INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Mechanistische Untersuchungen zur flusssteigernden Wirkung von PTHrP am Rattenherzen

Marcus Peter Heinemann
2006

Mechanistische Untersuchungen zur flusssteigernden Wirkung von PTHrP am Rattenherzen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Marcus Peter Heinemann
aus Frankenthal/Pfalz

Gießen 2006

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Dr. H.M.Piper

Gutachter: Prof. Dr. K.D. Schlüter
Gutacher: PD Dr.Stolz
Tag der Disputation: 12.05.2006

- Frau Schmöff gewidmet -

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

INHALTSVERZEICHNIS

1.Einleitung……4

1.1 Allgemeines…….. 4

1.2 PTHrP im kardiovaskulären System ……... 5

1.3 Fragestellung……..... 11

2. Material und Methoden…… 12

2.1 Isolierung der Rattenherzen…… 12

2.1.1Versuchstiere…… 12

2.1.2 Präparation……12

2.2 Herzperfusion…… 12

2.3 Versuchsprotokolle……..14

2.4 Nachweis der PTHrP-Freisetzung……..……16

2.4.1 Probenvorbereitung……...16

2.4.2 Dot-Blot Verfahren……..... 17

2.4.3 Immunologischer PTHrP-Nachweis……..…17

2.5 Nitritbestimmung durch die Griess-Reaktion…… 19

2.6 Bezugsquellen der Chemikalien……... 20

2.7 Statistik……21

3. Ergebnisse……..22

3.1. Mechanismus der dilatativen Wirkung von PTHrP(1-34)……22

3.1.1 Konzentrationsbindungskurve für PTHrP(1-34)……... 23

3.1.2 Zeitkinetik des koronarflusssteigernden Effektes von PTHrP(1-34)……23

3.1.3 PTHrP(1-34) und Isoprenalin steigern den Koronarfluss gleichsinnig…… 24

3.1.4 Der Einfluss einer Hemmung der NO-Synthase, Cyclooxygenase oder Proteinkinase A auf den dilatierenden Effekt von PTHrP……... 25

3.1.4.1 Hemmung der NO-Synthase durch L-Nitro-Arginin…….. 25

3.1.4.2 Hemmung der Cyclooxygenase ……. 26

3.1.4.3 Blockierung der Proteinkinase A……..... 27

3.1.4.4 Zusammenfassungen der Koronarflussänderungen unter der Blockade der verschiedenen Botenstoffsysteme…….....28

3.1.5 Bradykinin steigert den Koronarfluss unter basalen Bedingungen……..29

3.1.6 Untersuchung zur NO-Freisetzung anhand der Nitritbestimmung…..30

3.1.6.1 Vergleich zwischen Bradykinin und PTHrP(1-34) in der Nitritfreisetzung..... 30
3.1.6.2 Freisetzung von endogenem PTHrP unter PTHrP(1-34), Bradykinin und Spermine-NONOate..... 31
3.1.6.3 Die Wirkung von Bradykinin ist NO-abhängig…….. .32
3.1.6.4 Die Wirkung von Bradykinin an vorkonstrinkierten Herzen ist NO-abhängig……...33
3.2 Wirkung von PTHrP auf den Koronarfluss nach Ischämie..... 34
3.2.1 Die endothelabhängige Vasodilation ist post-ischämisch stark eingeschränkt.....34
3.2.2 Endothelunabhängige Steigerung des Koronarflusses durch NO im prä- und postischämischen Myokard unverändert..... 35
3.2.3 PTHrP dilatiert die Gefäße prä- und post-ischämisch.....36
3.3 Wirkung einer selektiven Stimulation des PTH-2-R durch TIP39 auf den Koronarfluss..... 37
3.3.1 Einfluss von TIP39 auf den basalen Koronarfluss..... 37
3.3.2 TIP39 steigert den Koronarfluss nach Desensibilisierung der PTH-1-Rezeptoren..... 38
3.3.3 Die Steigerung des Koronarflusses nach Desensibilisierung des PTH-1-R ist NO-abhängig..... 40
3.4 Gleichzeitige Stimulation des PTH-1-Rezeptor und PTH-2-Rezeptor durch ^{5}Ile-PTHrP..... 41
3.4.1 Einfluss von ^{5}Ile-PTHrP auf den basalen Koronarfluss..... 41
3.4.2 ^{5}Ile-PTHrP steigert verzögert gegenüber PTHrP den Koronarfluss.....42
3.4.3 PTHrP steigert den Koronarfluss, ^{5}Ile-PTHrP senkt ihn in Gegenwart von L-NA.....43

4. Diskussion 44
4.1 Hauptbefunde..... 44
4.2 Mechanismus der dilatativen Wirkung von PTHrP.....44
4.3Effekte von PTHrP auf den Koronarfluss nach Ischämie.....45
4.4 Stimulation des PTH2-Rezeptors durch TIP 39..... 47
4.5 Schlussfolgerung.....…….49

5. Zusammenfassung……..... 50

6. Summary……51

7. Literaturverzeichnis……52

8. Danksagungen……..66

9. Lebenslauf……..67

1.Einleitung

Parathyroid hormon-related peptide (PTHrP) ist ein Mitglied einer Familie strukturverwandter Proteine, die neben PTHrP, das Parathormon (PTH) und das Tuberoinfundibularpeptid von 39 Aminosäuren (TiP39) beinhaltet. PTHrP wird von Zellen des kardiovaskulären Systems wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und atrialen Kardiomyozyten exprimiert. Rezeptoren für PTHrP werden in verschiedenen Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert, wie in Schrittmacherzellen, glatten Muskelzellen und sowohl atrialen als auch ventrikulären Kardiomyozyten. In den letzten Jahren wurde man sich über die Wichtigkeit dieses Peptidhormons für die Funktion des kardiovaskulären Systems bewusst. Inzwischen hat man verschiedene Mechanismen identifiziert, durch die PTHrP freigesetzt wird und von welchen Zelltypen. Das jetzige Verständnis von endothelial freigesetztem PTHrP für die Herzfunktion konnte durch die Tatsache verbessert werden, das es spezifische Effekte auf das Herz ausübt, die nicht von anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie imitiert werden können. Die spricht für eine spezifische Wirkung kardial gebildetem PTHrP.

1.1 Allgemeines

PTHrP wurde 1987 als Faktor identifiziert, der für die malignitätsassoziierte Hyperkalziämie verantwortlich ist und von Tumorzellen sezerniert wird (Burtis et al. 1987, Moseley et al. 1987 und Strewler et al. 1987). Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Faktor nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von den verschiedensten Geweben des Körpers gebildet wird. Obwohl PTHrP und PTH in 8 der ersten 13 Aminosäuren übereinstimmen, zeigt PTHrP dennoch spezifische Effekte. Das fast ubiquitäre Vorkommen und die gewöhnlicherweise niedrigen Plasmaspiegel von PTHrP deuten auf para-, auto- und intrakrinen Effekte, abweichend von denen des PTHs, hin.

PTH und PTHrP sind Produkte zweier verschiedener Gene, wobei das Gen für die PTHrP-Expression die Charakteristiken eines „immediate early genes“ aufweist, d.h. eine schnelle und transiente Hochregulation. Beim Menschen führte alternatives Spleißen zu 12 Transkripten aus denen 3 verschiedenlange Isoformen von 139 bis 173 Aminosäuren gebildet werden. Durch eine posttranslationale, endoproteolytische Spaltung kommt es zur Formierung der biologisch aktiven Fragmente, nämlich dem N-

terminalen $PTHrP_{1-36}$, dem mittelregionalen $PTHrP_{38-94}$ und dem C-terminalen $PTHrP_{107-139}$ (Soifer et al. 1992, Burtis et al. 1992 und Orloff et al.1993).

Das N-terminale Fragment des $PTHrP_{1-36}$, welches am klassischen PTH/PTHrP Rezeptor (PTH-1R) bindet, ist in der Lage die Effekte des PTHs auf die Regulation des Kalziumhaushaltes zu imitieren. Abgesehen von diesem Effekt auf die klassischen Zielzellen des PTHs in der Niere und im Knochen hat das N-terminale Fragment des PTHrPs Bedeutung bei der Regulierung des Wachstums, der Entwicklung und der Differenzierung aller bis jetzt untersuchten Gewebe, wie zum Beispiel der Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten und damit auch für die endochondrale Knochenformation (Lanske et al. 1996 und Davicco et al. 1993) und der Entwicklung der Haut, der Brustdrüse, der Niere und dem kardiovaskulären System (Camopos et al.1994 und Wysolmrski et al. 1996). Studien bei Mäusen, die genetisch so manipuliert wurden, dass sie kein PTHrP mehr produzieren können, zeigten das Fehlen einer normalen Zone der Gefäßeinsprossung beim sich entwickelnden Knorpel (Karapalis et al. 1996). Dieser Effekt des PTHrP, sowie die Erschlaffung glatter Muskelzellen (Barri et al. 1992), werden durch den PTH-1R vermittelt. Dieser gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Serotonin/Kalzitonin Rezeptoren. Seine Aktivierung führt zu einer Stimulation der Adenylatcyclase wodurch der cAMP-Spiegel sich erhöht und seinerseits die Proteinkinase A aktiviert. Dieser PTH-1R wird sehr stark in der Niere und dem Knochen exprimiert wobei er sich aber auch in einer großen Vielfalt anderer Gewebe findet (Jüppner 1999). Die Beobachtung, dass $PTHrP_{1-34}$ und $PTHrP_{1-36}$ in menschlichen Keratozyten, die keinen PTH-1R exprimieren, die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigen lassen, jedoch ohne Erhöhung des cAMP, lässt den Schluss zu, dass ein weiterer Rezeptor für das N-terminale Fragment existiert. Weitergehend zeigt die Arbeit von Yamamoto et al. (1997) indirekt die Präsenz eines spezifischen Rezeptors für das N-terminale Fragment. Sie beobachteten die Freisetzung von Arginin-Vasopressin aus dem Nukleus supraopticus nach Inkubation mit $PTHrP_{1-34}$, wobei man diesen Effekt nicht nach Behandlung mit PTH_{1-34} sah. Die Isolation und Identifizierung dieses Rezeptors glückten bislang noch nicht. Dasselbe gilt für die Rezeptoren der Mittelregion- und C-terminalen Fragmente des PTHrP. Beim Schaf sind die Mittelregion-Fragmente des PTHrP besonders beteiligt bei der Regulation des extrazellulären Kalziumhaushalts während der Schwangerschaft durch Stimulation der plazentaren Kalziumpumpe (Kovacs et al. 1997, Care et al. 1990 und MacIsaac et al.

1991). C-terminale Fragmente, auch Osteostatin genannt, hemmen effektiv die Knochenresorption der Osteoklasten.

Neben diesen auto- und parakrinen Effekten übt PTHrP auch intrakrine Effekte aus. Henderson et al. (1995) beobachteten eine intranukleäre Lokalisation von PTHrP in Skelettzellen, unter Apoptose-Bedingungen, eine Zunahme der Überlebensrate der Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Weitere Effekte einer solchen intranukleären Lokalisation des PTHrP, unabhängig vom PTH-R, sind die Verzögerung von sowohl der Einwanderung von Osteoblasten als auch des Einsprossens neuer Gefäße in hypertrophiertes Knorpelgewebe (Lanske et al. 1999), sowie eine Stimulation des Wachstums von kultivierten, glatten Gefäßmuskelzellen (Massfelder et al. 1997 und DeMiguel et al. 2001).

1.2 *PTHrP im kardiovaskulären System*

Im kardiovaskulären System verschiedener Säugetiere wie Ratte, Hase, Schwein und Mensch (Burton et al. 1994) wird PTHrP in Gefäßen und dem Herzen produziert (Bui et al. 1993 und Deftos et al. 1993). Im erwachsenen Herzen findet man die größten Vorkommen an PTHrP im Myokard der Herzohren und in den Herzgefäßen (Burton et al. 1994). Im Gegensatz zu den atrialen Kardiomyozyten exprimieren die ventrikulären kein PTHrP (Schlüter et al. 2000). In Gefäßen wurde auch eine PTHrP Expression gefunden und zwar in den glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen (Schlüter et al. 2000), wobei die glatten Muskelzellen auch den korrespondierenden PTH-R exprimieren im Gegensatz zu den Endothelzellen (Mok et al. 1989).

Die Expression von PTHrP in glatten Muskelzellen und Endothelzellen wird verschieden reguliert (Ihikawa et al. 1994 und Schorr 2003). In den glatten Muskelzellen findet sich eine schnelle und transiente Hochregulierung der PTHrP Expression nach Stimulierung mit vasoaktiven Substanzen wie Angiotensin II, Bradykinin, Serotonin, Endothelin, Noradrenalin und Thrombin (Pirola et al. 1993 und Mombouli et al. 1999). Auch Wachstumsfaktoren und mechanische Stimuli (Noda et al. 1994 und Pirola 1994) führen zur einer Erhöhung der Expression sowie eine Verschluss der Rattenaorta durch Aufblähen eines Ballonkatheters (Daifotis et al. 1992). In koronaren Endothelzellen hat Angiotensin II keinen großen Effekt auf die PTHrP Expression aber sie wird durch Stimulation von α_{1A}–Adrenorezeptoren induziert; dieser

Effekt ist auf proliferierende Endothelzellen beschränkt (Schorr et al. 2003). Der Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1) setzt die PTHrP Expression in koronaren Endothelzellen herunter und inhibiert das Wachstum von endothelialen Zellen (Taimor et al. 1999 und Wenzel et al. 2001). In glatten Gefäßmuskelzellen und endothelialen Zellen sowie auch in anderen nicht-malignen PTHrP exprimierenden Zellen ist die Expression von PTHrP zumindest teilweise auf posttranslationaler Ebene reguliert (Pirola et al. 1993).

PTHrP spielt auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung des fetalen kardiovaskulären Systems; so wurde bei der fetalen Ratte ab dem 11. Tag der Schwangerschaft eine Expression von PTHrP sowie des PTH-1R gefunden. Zu dieser Zeit beginnt die Entwicklung des Herzens und der großen Gefäße. Transgene Mäuse, die sich durch Überexpression von PTHrP oder des PTH-R auszeichnen, starben während dieser Periode mit Abnormalitäten in der Herzentwicklung (Quian et al. 1999). Die Beobachtung, dass bei fetalen PTHrP knock-out Mäusen die Wachstumsrate der glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta reduziert ist (Massfelder et al. 1997) unterstreicht die Beteiligung von PTHrP an der Entwicklung der Gefäße.

