M., et al.

A G protein - linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone - related peptide

Science 1991; 254: 1024-1026

Kalinowski, L., Dobrucki, L. W., Malinski, T.

Nitric oxid as a second messenger in parathyroid hormone-related protein signalling

J Endocrinol 2001; 170: 433-440

Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T. et al.

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

Genes Dev. 1994; 8: 277-289

Kovacs, C. S. und Kronenberg, H. M.

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

Endocrine Reviews 1997; 18: 832-872

Kubota, A., Kano, R., Mizuno, T., Hisasue, M. et al.

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) produced by dog lymphoma cells

J Vet Med Sci 2002; 64(9): 835-837

Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A. et al.

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

Science 1996; 273: 663-666

Li, H., Seitz, P. K., Thomas, M. L., Selvanayagam, P. et al.

Widespread expression of the parathyroid hormone-related peptide and PTH/PTHrP receptor genes in intestinal epithelial cells

Lab Invest 1995; 73: 864-870

Löscher, W., Ungemach, F. R., Kroker, R.

Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren 2003; 6:

Lüscher, T. F. und Barton, M.

Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs

Circulation 2000; 102: 2434-2440

Martin, T. J., Moseley, J. M., Gillespie, M. T.

Parathyroid hormone - related protein: biochemistry and molecular biology

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

Massfelder, T., Dann, P., Wu, T. L., Vasavada, R. et al.
Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone - related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting
Proc natl Acad Sci USA 1997; 94: 13630-13635

Massfelder, T. und Helwig, J. J.
Parathyroid hormone - related protein in cardiovascular development and blood pressure regulation
Endocrinology 1999; 140: 1507-1509

Massfelder, T. und Helwig, J. J.
The parathyroid hormone - related protein system: more data but more unsolved questions
Curr Opin Nephrol Hypertens 2003; 12: 35-42

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

Meyer-Heim, T. und Stäubli, M.
Paraneoplasien
Schweiz Med Forum 2002; 48: 1139-1145

Mizuguchi, T., Nishiyama, M., Moroi, K., Tanaka, H. et al.
Analysis of two pharmacologically predicted endothelin B receptor subtypes by using the endothelin B receptor gene knockout mouse
British Journal of Pharmacology 1997; 120: 1427-1430

Mok, L. L., Ajiwe, E., Martin, J., Thompson, J. C. et al.
Parathyroid hormone - related protein relaxes rat gastric smooth muscle and shows cross - desensitization with parathyroid hormone
J Bone Miner Res 1989a; 4: 433-439

Mok, L. L., Cooper, C. W., Thompson, J. C.
Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein inhibit phasic contraction of pig duodenal smooth muscle
Proc Soc Exp Biol Med 1989b; 191(4): 337-340

Mok, L. L., Nickols, G. A., Thompson, J. C., Cooper, C. W.
Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant
Endocrine Reviews 1989c; 10: 420-436

Moseley, J. M., 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

Mungrue, I. N., Husain, M., Stewart, D. J.
The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models
Heart Failure Reviews 2002; 7: 407-422

Nickols, G. A., Nana, A. D., Nickols, M. A., DiPette, D. J. et al.
Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone - related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor
Endocrinology 1989; 125(2): 834-841

Nickols, G. A., Nickols, M. A., Helwig, J. J.
Binding of parathyroid hormone and parathyroid hormone - related protein to vascular smooth muscle of rabbit renal microvessels
Endocrinology 1990; 126: 721-727

Noda, M., Katoh, T., Kurokawa, K., Takuwa, Y.

Increased expression of parathyroid hormone - related peptide gene in blood vessels of spontaneously hypertensive rats

Hypertension 1997; 30: 1284-1288

Noda, M., Katoh, T., Takuwa, N., Kumada, M. et al.

Synergistic stimulation of parathyroid hormone - related peptide gene expression by mechanical stretch and angiotensin II in rat aortic smooth muscle cell

J Biol Chem 1994; 269: 17911-17917

Nyby, M. D., Hino, T., Berger, M. E., Ormsby, B. L. et al.

Desensitization of vascular tissue to parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein

Endocrinology 1995; 136(6): 2497-2504

Ogino, K., Burghoff, D., Bilezikian, J. P.