Im erwachsenen Organismus sind Zielzellen des PTHrP die glatten Muskelzellen, atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten sowie die Schrittmacherzellen. Endotheliale Zellen hingegen exprimieren keinen PTH-1R (Rian et al. 1994). Der Effekt von PTHrP auf die Kardiomyozyten konnte nur teilweise von PTH imitiert werden. Bei isoliert perfundierten Rattenherzen induziert $PTHrP_{1-34}$ einen positiv inotropen und chronotropen Effekt. Den positiv chronotropen Effekt ist auch dem PTH eigen aber die Inotropiesteigerung ist ein spezifischer Effekt des PTHrP (Nickols et al. 1989 und Ogino et al. 1995). In isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der erwachsenen Ratte stimuliert $PTHrP_{1-34}$, im Gegensatz zu PTH_{1-34}, die kontraktile Reaktion, durch Aktivierung der Adenylatcyclase (Nickols et al. 1985 und Schlüter et al. 1997). Im Gegensatz dazu hat PTH keinen Einfluss auf cAMP-abhängige Zellfunktionen adulter Kardiomyozyten. Dies führt zu der Annahme, dass ein weiterer Rezeptor für PTHrP, abgesehen vom PTH-1R, existiert.

Das C-terminale Fragment $PTHrP_{107-111}$ steigert in isolierten Ratten-Kardiomyozyten die Proteinsynthese, die Proteinmasse und das Zellvolumen, vermittelt durch Aktivierung der Proteinkinase C und steigert durch eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) die Expression der fetalen Kreatinkinasenisoform CK-BB.

Diese fetale Isoform der Kinase wird auch im hypertrophierten Myokard reexprimiert. Das C-terminale Fragment des PTHrP hat also Eigenschaften eines Wachstumsfaktors für adulte Kardiomyozyten (Schlüter et al. 997). Zu dieser in vitro Beobachtung passend ist die Tatsache, dass man bei Patienten mit chronischen Nierenversagen, die dialysepflichtig sind, eine Erhöhung der Konzentration des C-terminalen Fragments findet. Die Hauptveränderung des Herzen bei diesen Patienten ist die Hypertrophie des linken Ventrikles.

Auch für die Pathophysiologie des Kreislaufsystems scheint PTHrP eine große Bedeutung zu haben. Das N-terminale Fragment verfügt über antiproliferative Effekte in glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt durch den PTH-1R und inhibiert die Platelet-derived-growth-factor (PDGF) induzierte Migration (Ishikawa et al. 1998). Diese Proliferation sowie die Migration, sind verantwortlich für die Bildung einer Neointima, deren Dysregulation Teil der Komplikationen ist, die nach Angioplastie von Koronararterien auftreten. Die PTHrP Expression ist in der Media und Neointima der angioplastischen Gefäße (Ozeki et al. 1996) erhöht, sowie in arteriosklerotischen und teilstenosierten menschlichen Arterien (Nakayama et al. 1994). Dieser Gegensatz zwischen dem antiproliferativen Effekt und der Erhöhung des Wachstums vermittelt durch intrakrine Signalwege bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Fähigkeit von PTHrP glatte Muskelzellen zu relaxieren und dadurch Gefäße zu erweitern trägt zur Regulation des systemischen Blutkreislaufs bei (DiPette et al. 1992 und Maeda et al. 1999). Transgene Mäuse, die PTHrP in den Gefäßen überexprimieren, zeigen ein Sinken des systemischen Blutdrucks genauso wie Mäuse, die den PTH-1R in glatten Gefäßmuskelzellen überexprimieren (Quian et al. 1999). Zudem zeigte intravenös appliziertes PTHrP einen signifikanten Abfall des Blutdruck und des peripheren Widerstands. Denselben vasodilatierenden Effekt konnte man auch an isolierten Aortenpräparationen dieser Tiere beobachten. In nichttransgenen Tieren führt die exogene Applikation von PTHrP zu einem Abfall des systemischen Blutdrucks. Intravenöse Verabreichung von sowohl PTHrP als auch PTH führt dosisabhängig zu einer Reduktion des Blutdrucks bei wachen Ratten; wobei die Dosis für PTHrP, um den gleichen Effekt zu erzielen wie PTH, geringer ist.

In vorkonstringierten Aorten von Ratten und Mäusen zeigten $PTHrP_{1-34}$ und PTH_{1-34} eine dosisabhängige Relaxation (Nickols et al. 1989), wobei sich dieser Effekt bei wiederholter Gabe reduziert. Diese Desensibilisierung des Rezeptors ist wahrscheinlich das Resultat einer liganden-abhängigen Phosphorylierung und Inaktivierung durch Proteinkinasen G. Dasselbe Phänomen beobachtete man in Knochenzellen, in der Niere und in glatten Muskelzellen, sowohl in vitro als auch in vivo. Die Desensibilisierung für PTHrP in diesen Zellen wird auch von einer Desensibilisierung für Achetylcholin, und für andere Vasodilatatoren, begleitet.

Die kurze Halbwertszeit von PTHrP und seine niedrige Plasmakonzentration sprechen eher für eine Rolle des PTHrP in der Regulation des lokalen Blutflusses. Intrakoronare Injektion von PTH, welches strukturelle Gemeinsamkeiten mit PTHrP hat, steigert den Koronarfluss im Kaninchenherz (Crass et al. 1985 und Crass et al. 1980).

Sowohl in vitro als auch in vivo sind PTH und PTHrP potente Dilatatoren des arteriellen Gefäßbettes (Rova-Cusachs et al. 1991 und Philbrick et al. 1996) und beide steigern dosisabhängig die regionale Myokarddurchblutung. Dieser vasodilatative Effekt beider Hormone wird durch den in glatten Gefäßmuskelzellen exprimierten PTH-1R vermittelt (Wu et al. 1993).

Obwohl PTH nicht nur bei Hunden und Ratten sondern auch bei Mäusen, Hühnern und anderen Spezies hypotensive Effekt zeigt, wird es trotzdem kontrovers als Vasodilatator diskutiert, da die Konzentrationen die für eine Vasodilatation nötig wären, signifikant über denen des Plasmaspiegels liegen. Überdies zeigen Patienten, die an primären Hyperparathyreoidismus leiden, also immer überhöhte PTH Spiegel haben, einen Bluthochdruck, der sich nach Parathyreoidektomie wieder normalisiert.

PTHrP wird flussabhängig im koronaren Gefäßbett freigesetzt (Degenhardt et al. 2002). Die Hauptquelle des Hormons ist dabei das endotheliale Kompartiment. Moduliert wird diese Freisetzung vom Druck der auf die Gefäßwand einwirkt, weniger durch die Wandschubspannung (Degenhardt et al. 2002). Dies korrespondiert mit der verstärkten Expression von PTHrP an Rattenherzen, bei denen durch Abschnüren der aszendierenden Aorta eine Hypertension induziert wurde (Wenzel et al. 2001). Druckbelastung vermittelt eine passive Dehnung der Zellschicht, welche zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels führt (Rosales et al. 1997). Dies scheint

dann der adäquate Reiz für die koronaren Endothelzellen zu sein um PTHrP freizusetzen. Glatte Muskelzellen hingegen reagieren auf denselben Stimulus nicht mit einer Freisetzung des PTHrP. Die basale Freisetzung von PTHrP ist physiologisch relevant, da ein PTHrP-Rezeptorantagonist den koronaren Widerstand erhöht (Grohé et al.2004).

Endothelial freigesetztes PTHrP hat nicht nur unter physiologischen Bedingungen Bedeutung, sondern auch unter pathosphysiologischen Zuständen. Im Gegensatz zu anderen vasoaktiven Faktoren wie EDHF (Bauersachs et al. 1996) oder Bradykinin (Mombouli et al. 1999) beeinflusst eine Änderung in der NO-Konzentration nicht die Freisetzung des PTHrP. Deshalb beeinflusst eine Änderung in der Aktivität oder Expression des NO synthetisierenden Enzyms unter pathologischen Bedingungen nicht zwangsläufig die Rolle des PTHrP in der Regulation des Koronarflusses. Im koronaren Gefäßbett wird PTHrP unter energiearmen Bedingungen freigesetzt wie zum Beispiel während einer Ischämie und könnte deshalb an der Antagonisierung des „Vascular stunning“ während einer Reperfusion beteiligt (Schlüter et al. 2000). „Vascular stunning“ beruht auf einer verminderten NO-Freisetzung. Ob der vasodilatative Effekt des PTHrP durch NO vermittelt wird, ist nicht klar.

Die endothelabhängige PTHrP-Feisetzung vom Koronarbett während der Ischämie könnte aber zu einem Aufrechterhalten des postischämischen Flusses in der Zeit der Reperfusion beitragen und somit zumindest teilweise die herabgesetzte NO-Freisetzung kompensieren, wenn es sich um einen NO-unabhängigen Mechanismus handelt. Obwohl die Expression, Freisetzung und Wirkung des PTHrP ein endogener Mechanismus zum Schutz des Herzens gegen die Folgen der Ischämie zu sein scheint, ist im Stadium der Herzinsuffizienz die Expression des Hormons herabgesetzt [44]. Dieser Verlust an endogener PTHrP-Produktion scheint zu der dann herabgesetzten Toleranz für die Ischämie im versagenden Herzen beizutragen.

Experimentell belegt ist die reduzierte oder nicht mehr existente Expression von PTHrP bei älteren spontanen hypertensiven Ratten (SHR) (Wenzel et al. 2001). Unter diesen Umständen ist der basale Koronarfluss vermindert (Kodja et al. 1997). Dies wiederum könnte bedeuten, dass der Verlust an PTHrP Expression, wie bei anderen bekannten Faktoren, zur Fehlregulierung des Koronarflusses bei diesen Tieren beiträgt. All diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, das PTHrP sowohl unter physiologischen als

auch unter pathophysiologischen Bedingungen an der Regulation des Koronarflusses stark beteiligt ist.

Auch an anderen Gefäßen ist PTHrP ein potenter Vasodilatator (Winquist et al. 1987). Bei anästhesierten Ratten führte die intrarenale Infusion von $PTHrP_{1-36}$ zu einer Zunahme der Nierendurchblutung, der glomerulären Filtrationsrate und der Diurese (Massfelder 1996). Im menschlichen Körper konnte unter Gabe von PTHrP eine Zunahme des renalen Plasmaflusses um 40% beobachtet werden und dies mit einer Dosis, die keinen Effekt auf den systemischen Blutdruck hatte (Wolzt et al. 1997). Dieser Effekt wird durch den PTH-1R vermittelt. Die alleinige Gabe eines PTH-1R-Antagonisten zeigt keine Änderung der Nierendurchblutung (Fiaschi-Taesch et al 1998), so dass es scheint, das endogenes PTHrP nicht an der Regulierung des renalen Gefäßtonus unter basalen Bedingungen beteiligt ist.

1.3 *Fragestellung*

Ziel dieser Dissertation ist es die Mechanismen genauer zu identifizieren über die PTHrP den Koronarfluss steigert. Dazu wurde der Einfluss von PTHrP auf den Koronarfluss an druckkonstant perfundierten Herzen untersucht. Ziel der Untersuchungen war es erstens eine Abhängigkeit von NO zu belegen oder auszuschließen, zweitens den Einfluss von PTHrP prä- und postischämisch zu vergleichen und drittens die Wirkung von verschiedenen Mitgliedern der PTHrP-Familie zu charakterisieren.

2.Material und Methoden

2.1 Isolierung der Rattenherzen

2.1.1 Versuchstiere

Die Rattenherzen wurden aus adulten männlichen und weiblichen Wistar-Ratten isoliert. Die Tiere stammen aus der eigenen Züchtung des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie bekamen Altromin®-Standardfutter und Wasser ad libitum.

2.1.2 Präparation

Nach kurzer Diethylethernarkose wurden die Ratten per Genickbruch getötet. Der Brustraum wurde danach eröffnet und das Perikard entfernt. Nun wurden Herz und Lunge angehoben, mit einem Scherenschlag abgetrennt und anschließend in eine Petrischale mit eiskalter, isotonischer Kochsalzlösung gelegt. Im nächsten Schritt wurde das Herz an die Langendorff-Perfusionsanlage angehängt.

2.2 Herzperfusion

Das hierzu verwendete System entspricht einem modifizierten Langendorff-Perfusionssystem, es handelt sich um einen Eigenbau des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen (siehe Abb. 2.1).

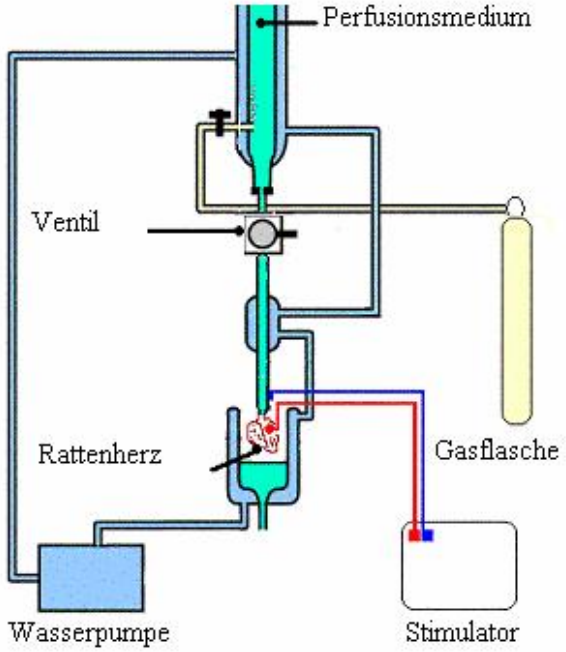


Abbildung 2.1

Zuerst wird das System mit, im Wasserbad auf Körpertemperatur erwärmten, Perfusat (37°) blasenfrei aufgefüllt. Das Perfusat läuft vom oberen Standzylinder durch ein Schlauchsystem, sich stetig verjüngend, nach unten zur Perfusionskanüle. Umspült wird die Perfusionslösung von 37° warmem Wasser, welches durch eine Pumpe durch den zweiten Kreislauf in den doppelwandigen Gefäßen befördert wird (siehe Abb.2.1). Eingebaut in dieses Schlauchsystem ist ein Ventil mit dem man den Fluss komplett stoppen kann. Das Medium versorgt das Herz mit den wichtigsten Nährstoffen während des Versuches. Des Weiteren wird das Perfusat mit 95% Sauerstoff –5% Kohlendioxid begast. Das Ventil wird nun auf „zu“ gedreht um Perfusat für den Versuch zu sparen.
Nach der Präparation der Herzen wurden diese sofort an die Perfusionskanüle der Anlage mit der Aorta angehängt. Die erste Elektrode des Taktgebers ist an die metallische Kanüle der Anlage angeschlossen und die zweite wird nun von außen an das angehängte Herz herangebracht. Umschlossen wird nun das Herz von einem doppelwandigen Glasgefäß, welches Bestandteil des zweiten Kreislaufs ist um einerseits die Probenentnahme zu gewährleisten und andererseits eine konstante Temperatur für das Organ anzubieten.

Das Herz wird nun retrograd perfundiert, entweder druckkonstant oder flusskonstant, unter verschiedenen Protokollen (siehe nächster Abschnitt). Während des ganzen Versuchs wird das Herz mit einer Frequenz von 60 Hz, durch den elektrischen Taktgeber, stimuliert. Nach Beginn des Experiments wird im 60-Sekunden-Takt für zehn Sekunden das Perfusat in einem Eppendorff-Röhrchen gesammelt und beschriftet.

Um den Koronarfluss am Ende bestimmen zu können werden die Sammelröhrchen gewogen und das Gewicht des Behältnisses wird subtrahiert. So erhält man die Milliliter Koronarfluss pro zehn Sekunden und man multipliziert noch mit sechs um auf den Minutenfluss zu kommen.

2.3 Versuchsprotokolle

Die Versuchsprotokolle lassen sich in drei Großgruppen einteilen die innerhalb noch leicht modifiziert sind.

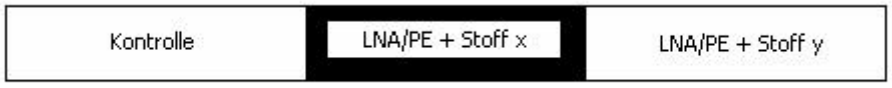
Gruppe 1: Messung des basalen Koronarflusses und seine Modifikation. Am Anfang werden stets ein Kontrolldurchlauf mit 20 ml Perfusionspuffer durchgeführt. Danach werden jeweils 20 ml Puffer hinzu gegeben in dem die eingesetzten Chemikalien schon in der erforderlichen Konzentration gelöst sind. Je nach Versuchsgruppe variieren die Durchläufe nach der Kontrolle, d.h. verschieden Chemikalien werden appliziert oder die Chemikalie wird nacheinander in steigender Konzentration verabreicht.

Start Ende

Abbildung 2.2

Während des ganzen Protokolls wird, wie schon vorher beschrieben, das Effluat jede Minute für zehn Sekunden gesammelt.

Gruppe 2: Messung des Koronarflusses in vorkonstringierten Gefäßen wobei mit LNA (einem irreversiblen Hemmer der NO-Synthase) oder PE (einem α-Sympathomimetikum) vorkonstringiert und bei jeder nachfolgenden Chemikalienapplikation konsequent weiter hinzugegeben wurde.



Start Ende

Abbildung 2.3

Gruppe 3: Messung des Koronarflusses vor und nach Ischämie. Dazu wird nach Durchlauf eines Protokollschemas wie aus Gruppe 1 oder 2 eine 30 minütige Nullflussischämie durchgeführt. Um dies zu erreichen wird durch das Ventil der Perfusionsfluß komplett gestoppt und die elektrische Stimulation wird auch ausgeschaltet. Nach 30 Minuten wird beides wieder aktiviert und es wird weitergemessen wie bisher, d.h. jede Minute wird das Perfusat für zehn Sekunden aufgenommen.

Start Ende

Abbildung 2.4

Zusammensetzung des Perfusats im mmol\l:

120,0	Natriumchlorid
24,0	Natriumhydrogencarbonat
27,0	Kaliumchlorid
0,4	Natriumdihydrogenphosphat
1,0	Mangnesiumdichlorid
1,8	Calciumdichlorid
5,0	Glucose

2.4 Nachweis der PTHrP-Freisetzung

Zur Bestimmung der PTHrP-Freisetzung wurde ein Dot-Blot Verfahren benutzt. Das Protein wurde zunächst gefällt, auf eine Membran aufgetragen und anschließend immunhistochemisch nachgewiesen.

2.4.1 Probenvorbereitung

400 µl des gesammelten Perfusats wurden mit 40 µl Desoxycholat vermischt und für zehn Minuten stehen lassen. Danach wurden 40 µl Trichloressigsäure (TCA) hinzugegeben und für eine Stunde in den Kühlschrank gestellt. Dadurch wird das Protein ausgefällt.
Nach der einstündigen Pause wurden die Proben mit 13.000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und zu den Proben wurden anschließend noch 50 µl Lämmlipuffer zur vollständigen Denaturierung hinzugegeben.

Lämmlipuffer:

Tris/HCl	0,5 mol/l (pH 6,8)
Glycerin	25 % (vol/vol)
SDS 10%	4 % (wt/vol)
Mercaptoethanol	1 % (vol/vol)
Bromphenolblau	0,1 % (wt/vol)

Als letzter Schritt wurde der pH Wert durch Zugabe von Tris (100%) auf 7,0 eingestellt. Damit sind die Proben fertig um auf die Membran aufgebracht zu werden.

2.4.2 Dot-Blot Verfahren

Die Proben wurden auf eine Polyvenylidendifluor- (PVDF) Membran aufgetragen. Dies geschieht durch eine Wasser-Saugpumpe.
Die Pumpe besteht aus zwei Anteilen, einem oberen und einem unteren, die über Klammern miteinander verbunden werden können. Im oberen Anteil befinden sich viele Löcher, die zur Probenaufnahme dienen (insgesamt sind es 96). Im unteren Anteil befindet sich der Sauganschluss.
Als erstes werden zwei Filterpapiere und die PVDF-Membran zurechtgeschnitten. Die Blot-Membran wurde nun in Menthol gewaschen und anschließend in Anodenpuffer, die Filtermembranen hingegen nur im Anodenpuffer. Danach wurde das erste Filterpapier auf den unteren Anteil gelegt, dann die PVDF-Membran und dann wieder ein Filterpapier. Nun wurde die obere Komponente draufgelegt und beide Komponenten durch die Klammern fest miteinander verbunden.
Die Pumpe wurde eingeschaltet und die Proben wurden aufgetragen. Die überflüssige Probenflüssigkeit wurde durch den Unterdruck abgesaugt und das Protein blieb an der PVDF-Membran haften.

2.4.3 Immunologischer PTHrP-Nachweis

Nach dem Auftragen wurde die Membran in einer Rinder-Serum-Albumin(BSA)-Lösung, bestehend aus 2% bovinen Serum Albumins in Trispuffer (30 mmol/l; pH 7,4), über Nacht inkubiert zwecks Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

24 Stunden später wurde mit 50 ml TBS gewaschen und dann die Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen PTHrP zwei Stunden inkubiert.

Antikörperlösung:

PTHrP-Antikörper	1 µg/ml
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan\Chlorwasserstoff (aqua)	50mM(pH7,5)
Natriumclorid	150mmol/l
Bovines Serum Albumin	2% (wt/vt)
Tween20	0,5% (wt/vt)

Danach wurde der Blot erneut mit 50 ml TBS+0,1 % (vol/vol) Triton behandelt um ungebundene Antikörper auszuwaschen. Anschließend erfolgt die Antigen/Antikörper Komplexmarkierung mit einem 2. Antikörper gegen Mäuse-Ig G, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, durch eine zweistündige Inkubation. Schließlich wurden die Proteine nach zweimaligen, fünfminütigem Waschen mit 0,5 % (vol/vol) Triton um überschüssiges Konjungat von der Membran zu entfernen.

Der Antigen-Antikörper Komplex wurde mittels einer Farbreaktion mit Nitro Blue Tetrazolium (NBT) sichtbar gemacht. Durch Zugabe von BCIP (5´-Bromo-4-chloro-3-indilylphosphat) wurde die Farbreaktion in Gang gesetzt, da BCIP durch die an den 2.Antikörper-gekoppelte alkalische Phosphatase und durch das NBT in ein violettes Präzipitat umgewandelt wurde.

Zu diesem Zweck wurde kurz zuvor folgende Entwicklerlösung lichtgeschützt angesetzt:

Entwicklerlösung:

20 ml alkalischen Phosphatpuffer

2,6 mg 5´-Bromo-4-chloro-3-indilylphosphat

6,6 mg Nitro Blue Tetrazolium

Mit dieser Lösung wurde dann die Membran überschichtet und je nach Reaktionsintensität zwischen 2-15 Minuten darinbelassen. Nach der Färbung wurde die Membran gründlich mit Aqua dest. gespült und anschließend getrocknet.

2.5 Nitritbestimmung durch die Griess-Reaktion

Zur Überprüfung, ob die gefundenen Effekte auf die PTHrP-Freisetzung NO-abhängig sind, wurde eine Nitritbestimmung durchgeführt. Bei Nitrit handelt es sich um ein stabiles Endprodukt des NO-Stoffwechsels. Die im Effluat befindliche Menge an Nitrit wurde spektrophotometrisch mit Hilfe der Griess-Reaktion gemessen. Durch Zugabe des Griess-Reagenz kommt es zur Farbkomplexbildung, dessen Absorptionsspektrum bei 546 nm liegt.

Griess-Reagenz

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

500 µl des Effluates wurden mit dem gleichen Volumen an Griess-Reagenz vermischt und eine Stunde bei 4 C° aufbewahrt.

2.6 Bezugsquellen der Chemikalien

BCIP	AppliChem, Darmstadt
Bradykinin	Calbiochem, Darmstadt
BSA	Sigma, Taufkirchen
Desoxycholat	Sigma, Taufkirchen
H8	Calbiochem, Darmstadt
Methanol	Riedel-de-Haën, Seelze
L-NA	Sigma, Taufkirchen
Phenylephrin	Calbiochem, Darmstadt
PTHrP(1-34)	Calbiochem, Darmstadt
Spermine-NONOate	Alexis Corp., Grünberg
TCA	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden über die Unternehmen Calbiochem (Bad Soden), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden gemäß den Herstellerangaben gelagert und verarbeitet.

2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Student t-test für gepaarte Proben benutzt. Wo mehr als zwei Proben miteinander verglichen wurden, wurde eine Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Mechanismus der dilatativen Wirkung von PTHrP(1-34)

3.1.1 *Konzentrationswirkungskurve für PTHrP$_{1-34}$*

Untersucht wurde zunächst bei welcher Konzentration PTHrP$_{1-34}$ seinen maximalen dilatativen Effekt zeigt. Dazu wurden die Herzen (n=8), mit einem basalen Koronarfluss von 5,83±0,17 ml/min mit Phenylephrin (10 µmol/l) vorkonstringiert, welches den Koronarfluss auf 4,19 ±0,15 ml/min senkte.

PTHrP$_{1-34}$ wurde dann in aufsteigender Konzentration dazugegeben. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 0,01 nmol/l, die dann kontinuierlich um den Faktor 10 erhöht wurde (siehe Abb.1). Die maximal dilatative Wirkung, ca. 15%, zeigte sich bei einer Konzentration von 100 nmol/l, wobei eine zusätzliche Erhöhung der Konzentration keine weitere Zunahme des Koronarflusses brachte. Diese Konzentration (100 nmol/l) wurde für alle weiteren Versuche beibehalten.

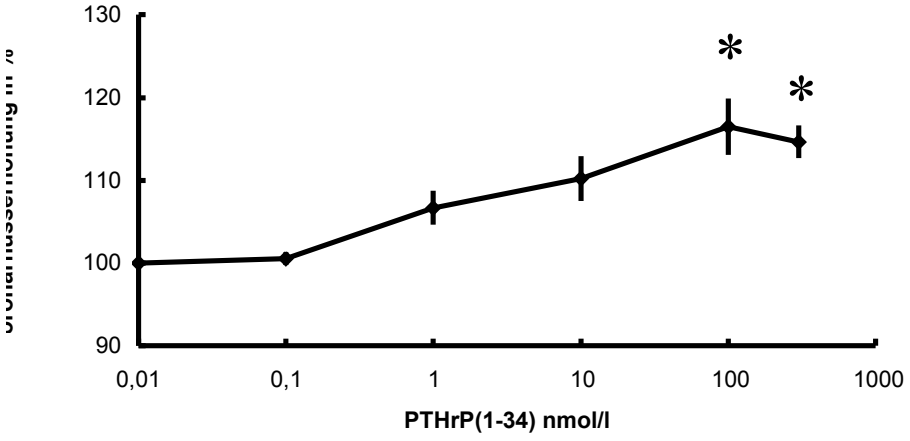


Abb3.1: Konzentrationswirkungskurve von PTHrP an mit Phenylephrin vorkonstringierten Herzen. Auf der Ordinate ist der Koronarfluss in % dargestellt. Die Abszisse zeigt die ansteigende Konzentration für PTHrP$_{1-34}$ von 0,01 bis 300 nmol/l. Die Darstellung der Koronarflussänderung erfolgt als Mittelwert ± Standardfehler der Absolutwerte (n=8). * symbolisiert einen signifikanten Unterschied gegenüber der PTHrP freien Kontrolle mit $p \leq 0,05$.

3.1.2 *Zeitkinetik des koronarflusssteigernden Effektes von PTHrP1-34*

Für alle Herzen (n=13) wurde zuerst der basale Koronarfluss gemessen. Dieser betrug im Mittel 6,45±0,15 ml/min. Mit Phenylephrin wurden die Herzen wieder vorkonstringiert und der Koronarfluss sank auf ca. 70% des Ausgangwertes. Nach Applikation von PTHrP1-34 (100 nmol/l) nahm der Koronarfluss innerhalb der ersten 3 Minuten gegenüber der Vorkonstriktion mit Phenylephrin signifikant zu (siehe Abb.2). Durch die dilatatierende Wirkung wurde der Koronarfluss annähernd auf den Ausgangswert zurückgebracht.