The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH - related protein

Endocrinology 1995; 136: 3024-3030

Orloff, J. J., Soifer, N. E., Fodero, J. P., Dann, P. et al.

Accumulation of carboxyl - terminal fragments of parathyroid hormone - related protein in renal failure

Kidney International 1993; 43: 1371-1376

Philbrick, W. M., Wysolmerski, J. J., Galbraith, S., et al.

Defining the roles of parathyroid hormone - related protein in normal physiology

Physiol Rev 1996; 76: 127-173

Pirola, C. J., Wang, H. M., Kamyar, A., Wu, S. et al.

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, C. J., Wang, H. M., Strgacich, M. I., Kamyar, A. et al.

Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone - related protein gene expression in vivo and in vitro

Endocrinology 1994; 134: 2230-2236

Qian, J., Lorenz, J. N., Maeda, S., et al.

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: 1826-1833

Rian, E., Jemtland, R., Olstadt, O. K., Endresen, M. J. et al.

Parathyroid hormone - related protein is produced by cultured endothelial cells: a possible role in angiogenesis

Biochem Biophys Res Commun 1994; 198: 740-747

Robbins, W. M., Dilworth, J. J., Laskey, R. A., Dingwall, C.

Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence

Cell 1991; 64: 615-623

Rubin, D. A. und 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

Schlüter, K. D.

PTH and PTHrP: similar structures but different functions

News Physiol Sci 1999; 14(6): 243-249

Schlüter, K. D., Katzer, C., Frischkopf, K., Wenzel, S. et al.

Expression, release and biological activity of parathyroid hormone - related peptide from coronary endothelial cells

Circ Res 2000; 86: 946-951

Schlüter, K. D., Katzer, C., Piper, H. M.

A N-terminal PTHrP peptide fragment void of a PTH/PTHrP-receptor binding domain activates cardiac ET_A receptors

British Journal of Pharmacology 2001; 132: 427-432

Schlüter, K. D., Weber, M., Piper, H. M.

Effects of PTHrP(107-111) and PTHrP(7-34) on adult cardiomyocytes

J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 3057-3065

Shan, J., Pang, P. K. T., Lin, H. C., Yang, M. C. M.

Cardiovascular effects of human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide

Journal of Cardiovascular Pharmacology 1994; 23: S38-S41

Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H.-S., Desai, K. M. et al.

Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxid synthase

Proc natl Acad Sci USA 1996; 93: 13176-13181

Simpson, E. L., Mundy, G. R., D'Souza, S. M., Ibbotson, K. J. et al.

Absence of parathyroid hormone messenger RNA in nonparathyroid tumors associated with hypercalcemia

N Engl J Med 1983; 309(6): 325-330

Sneddon, W. B., Magyar, C. E., Willick, G. E., Syme, C. A. et al.

Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments

Endocrinology 2004; 145(6): 2815-2823

Soifer, N. E., Dee, K. E., Insogna, K. L., 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, L. M., Martin, T. J., Gillespie, M. T.

Cell - specific and regulator - induced promoter usage and messenger ribonucleic acid splicing for parathyroid hormone - related protein

Endocrinology 1996; 137(4): 1349-1357

Strewler, G. J.

Mechanisms of disease: the physiology of parathyroid hormone-related protein

New England J.Med. 2000; 342(3): 177-185

Strewler, G. J., 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

Stuart, W. D., Maeda, S., Khera, P., et al.

Parathyroid hormone-related protein induces G1 phase growth arrest of vascular smooth muscle cells

Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 279: E60-E67

Udwin, T. B.

Evidence for a parathyroid hormone - 2 receptor selective ligand in the hypothalamus

Endocrinology 1997; 138: 831-838

Usdin, T. B.

The PTH2 receptor and TIP39: a new peptide - receptor system

TiPS 2000; 21: 128-130

Usdin, T. B., Bonner, T. I., Harta, G., Mezey, E.

Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat

Endocrinology 1996; 137: 4285-4297

Usdin, T. B., Gruber, C., Bonner, T. I.

Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor

J Biol Chem 1995; 270(26): 15455-15458

Usdin, T. B., Hoare, S. R. J., Wang, T., Mezey, É. et al.

TIP39: a new neuropeptide and PTH2 - receptor agonist from hypothalamus

Nature Neuroscience 1999; 2(11): 941-943

Villardaga, J. P., Krasel, C., Chauvin, S., Bambino, T. et al.

Internalization determinants of the parathyroid hormone receptor differentially regulate beta-arrestin/receptor association

J Biol Chem 2001; 277: 8121-8129

Watson, P. H., Fraher, L. J., Hendy, G. N., Chung, U. I. et al.

Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissue

J Bone Miner Res 2000; 15: 1033-1044

Wolzt, M., Schmetterer, L., Dorner, G., Zelger, G. et al.

Hemodynamic effects of parathyroid hormone - related peptide - (1-34) in humans

J Clin Endocrinol metab 1997; 82: 2548-2551

Wu, S., Pirola, C. J., Green, J., Yamaguchi, D. T. et al.

Effects of N - terminal, midregional and C - terminal parathyroid hormone - related peptides on adenosine 3',5' - monophosphate and cytoplasmic free calcium in rat aortic smooth muscle cells and UMR - 106 osteoblast - like cells

Endocrinology 1993; 133: 2437-2444

Wysolmerski , J. J. und Stewart, A. F.

The physiology of parathyroid hormone - related protein: an emerging role as a developmental factor

Annu Rev Physiol 1998; 60: 431-460

Yamamoto, M., Harm, S. C., Grasser, W., Thiede, M. A.

Parathyroid hormone - related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stress

Proc natl Acad Sci USA 1992; 89: 5326-5330

Yamamoto, S., Morimoto, I., Yanagihara, N., et al.

Parathyroid hormone - related peptide - (1-34) [PTHrP-(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

Yamamoto, S., Morimoto, I., Zeki, K., et al.

Centrally administered parathyroid hormone (PTH) - related protein (1-34) but not PTH (1-34) stimulates arginine - vasopressin secretion and its messenger ribonucleic acid expression in supraoptic nucleus of the conscious rats

Endocrinology 1998; 139: 383-388

Yates, A. J. P., Gutierrez, G. E., 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

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. Anhang

9.1. Veröffentlichung

Y. Abdallah, G. Ross, A. Dolf, M.P. Heinemann, K.D. Schlüter

N-terminal parathyroid hormone-related peptide hyperpolarizes endothelial cells and causes a reduction of the coronary resistance of the rat heart via endothelial hyperpolarization

Peptides. 2006 Nov;27(11):2927-34

9.2. Poster

A. Dolf, E. Bahner, K.-D. Schlüter

Desensitisation of the cardiac PTHrP receptor contributes to the vasoconstriction mediated by bioactive PTH peptides

Deutsche Physiologische Gesellschaft, 84th Annual Meeting, Göttingen 2005

G. Ross, A. Dolf, E. Bahner, K.-D. Schlüter

Eine Desensibilisierung des kardialen PTH-Typ1 Rezeptors (PTH1R) trägt zur vasokonstriktiven Wirkung bioaktiver PTH-Peptide bei

71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung, Mannheim 2005

9.3. Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündliche Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Tuttlingen, den 07.11.2007

Alexandra Spies

9.4. Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung dieser Arbeit, aber vor allen Dingen für die intensive Betreuung, die bei weitem nicht selbstverständlich ist,

Prof. Dr. J. Roth für die unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin,

allen technischen Assistenten, Postdocs und Mitdoktoranden für die viele Hilfe und das angenehme Arbeitsklima, vor allem aber Peter Volk und Dr. Günther Roß für ihre unermüdliche Hilfe und für die vielen lustigen Stunden im Perfusionslabor,

all meinen Freunden, die das Studium und die Promotionszeit unvergesslich gemacht haben,

meinen Eltern und meinen Brüdern auf deren Unterstützung ich immer zählen kann,

meinem Sohn, der mir immer wieder zeigt, was wirklich wichtig ist,

meinem Mann Markus, ohne den das Leben seinen Namen nicht verdient hätte.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5264-1



9 783835 195264 5