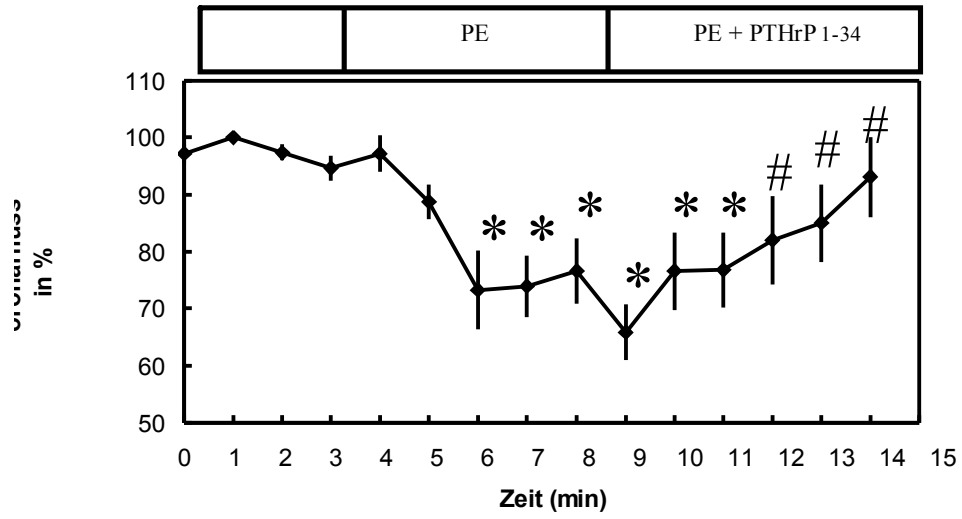


Abb3.2 Dargestellt ist der Zeitverlauf der vasodilatativen Wirkung von PTHrP1-34 an vorkonstringierten Herzen (Phenylephrin, PE, 10 µmol/l). * zeigt den signifikanten Unterschied mit $p \leq 0{,}05$ im Vergleich mit der Kontrolle und # steht für den signifikanten Unterschied ($p \leq 0{,}05$) im Vergleich mit der PE-Vorkonstrinktion. Auf der y-Achse ist der Koronarfluss in % als Mittelwert ± Standardfehler der Absolutwerte dargestellt. Die x-Achse gibt die Zeit in Minuten wieder.

3.1.3 *PTHrP1-34 und Isoprenalin steigern den Koronarfluss gleichsinnig*

Die Ausgangsbedingung für die folgenden beiden Versuche (n=6) war erneut eine Vorkonstriktion mit Phenylephrin. Der basale Koronarfluss betrug 5,65±0,22 ml/min, der dann unter Phenylephrin auf 4,12±0,17 ml/min zurückging.

PTHrP wurde nun mit Isoprenalin, einem β-Symphatomimetikum verglichen. Isoprenalin wurde mit einer Konzentration von 1000 nmol/l eingesetzt. Der Kurvenverlauf (Abb.3) zeigt, dass PTHrP und Isoprenalin den Koronarfluss um ca. 25% in gleichsinniger Weise mit ähnlicher Kinetik steigern.

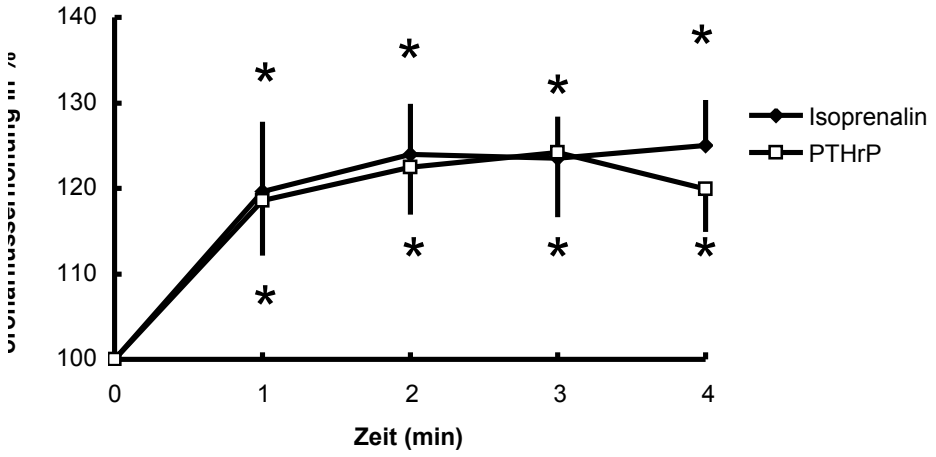


Abb3.3 Dargestellt ist der Vergleich der Auswirkung von Isoprenalin (100 nmol/l) und PTHrP1-34 auf den Koronarfluss. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % dar. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten dargestellt. Zur Darstellung kommen Mittelwert ± Standardfehler der Absolutwerte. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangsfluss ($p \leq 0,05$, n=6).

3.1.4 Der Einfluss einer Hemmung der NO-Synthase, Cyclooxygenase oder Proteinkinase A auf den dilatierenden Effekt von PTHrP

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Mediatorsystem auf den dilatativen Effekt von PTHrP$_{1-34}$ untersucht. Dazu wurden diese verschiedenen Botensysteme selektiv gehemmt und unter dieser Hemmung PTHrP$_{1-34}$ appliziert.

3.1.4.1 Hemmung der NO-Synthase durch L-Nitro-Arginin

In dieser Untersuchung wurde der Effekt von PTHrP$_{1-34}$ unter L-Nitro-Arginin (L-NA), einem irreversiblen Hemmstoff der endothelialen NO-Synthese, gezeigt. L-Nitroarginin wurde in einer Konzentration von 100 µmol/l eingesetzt.
Unter L-Nitro-Arginin sah man unter PTHrP$_{1-34}$ noch eine Zunahme des Flusses um ca.17 %, das sind ca. 8 % weniger als unter alleiniger PTHrP$_{1-34}$ Applikation zu beobachten waren. Die Wirkung von PTHrP$_{1-34}$ setzte auch erst mit einer gewissen Latenz ein (siehe Abb.19.2 und Abb.19.1).

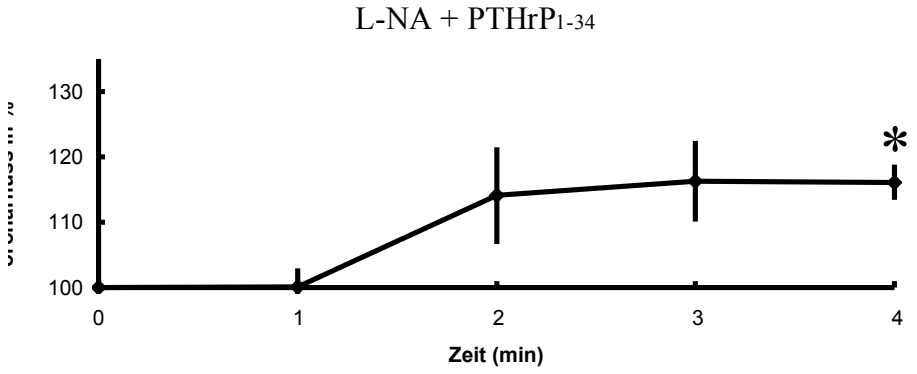


Abb.3.4: Dargestellt sind die Veränderung des dilataiven Effekts von PTHrP$_{1-34}$ unter Hemmung der NO-Synthase durch L-Nitro-Arginin (100 µmol/l). Die Werte sind aus n=5 Experimenten als Mittelwert ± Standardfehler der Absolutwerte in % dargestellt. *= signifikanter Unterschied zum Ausgangsfluss vor Applikation von PTHrP ($p<0,05$, n=6).

3.1.4.2 Hemmung der Cyclooxygenase

Der basale Fluss betrug bei diesen Experimenten im Durchschnitt 5,83±0,23 ml/min. Nach dieser Messung wurden die Herzen (n=5) mit Phenylephrin in einer Konzentration von 10 µmol/l vorkonstringiert. Indometacin (Indo) wurde in einer Dosierung von 10 µmol/l in das Perfusat appliziert um die Cyclooxygenase zu hemmen.
Der vasodilatative Effekt von $PTHrP_{1-34}$ zeigt sich unverändert unter Cyclooxygenase Hemmung. Der Koronarfluss stieg signifikant um ca. 25% (siehe Abb.19.3) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter Indometacin war der vasodilatierende Effekt von $PTHrP_{1-34}$ aber transient, d.h. nach 4 Minuten war keine Flusssteigerung mehr zu sehen.

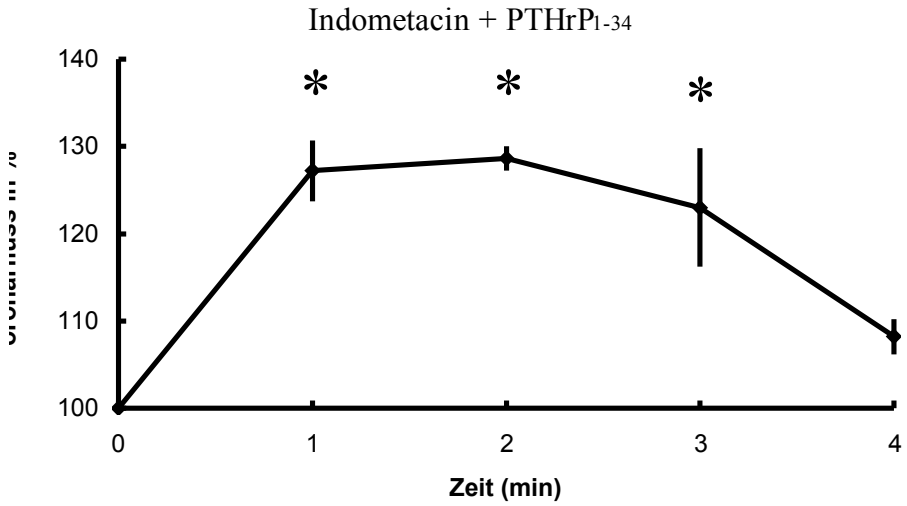


Abb.3.5: Dargestellt ist der Einfluss der Hemmung der Cyclooxygenase auf die Wirkung von PTHrP auf den Koronarfluss. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % dar. Zur Darstellung kommen Mittelwerte ± Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten. *= signifikanter Unterschied zum Ausgangswert vor Applikation von PTHrP ($p<0,05$, n=6).

3.1.4.3 Blockierung der Proteinkinase A

Bei dieser Versuchsreihe mit n=5 Experimenten lag der basale Fluss im Durchschnitt bei 5,13±0,26 ml/min. Die Vorkonstriktion wurde wieder mit Phenylephrin (10 µmol/l) durchgeführt. Die anschließende Applikation von H8 (4-N-(2-Methylamino)ethyl-5-isoquinolinesulfonamid, 2xHCl) in einer Konzentration von 100 nmol/l diente der Hemmung der Proteinkinase A. Unter dieser Blockade zeigt die Gabe von PTHrP(1-34) einen kurzen initialen, dilatativen Effekt der nach 2 Minuten seinen Höhepunkt erreichte (ca.15% mehr im Vergleich zum Ausgangswert) und dann stark abfiel (siehe Abb.3.6 und 3.7).

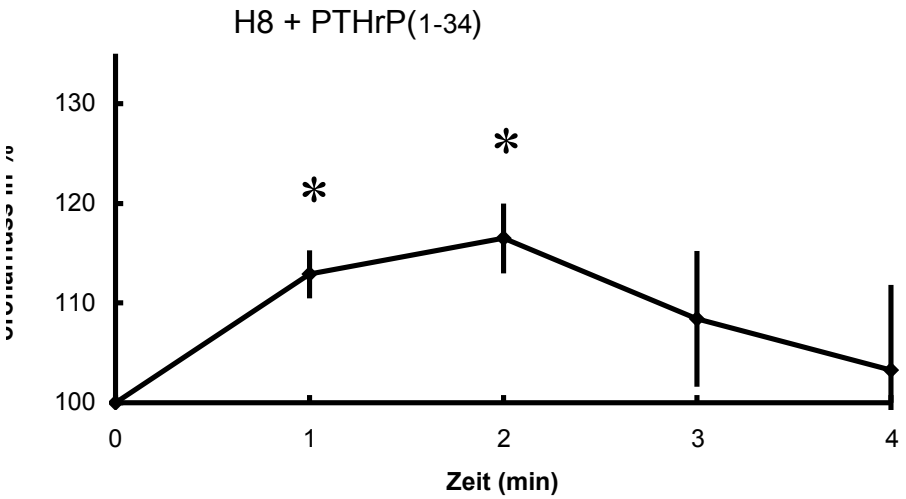


Abb.3.6: Zur Darstellung kommt der dilatative Effekt des PTHrP$_{1-34}$ unter Blockade der Proteinkinase A im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. *= signifikanter Unterschied zum Ausgangswert vor Applikation von PTHrP ($p \leq 0{,}05$, n=6).

3.1.4.4 Zusammenfassung der Koronarflussänderungen unter der Blockade der verschiedenen Botenstoffsysteme

Zusammenfassend lässt sich aus den Versuchen 3.1.4.1 – 3.1.4.4 feststellen, dass der vasodilatative Effekt von PTHrP durch Hemmung verschiedener Botensysteme vermindert wurde. Kein Effekt auf die Steigerung des Koronarflusses zeigte sich unter der Hemmung der NO-Synthase durch L-Nitroarginin. Hingegen verminderte sich die Koronarflusserhöhung unter Indometacin, das die Cyclooxygenase irreversibel hemmt und die stärkste Abnahme der Koronarflusserhöhung zeigte sich unter Blockade der Proteinkinase A durch H8 (siehe Abb.3.7).

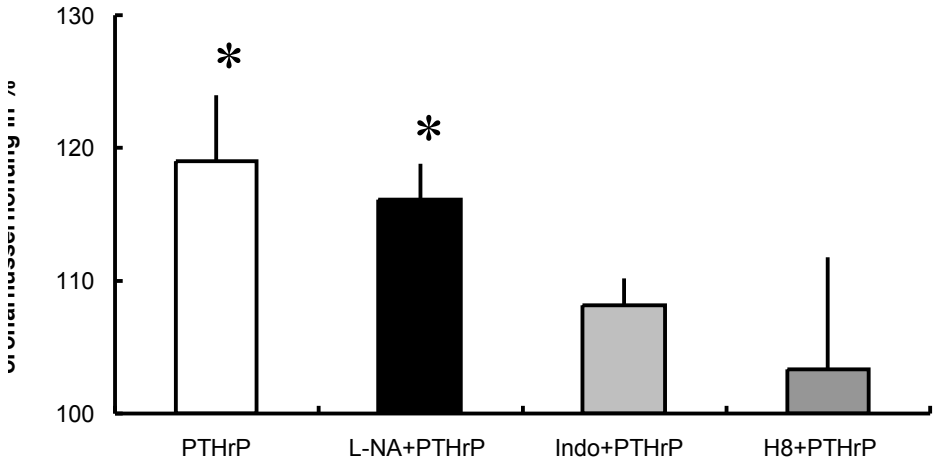


Abb.3.7: Die Graphik zeigt die Veränderung des Koronarflusses unter alleiniger Gabe von $PTHrP_{1-34}$ und in Kombination mit Hemmstoffen div. Enzymsystemen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ordinate zeigt die Änderung des Koronarflusses in % an. Die Abszisse gibt die Chemikalien wieder die miteinander in ihrer Wirkung verglichen werden. Zur Darstellung kommen Mittelwerte ± Standardfehler der Absolutwerte. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0{,}05$, n=6).

3.1.5 Bradykinin steigert den Koronarfluss unter basalen Bedingungen

Die vasodilatierende Wirkung von PTHrP wurde in folgenden Versuchserien mit derjenigen eines klassischen endothelabhängig wirkenden Agonisten verglichen, nämlich Bradykinin.

Zu Beginn wurde der basale Fluss der Herzen (n=11) gemessen, welcher bei 5,27±0,23 ml/min lag. Im Gegensatz zu den anderen Versuchsreihen wurde nicht vorkonstringiert sondern Bradykinin in einer Konzentration von 10 µmol/l nach der Basalflussmessung appliziert. Es zeigte sich eine, gegenüber der Kontrolle signifikante, Zunahme des Koronarflusses um ca. 25% (siehe Abb.3.8, 8 Minuten-Wert), der drei Minuten nach Zugabe des Bradykinins auftrat.

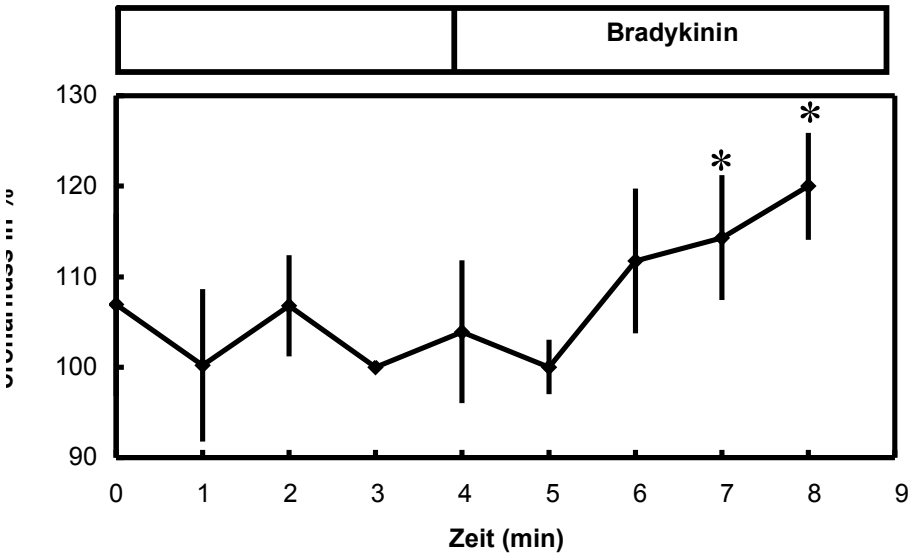


Abb.3.8: Vasodilatativer Effekt von Bradykinin unter basalen Bedingungen ohne Vorkonstrinktion. Auf der Abszisse ist der Koronarfluss in % im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen. Die Ordinate zeigt die Zeit in Minuten. Dargestellt sind Mittelwerte und die Standardfehler der Absolutwerte (n=11). *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0,05$, n=6).

3.1.6 Untersuchung zur NO-Freisetzung anhand der Nitritbestimmung

Gemessen wurde in diesen Untersuchungen die Freisetzung von Nitrit als indirektes Maß für die NO-Produktion. Die Proben mit den Effluat wurden mit Griessreagenz behandelt und anschließend wurde photometrisch der Nitritgehalt bestimmt.

3.1.6.1 Vergleich zwischen Bradykinin und PTHrP(1-34) in der Nitritfreisetzung

Unter Bradykininapplikation zeigte sich eine deutliche Zunahme der Nitritfreisetzung von basalen ca. 5 nmol/l auf ca. 13 nmol/l (siehe Abb.3.9). Die Gabe von PTHrP$_{1-34}$ zeigte keinen Effekt auf die Nitritkonzentration. Sie blieb fast konstant auf ca.6 nmol/l.

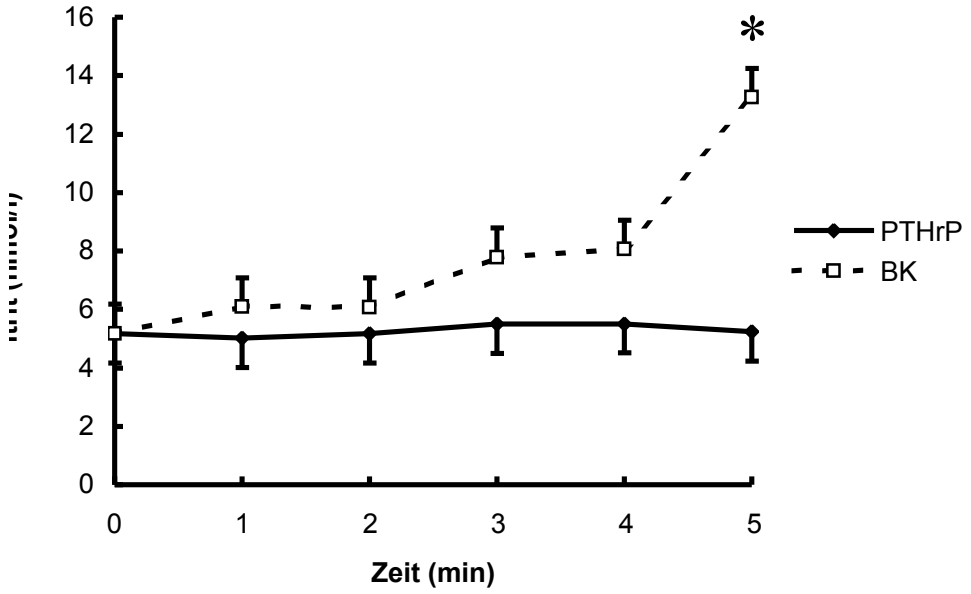


Abb.3.9: Die Graphik zeigt die Nitritfreisetzung unter Bradykinin und PTHrP$_{1-34}$ im Vergleich als Maß für die Stickstoffmonoxidfreisetzung. Die Abszisse zeigt die Nitritkonzentration in nmol/l. Die Ordinate die Zeit in Minuten. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0{,}05$, n=6).

3.1.6.2 Freisetzung von endogenem PTHrP unter PTHrP(1-34), Bradykinin und Spermine-NONOate

Es wurde unter basalen Bedingungen die Freisetzung von endogenem PTHrP mittels immunologischen Nachweises in den Perfusatproben, sowie die Flussänderungen im Koronarfluss untersucht. Zu diesem Zweck wurden $PTHrP_{1-34}$, Bradykinin und Spermine-NONOate (SpNONO) verglichen.

Unter Gabe von $PTHrP_{1-34}$ zeigte sich keine signifikante Zunahme der endogenen PTHrP-Freisetzung. Auch die Applikation von Bradykinin zeigte keinen Effekt in der Freisetzung. Die Gabe von exogenen NO in Form des NO-Donors Spermine-NONOate in einer Konzentration von 10 nmol/l ließ das endogene PTHrP auch nicht ansteigen (siehe Abb.3.10).

Der Koronarfluss, mit einem basalen Fluss von 5,27±0,40 ml/min (n=4), zeigte eine signifikante Erhöhung um ca. 18% unter Bradykinin und um ca. 20 % bei Spermine-NONOate (siehe Abb.3.11). PTHrP(1-34) konnte den Koronarfluss unter basalen Bedingungen nicht erhöhen (siehe Abb. 6 und 7).

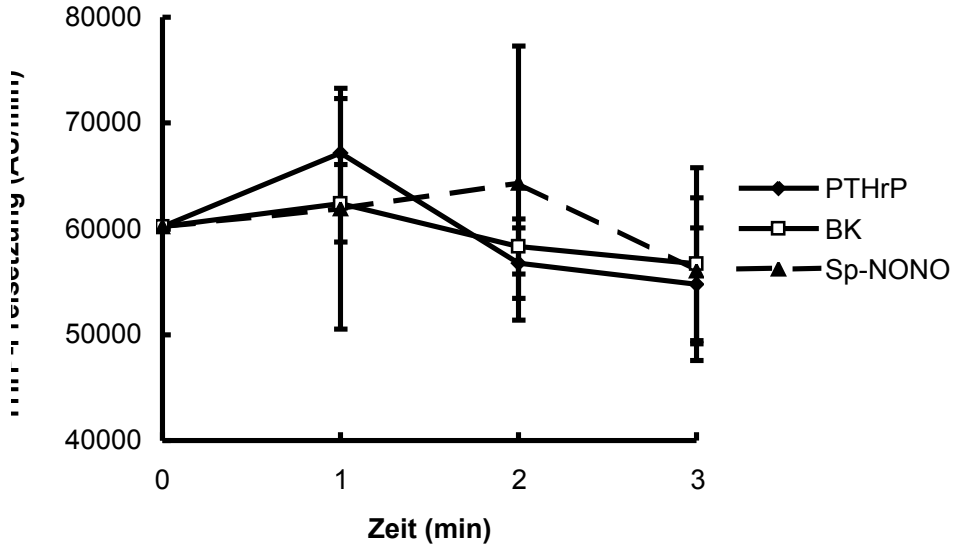


Abb.3.10: Dargestellt sind Messungen der endogenen PTHrP-Freisetzung im Vergleich unter $PTHrP_{1-34}$-, Bradykinin- und Spermine-NONOate-Gabe. Man sieht keine signifikante Zunahme der Freisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

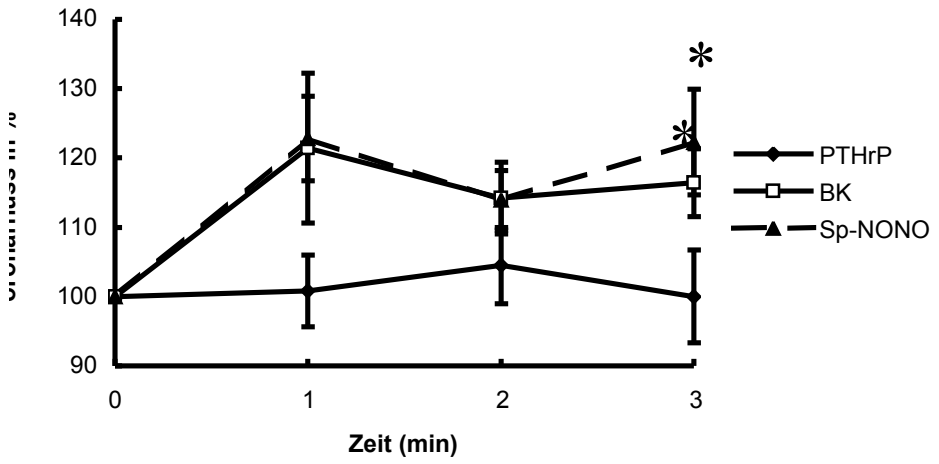


Abb.3.11: Vergleich von PTHrP(1-34), Bradykinin und Spermine-NONOate in ihrer Wirkung auf den Koronarfluss. Die Abszisse zeigt den Koronarfluss in % im Vergleich zur Kontrolle. Zur Darstellung kommen Mittelwerte ± Standardfehler der Absolutwerte. Die Ordinate gibt die Zeit in Minuten wieder. *= signifikanter Unterschied zur basalen Freisetzung.

3.1.6.3 Die Wirkung von Bradykinin ist NO-abhängig

Verglichen wird in diesem Experiment die Wirkung von Bradykinin auf den Koronarfluss mit und ohne Hemmung der NO-Synthese. Die Herzen (n=6) hatten einen basalen Fluss von 5,27±0,40 ml/min der nach Zusatz von Bradykinin um ca. 20 % anstieg (Abb.3.12).

Die nun kombinierte Gabe von Bradykinin und L-NA brachte keine Zunahme des Koronarflusses. Er blieb bei annährend der gleichen Flussrate wie unter der alleinigen L-NA Applikation (siehe Abb. 3.12).

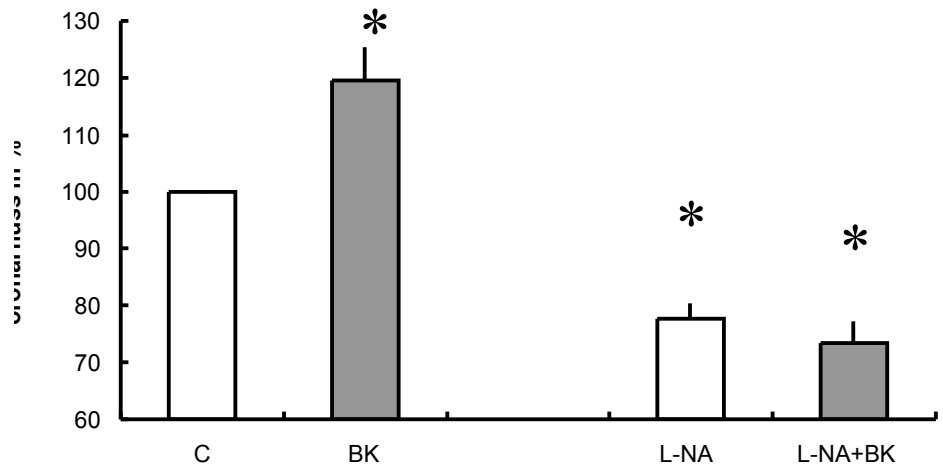


Abb.3.12: Veränderung des dilatativen Effekts von Bradykinin unter Hemmung der endothelialen NO-Synthese. Die Wirkung von Bradykinin ist NO-abhängig. Zur Darstellung kommen Mittelwerte ± Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt den Koronarfluss in %, bezogen auf die Kontrolle und die Ordinate stellt die Zeit in Minuten dar.*= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0{,}05$).

3.1.6.4 Die Wirkung von Bradykinin an vorkonstrinkierten Herzen ist NO-abhängig

In einer weiteren Versuchsreihe wurde im Gegensatz zu 3.1.6.3 nicht unter basalen Bedingungen sondern unter Vorkonstriktion mit Phenylephrin, die Wirkung von Bradykinin auf den Koronarfluss gemessen.

Unter Gabe von Phenylephrin sinkt der basale Fluss (6,44±0,44 ml/min, n=4) um ca. 18 %. Die darauf folgende Applikation von Bradykinin ließ den Fluss wieder auf den Ausgangswert ansteigen. Nach Vorbehandlung und kontinuierlicher Gabe von L-Nitroarginin zeigt Bradykinin jedoch keinen vasodilatativen Effekt (siehe Abb.3.13).

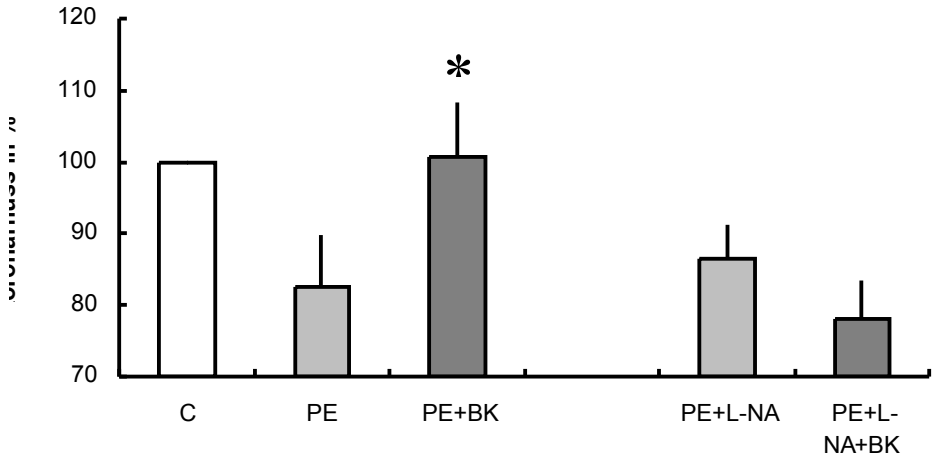


Abb.3.13: Veränderung des dilatativen Effekts von Bradykinin an vorkonstringierten Herzen unter Hemmung der endothelialen NO-Synthese. Die Wirkung von Bradykinin ist also NO-abhängig. Zur Darstellung kommen Mittelwerte ± Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt den Koronarfluss in %, bezogen auf die Kontrolle und die Ordinate stellt die Zeit in Minuten dar. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p<0,05$).

3.2 Wirkung von PTHrP auf den Koronarfluss nach Ischämie

Die folgenden Versuche untersuchen den Einfluss von PTHrP auf den Koronarfluss nach Ischämie. Dazu wurden die Herzen einer 30 minütigen Nullfluss-Ischämie ausgesetzt und danach wieder reperfundiert.

3.2.1 Die endothelabhängige Vasodilation ist post-ischämisch stark eingeschränkt

Der basale Koronarfluss der Herzen (n=4) betrug vor Simulation der Ischämie 5,01±0,66 ml/min. Nach der dreißigminütigen Ischämie betrug der basale Fluss noch 3,02±0,42 ml/min.

In dieser Phase der Reperfusion wurde Bradykinin in einer Konzentration von 10 µmol/l appliziert. Bradykinin entfaltet seinen vasodilatativen Effekt über die endothelabhängige NO-Freisetzung (s.o.). Es zeigte sich eine weitere Abnahme des Flusses nach drei Minuten um ca. 20% im Vergleich zum Kontrolle (= basaler, post-ischämischer Koronarfluss) (siehe Abb.3.14).

Zum Vergleich wurde in einer zweiten Serie nach dreißigminütigen Ischämie Spermine-NONO appliziert. Mit Beginn der Zugabe zeigte sich ein Anstieg des Koronarflusses

mit einem Maximum von 40% nach zwei Minuten. Nach vier Minuten erreichte der Fluss annähernd wieder post-ischämische, basale Werte (siehe Abb.3.14).

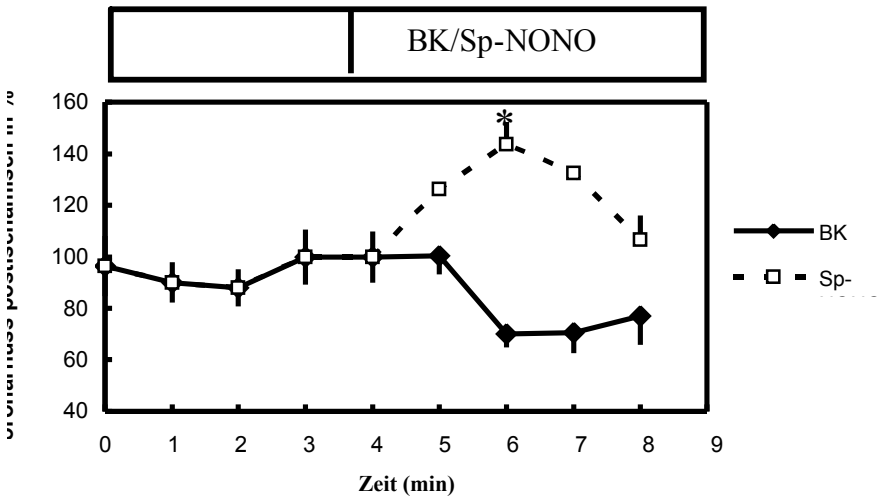


Abb.3.14: Vergleichender Effekt der post-ischämischen Applikation von Bradykinin mit Spermine-NONOate. Bradykinin vermag den Koronarfluss nicht mehr zu steigern, wohl aber Spermine-NONOate.
Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % dar, bezogen auf die post-ischämische Kontrolle. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p<0,05$).

3.2.2 *Endothelunabhängige Steigerung des Koronarflusses durch NO im prä- und postischämischen Myokard unverändert*

Verglichen wurde die Wirkung von exogen zugeführten NO, durch den NO-Donor Spermine-NONOate, auf den Koronarfluss prä- oder post-ischämisch.

Das dem Perfusat zugesetzte SP-NONO in einer Dosierung von 10 nmol/l zeigte vor und nach der 30-minütigen Nullfluss-Ischämie die gleiche Kinetik und Potenz den

Koronarfluss zu steigern (siehe Abb. 3.15). Die endothelunabhängige Steigerung des Koronarflusses durch NO im prä- und postischämischen Myokard ist unverändert.

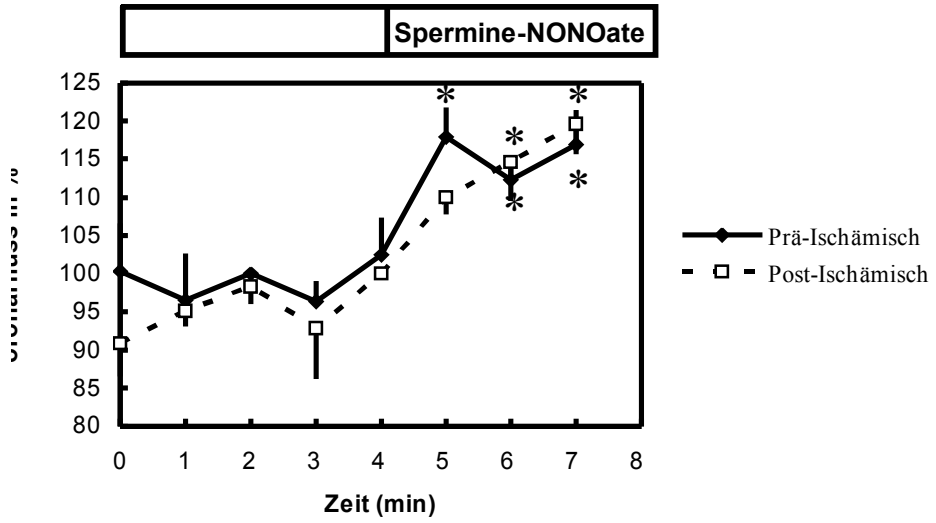


Abb.3.15: Einfluss von Spermine-NONOate auf den Koronarfluss im prä- und post-ischämischen Myokard. Ein Vergleich mit den Kontrollen (basaler Fluss: prä-ischämisch 6,70±0,42 ml/min; post-ischämisch 3,04±0,42 ml/min; n=5) zeigt einen signifikanten Anstieg des Koronarflusses sowohl prä- als auch post-ischämisch.
Die Ordinate stellt den Koronarfluss in %. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0,05$).

3.2.3 PTHrP dilatiert die Gefäße prä- und post-ischämisch

Untersucht wurde jetzt vergleichend der dilatative Effekt von PTHrP$_{1-34}$ auf den Koronarfluss vor und nach der Ischämie (n=6) unter Vorkonstriktion mit Phenylephrin. Sowohl prä- als auch postischämisch zeigte sich eine zu den Kontrollgruppen signifikante Erhöhung des Flusses. PTHrP$_{1-34}$ dilatiert die Gefäße prä- und post-ischämisch in annähernd gleicher Potenz, um 20 bzw. 23 % (siehe Abb.3.16).

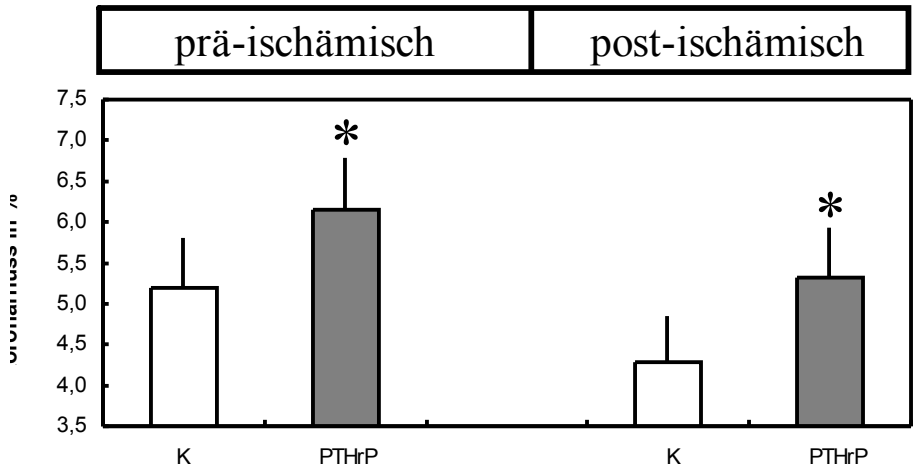


Abb. 3.16: Die Graphik zeigt, das PTHrP$_{1-34}$ in der Lage ist den Koronarfluss vor und nach der simulierten 30-minütigen Ischämie den Koronarfluss signifikant, im Vergleich zur Kontrolle, zu steigern. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in %. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0,05$).

3.3 Wirkung einer selektiven Stimulation des PTH-2-R durch TIP39 auf den Koronarfluss

3.3.1 Einfluss von TIP39 auf den basalen Koronarfluss

Die Herzen dieser Versuchsreihe hatten einen basalen Koronarfluss von 5,59±0,65 ml/min.

Die Gabe von TIP39 mit einer Konzentration von 100 nmol/l zeigte keine signifikante Erhöhung des Flusses im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 3.17).

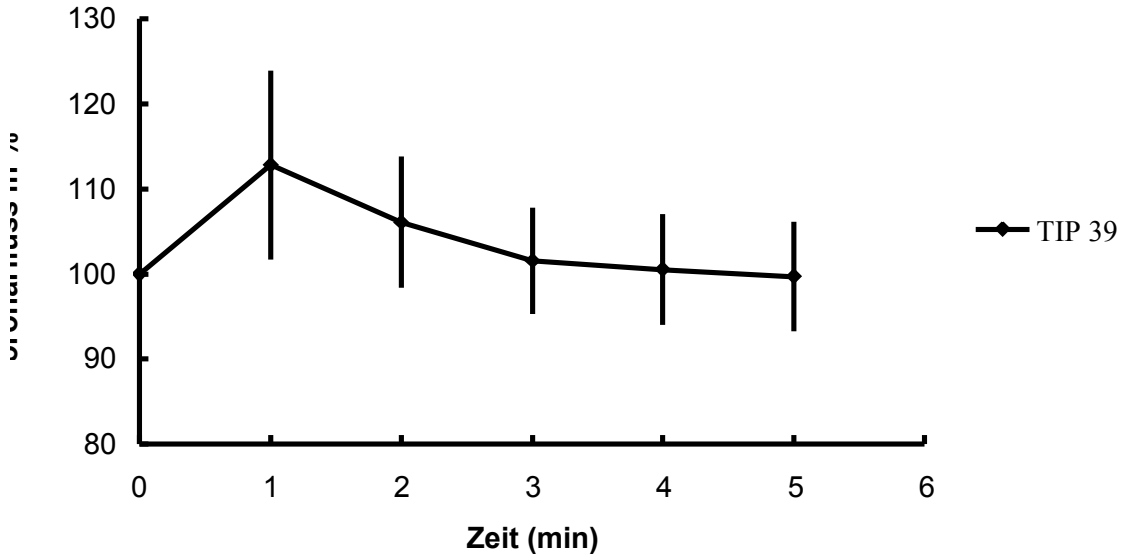


Abb.3.17: Dargestellt ist die Wirkung von TIP39 auf den basalen Koronarfluss. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % dar, bezogen auf die post-ischämische Kontrolle. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten.

3.3.2 TIP39 steigert den Koronarfluss nach Desensibilisierung der PTH-1R

Die Ausgangsbedingung für die folgenden beiden Versuche (n=6) bildet wieder eine Vorkonstrinktion mit Phenylephrin, in einer Konzentration von 10 µmol/l. Der basale Koronarfluss beträgt 4,54±0,40 ml/min, der dann unter Phenylephrin auf 3,54±0,33 ml/min zurückging.

Verglichen wurde die Wirkung von TIP39 mit und ohne Desensibilisierung des PTH-1-Rezeptors. Zu diesem Zweck wird zusätzlich bei einer Versuchsreihe ^{5}Ile-PTHrP in einer Konzentration von 100 nmol/l präappliziert.

TIP39 zeigt bei alleiniger Gabe keinen signifikanten Effekt, doch nach vorheriger Gabe von ^{5}Ile-PTHrP lässt sich nach drei Minuten ein signifikanter Anstieg (im Vergleich zur Kontrolle) beobachten. Der Koronarfluss steigert sich um ca. 20% (siehe Abb.3.18).

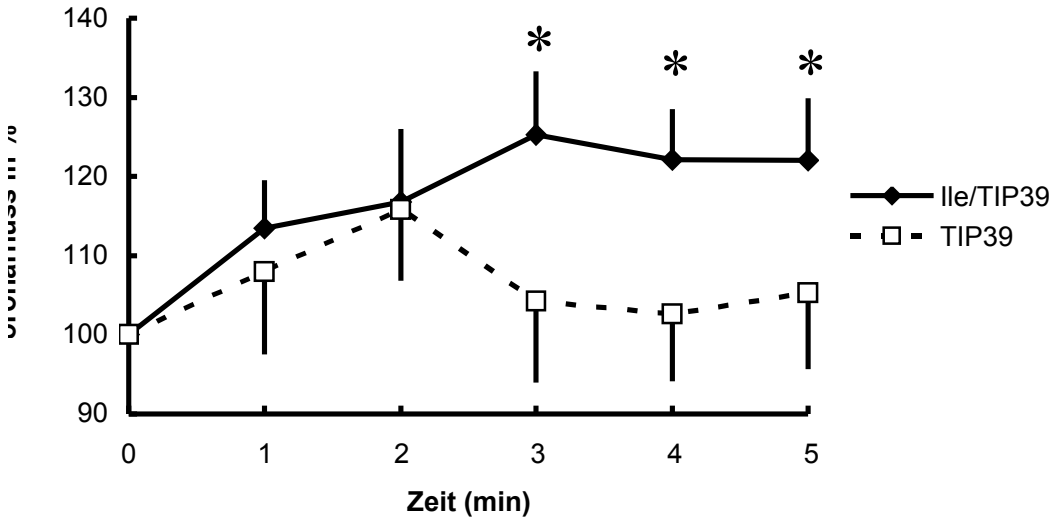


Abb.3.18: Die Abbildung zeigt die verschiedenen Effekte von TIP 39 mit und ohne Desensibilisierung der PTH-1-R durch^{5}Ile-PTHrP. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % dar. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten.*= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0{,}05$).

3.3.3 Die Steigerung des Koronarflusses nach Desensibilisierung des PTH-1R ist NO-abhängig

Im folgenden Versuch (basaler Koronarfluss: 4,47±0,56 ml) wurde L-NA (Konzentration:100 µmol/l), zur Hemmung der NO-Synthase, kontinuierlich perfundiert. Durch die Zugabe von ^{5}Ile-PTHrP wurden die PTH-1R wieder desensibilisiert. Der Koronarfluss betrug unter L-NA/ ^{5}Ile-PTHrP noch 3,55±0,46 ml/min.

Unter Blockade der NO-Synthese und bei vorheriger Desensibilisierung der PTH-1R wurde TIP 39 appliziert und zeigte keinen bedeutsamen Anstieg der Flussrate (siehe Abb.3.19).

Die Steigerung des Koronarflusses nach Desensibilisierung der PTH-1R ist NO-abhängig.

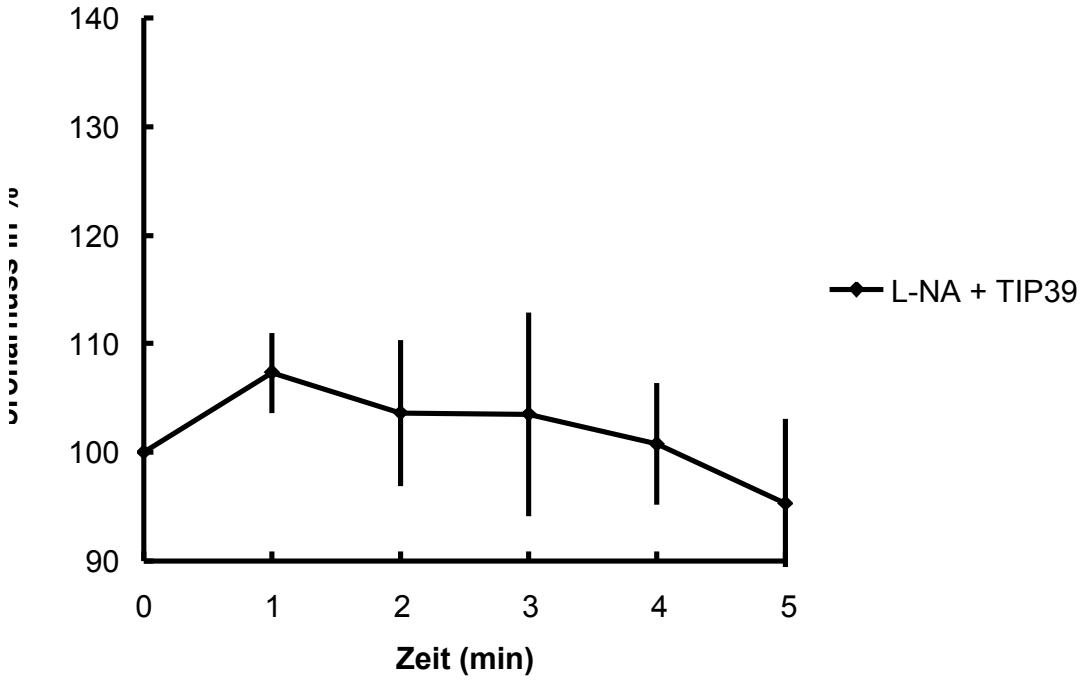


Abb.3.19: Die Graphik zeigt die NO-abhängig Wirkung von TIP 39 nach Desensibilisierung der PTH-1-R. Der Versuch unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrolle. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % dar. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten

3.4 Gleichzeitige Stimulation des PTH-1-Rezeptor und PTH-2-Rezeptor durch ^{5}Ile-PTHrP

3.4.1 Einfluss von ^{5}Ile-PTHrP auf den basalen Koronarfluss

Untersucht wurde der Effekt von ^{5}Ile-PTHrP auf den basalen Fluss an n=6 Experimenten.

Der basale Koronarfluss betrug dabei im Mittel 3,81±0,19 ml/min. Nach Gabe von ^{5}Ile-PTHrP mir einer Dosis von 100 nmol/l kam es erst zu einem Abfall des Fluss um ca. 15% (siehe Abb.3.20).

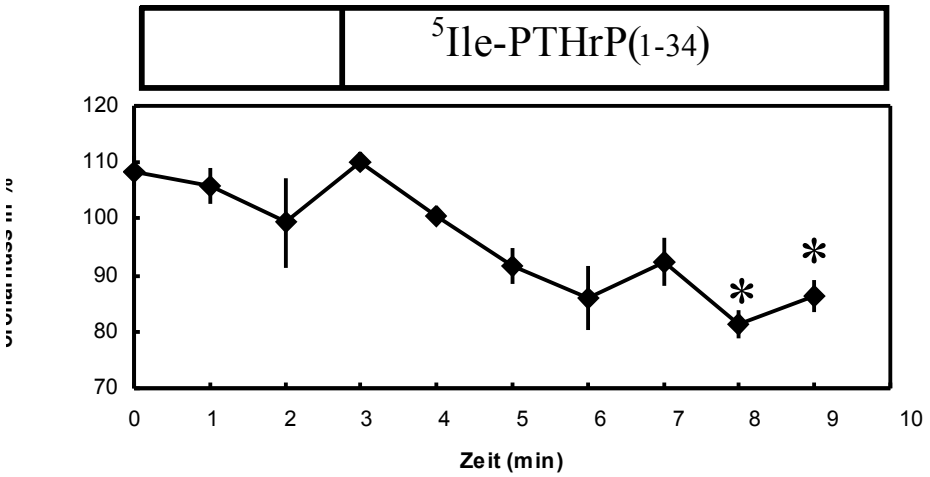


Abb.3.20: Einfluss von ^{5} Ile-PTHrP auf den basalen Koronarfluss. Die Ordinate zeigt den Koronarfluss in % und die Abszisse stellt die Zeit in Minuten dar. Die Werte sind als Mittelwert dargestellt mit dem Standardfehler der Absolutwerte. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0,05$).

3.4.2 [5]*Ile-PTHrP steigert verzögert gegenüber PTHrP den Koronarfluss*

In diesem Versuch wurde die Wirkung von [5]Ile-PTHrP und PTHrP auf den Koronarfluss verglichen. Unter Vorkonstriktion mit Phenylephrin (10µmol/l) führt $PTHrP_{1-34}$, in einer Konzentration von 100 nmol/l, direkt nach der Applikation zu einer Erhöhung des Koronarflusses um ca. 20%. Dabei wird nach der ersten Minute ein Plateau erreicht (siehe Abb. 3.21). [5]Ile-PTHrP hingegen führt erst verzögert mit einer Latenz von drei Minuten zu einem Anstieg der Flussrate um ca. 15% gegenüber der Kontrolle (siehe Abb.3.21). Beide Versuchsreihen weisen im statistischen Test eine Signifikanz des Anstiegs des Koronarflusses im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

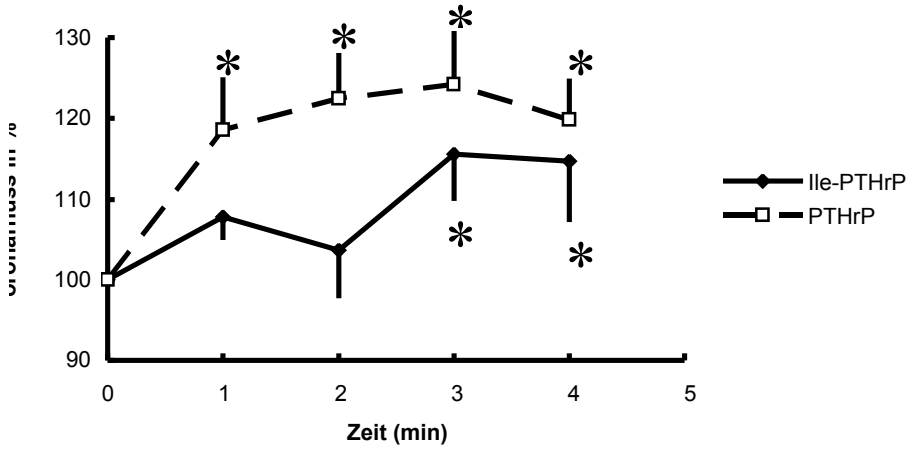


Abb.3.21: Vergleich der Effekte von $PTHrP_{1-34}$ und [5]Ile-PTHrP auf den Koronarfluss. PTHrP(1- 34) steigert den Koronarfluss schneller als[5]Ile-PTHrP, das erst mit einer gewissen Latenz zu einem Anstieg führt. Die Abszisse zeigt den Koronarfluss in % im Vergleich zur Kontrolle. Die Ordinate gibt die Zeit in Minuten wieder. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0{,}05$).

3.4.3 PTHrP steigert den Koronarfluss, ^{5}Ile-PTHrP senkt ihn in Gegenwart von L-NA

Untersucht wurde bei diesem Experiment die Wirkung von PTHrP$_{1-34}$ und ^{5}Ile-PTHrP auf den Koronarfluss unter Hemmung der NO-Synthese durch L-Nitroarginin.
Dabei zeigte sich unter Gabe von PTHrP$_{1-34}$ eine Zunahme des Koronarflusses um ca.15% (siehe Abb. 3.22). Hingegen führte die Applikation von ^{5}Ile-PTHrP zu einer Abnahme des Koronarflusses um ca. 10% (siehe Abb. 3.22).

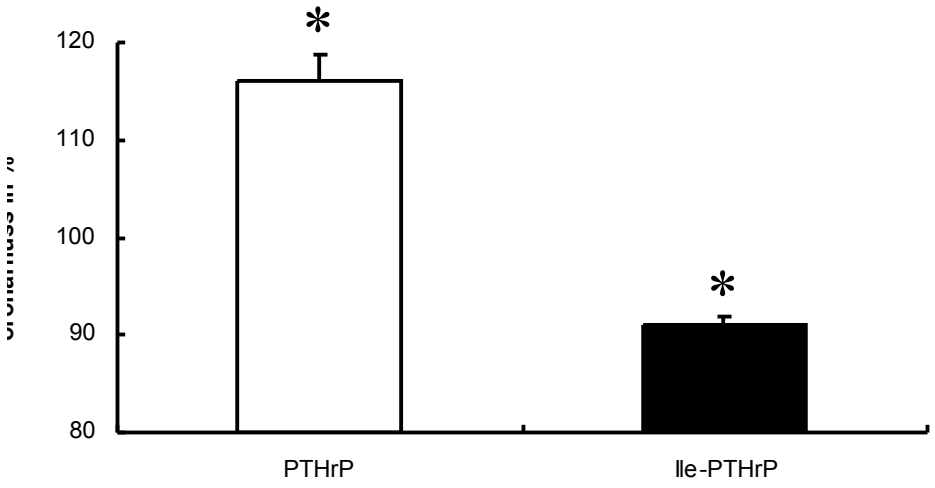


Abb.3.22: Die Graphik zeigt, dass PTHrP(1-34) unter Hemmung der NO-Synthese immer noch in der Lage ist den Koronarfluss um ca.18% zu steigern. Ile-PTHrP hingegen führt zu einer Abnahme des Flusses um ca. 10%. Die Ordinate stellt den Koronarfluss in % da. Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten dargestellt. Zur Darstellung kommen Mittelwerte mit dem Standardfehler der Absolutwerte. *= signifikanter Unterschied zum basalen Ausgangswert ($p \leq 0{,}05$).

4. Diskussion

4.1 . *Hauptbefunde*

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche intrazelluläre Signalwege, derer sich PTHrP bei seiner vasodilatativen Wirkung im koronaren Gefäßbett bedient, untersucht. Dabei war die Frage nach einer Beteiligung von NO als Mittel der Signaltransduktion von wesentlicher Bedeutung. Es zeigte sich, dass man eine Beteiligung von NO an der vasodilatativen Wirkung von PTHrP über dem PTH-1-R im Koronarbett der Ratte ausschließen kann.
Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PTHrP sowohl prä- als auch postischämisch den Koronarfluss steigern kann, obwohl die endothelabhängige Vasodilatation postischämisch stark eingeschränkt ist.
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TIP39 als Vertreter der PTHrP-Familie den Koronarfluss steigert. Verantwortlich ist hierfür ein NO-abhängiger Mechanismus.

4.2 . *Mechanismus der dilatativen Wirkung von PTHrP*

Um den genauen Mechanismus der dilatativen Wirkung von PTHrP zu detektieren wurde es mit anderen Hormonen in seiner Wirkung verglichen. Des Weiteren wurde seine Wirkung unter Blockade verschiedener intrazellularer Mediatorsysteme untersucht. Bislang wurden als Mechanismen für die dilatierende Wirkung von PTHrP in unterschiedlichen Gefäßabschnitten entweder eine Stimulation der glattmuskulären Adenylatcyclase oder die Stimulation der endothelialen NO-Freisetzung beschrieben.
Im Vergleich mit Isoprenalin und PTHrP$_{1-34}$ zeigte sich eine gleichsinnige Steigerung des Koronarflusses, die in Kinetik und Potenz sich sehr ähnlich zeigte. Isoprenalin, als Sympathomimetikum, bedient sich dabei dem cAMP als second messenger.
Unter Hemmung der endothelialen NO-Synthase sowie der Cyclooxygenase zeigte sich keine Einschränkung der vasodilatativen Wirkung von PTHrP$_{1-34}$. Hingegen verminderte sich diese Wirkung unter Blockade der Proteinkinase A. Dies spricht gegen

eine Beteiligung von NO bei der Erhöhung des Koronarflusses und für einen Mechanismus mit Stimulation der Adenylatcyclase.
Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Nitritfreisetzung von Bradykinin und $PTHrP_{1-34}$ als indirektes Maß für eine NO-Bildung verglichen.
Bradykinin ist ein klassischer endothelabhängiger Vasodilatator dessen vasodilatativer Effekt über NO vermittelt wird (Mombouli et al. 1999). Er steigert den Koronarfluss auch unter basalen Bedingungen. Die Fähigkeit von Bradykinin die Gefäße zu dilatatieren sank stark unter Blockade der NO-Synthese, durch den irreversiblen Hemmstoff L-Nitro-Arginin. Die gilt für basale Bedingungen sowie nach vorheriger Vasokonstriktion durch Phenylephrin.
Beim Vergleich der Menge des NO-Abbauproduktes Nitrit im Effluat zeigte sich, dass sich unter Bradykinin eine erhöhte Konzentration fand. Ganz im Gegensatz dazu zeigte sich bei $PTHrP_{1-34}$ keine signifikante Erhöhung der Freisetzung.
Diese Umstände lassen den Schluss zu, dass es sich bei dem vasodilativen Effekt von $PTHrP_{1-34}$ um einen NO-unabhängigen Mechanismus handelt. Es finden sich somit weder biochemisch noch funktionell Hinweise auf eine Induktion der NO-Synthase durch PTHrP.

4.3 *Effekte von PTHrP auf den Koronarfluss nach Ischämie*

PTHrP ist ein Hormon das flussabhängig im koronaren Gefäßbett freigesetzt wird. Die Hauptquelle der Produktion ist das endotheliale Kompartiment. Die Freisetzung wird dabei vom Druck auf die Gefäßwand moduliert und nicht von der Wandschubspannung (Degenhardt et al 2002).
Energieverarmende Bedingungen (Schlüter et al 2000) stellen einen zweiten Stimulus für die Freisetzung von PTHrP dar, wie man sie zum Beispiel im Rahmen einer Ischämie findet. Während der Reperfusionsphase kommt es in der Koronarstrombahn zu einem „vascular stunning“, dass auf einer verminderten NO-Freisetzung beruht. Dieser Umstand ist von speziellem Interesse, da PTHrP NO- unabhängig den Koronarfluss steigert dieses Phänomen antagonisieren könnte.
Die in dieser Arbeit gewonnen Daten zeigen, dass nach einer Ischämie die endothelabhängige NO-Freisetzung eingeschränkt ist. Durch Bradykinin, welches über diesen Mechanismus seine Wirkung entfaltet, konnte postischämisch der Koronarfluss

nicht mehr gesteigert werden. Exogen zugeführtes NO, appliziert durch den NO-Donor SpermineNONOate, vermochte auch postischämisch den Koronarfluss zu steigern, d.h. dass die Freisetzung von NO eingeschränkt ist, aber die Ansprechbarkeit auf NO weiterhin erhalten ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass $PTHrP_{1-34}$in der Lage ist, die Gefäße sowohl prä- als auch postischämisch zu dilatieren. Folgerichtig lässt sich auch sagen dass $PTHrP_{1-34}$ in der Lage ist den Koronarfluss auch dann zu steigern, wenn die NO-Synthase durch L-Nitro-Arginin gehemmt wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die endothelabhängige Freisetzung von PTHrP aus dem Koronarbett während einer Ischämie zur Aufrechterhaltung einer postischämischen Koronarperfusion während der Reperfusion beiträgt und den Verlust einer verminderten NO-Verfügbarkeit teilweise kompensieren kann. Wie bereits gezeigt, ist die Expression von PTHrP im Koronarbett in der Herzinsuffizienz vermindert (Wenzel et al 2001). Der Verlust der endogenen Expression von PTHrP kann zur verminderten Ischämietoleranz solcher Herzen beitragen. Offenbar ist die Expression, Freisetzung und Wirkung von PTHrP ein endogenes Protektionsprinzip, welches das gesunde Herz vor den Folgen einer zeitlich begrenzten Ischämie schützt.

4.4 *Stimulation des PTH-2-Rezeptors durch TIP 39*

Das Tuberoinfundibulare Peptid 39 (TIP 39) ist ein kürzlich identifiziertes Neuropeptid, welches in der Lage ist den PTH-2R zu aktivieren (Hoare Clark and Usdin 2000). Der PTH2R gehört zu der Rezeptorfamilie der Typ II Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die auf Peptidmodulatoren wie Glucagon, Sekretin und Vasoaktives Intestinales Peptid reagieren. Der Rezeptor wird außer im ZNS auch noch in der Peripherie in einigen Zellen verschiedener Gewebe, wie zum Beispiel Herz- und Gefäßmuskelzellen exprimiert (Usdin et al 1999). TIP39 scheint einer der endogenen Liganden für diesen Rezeptor zu sein. Es aktiviert sowohl den PTH-2R der Ratte, als auch den des Menschen wie Usdin et al. 1999 zeigten (Usdin et al 1999). TIP39 ist aber nicht in der Lage den PTH-1R zu aktivieren, wie die strukturverwandten Liganden PTH und PTHrP. PTHrP kann seinerseits den PTH-2R nicht aktivieren (Usdin et al 1999).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, hat TIP39 keine Wirkung auf den basalen Koronarfluss. Nach vorheriger Desensibilisierung der PTH-1R, durch ^{5}Ile-PTHrP, steigerte TIP39 den Koronarfluss. Dieser Effekt stellte sich als NO-abhängig heraus.

Des Weiteren wurde die Wirkung von ^{5}Ile-PTHrP, einem Antagonisten für kardiale Wirkung des PTH1R (Gardella et al 1995), auf den basalen Koronarfluss untersucht. Es zeigte sich, dass nach einem initialen Abfall es zu einem signifikanten Anstieg des Koronarflusses kam. Die basale Wirkung des endogenen PTHrP wurde durch die Desensibilisierung des PTH-1R blockiert.

Im Vergleich der beiden Substanzen sah man, dass PTHrP den Koronarfluss gleich erhöht und danach ein Plateau erreicht (Vgl. Abb. 3.21). ^{5}Ile-PTHrP zeigt im Gegensatz dazu einen verzögerten Anstieg des Koronarflusses. Unter Blockade der NO-Synthese durch L-NA bei gleichem Protokoll stellte sich eine NO-Abhängigkeit für den Effekt von ^{5}Ile-PTHrP, heraus indem es den Koronarfluss sogar senkt. PTHrP entfaltet auch unter NO-Blockade weiterhin seine vasodilatative Wirkung.

Ein Erklärungsmodell für diese Wirkweise bietet Abb. 4.1. PTHrP ist ein klassischer endogener Ligand für den PTH-1R dessen Signaltransduktion cAMP-abhängig ist. TIP39, wie bereits erwähnt, aktiviert den PTH-2R dessen Signaltransduktion über NO vermittelt zu sein scheint. Dies wird von der Wirkweise des TIP39 gestützt. ^{5}Ile-PTHrP stimuliert beide Rezeptoren, wobei ^{5}Ile-PTHrP den PTH-1R desensibilisiert und den PTH-2R aktiviert.

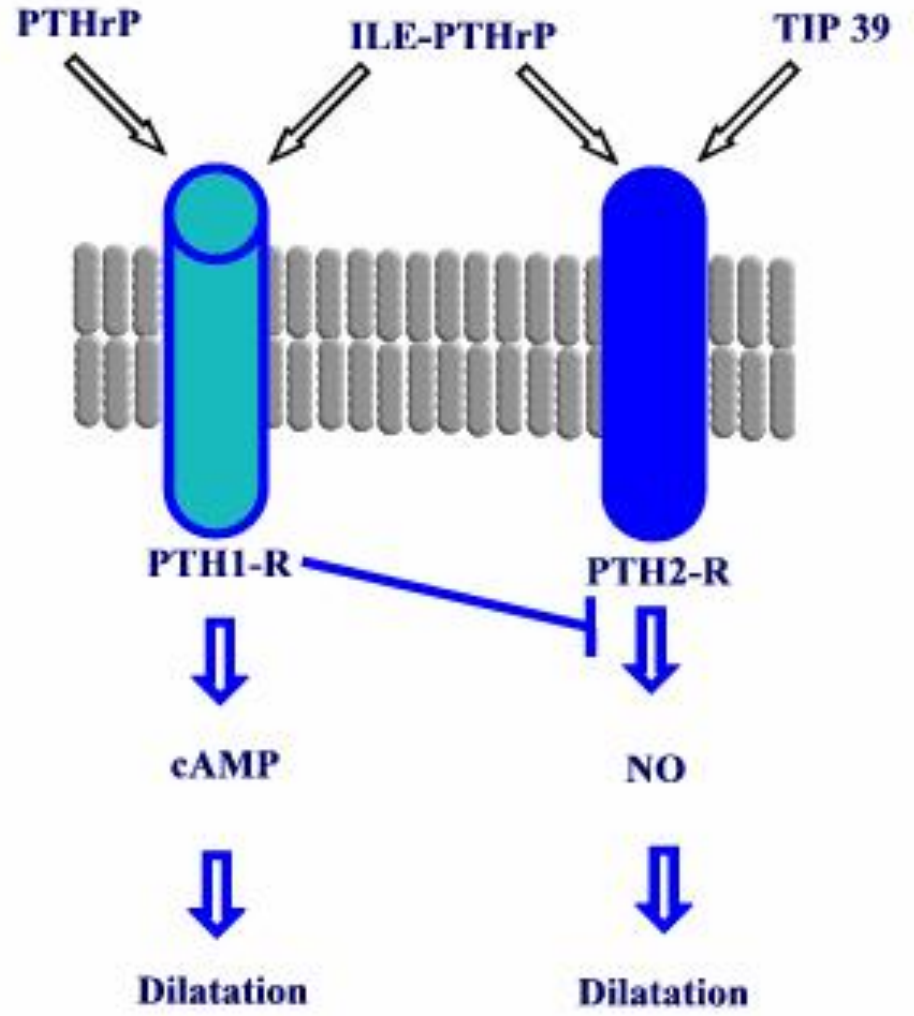

PTHrP
ILE-PTHrP
TIP 39
PTH1-R
PTH2-R
cAMP
NO
Dilatation
Dilatation

Abb. 4.1

4.5 Schlussfolgerung

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, das endogenes PTHrP eine wichtige Rolle in der Regulation der koronaren Perfusion zukommt. Dies gilt nicht nur unter physiologischen Bedingungen sondern zeigt sich insbesondere nach einer Ischämie.
Im postischämischen Myokard ist die Perfusion im Sinne eines „vascular stunnings“ reduziert. Grund dafür ist ein Imbalance zwischen vasokonstriktorischen Autakoide, die unter diesen Bedingungen ausgeschüttet werden, und vasodilatativen Faktoren. NO wird aufgrund einer endothelialen Dysfunktion vermindert freigesetzt. PTHrP gleicht dieses “mismatch“ aus und sorgt in der postischämischen Phase für den Ersatz der sonst durch NO vermittelten Vasodilatation.
Damit ist PTHrP als ein wichtiger Mediator mit vasodilatativer Wirkung sowohl im prä- als auch im postischämischen Myokard anzusehen, der seinen Effekt über den PTH-1R, mit cAMP als second messenger, vermittelt.
Diese vorliegende Arbeit zeigt erstmals auch Hinweise für einen eigenständigen Beitrag des PTH-2R für die Regulation der Koronarperfusion. Im Gegensatz zur dilatativen Wirkung des PTH-1R ist die Wirkung des PTH-2R aber NO-abhängig. Durch die Versuche zur Desensibilisierung des PTH-1R mittels ^{5}Ile-PTHrP konnte außerdem eine Interaktion zwischen diesen Rezeptoren aufgezeigt werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mechanistische Untersuchungen zur flusssteigernden Wirkung von PTHrP am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzens durchgeführt.
Bei PTHrP handelt es sich um ein nahezu ubiquitär im Körper gebildetes Peptidhormon, welches neben anderen gefäßwirksamen Mediatoren u.a. in mikrovaskulären und endokardialen Endothelzellen exprimiert wird und zusätzlich zu einer vasodilatierenden auch eine positiv inotrope Wirkung besitzt.
Es konnte gezeigt werden, dass PTHrP in der Lage ist im postischämischen Myokard die bestehende Minderdurchblutung zu kompensieren. Diese Perfusionsminderung im Sinne eines „vacular stunnings“ entsteht durch eine vermehrte Ausschüttung von vasonstriktorischen Mediatoren unter diesen Bedingungen und fehlender Antagonisierung durch das endothelial gebildete NO. Durch eine endotheliale Dysfunktion wird NO vermindert freigesetzt. PTHrP ist somit neben NO und EDHF als ein wichtiger endothelial freigesetzter Mediator mit vasodilatativer Wirkung anzusehen.

Diese vorliegende Arbeit zeigt erstmals auch Hinweise für einen eigenständigen Beitrag des PTH-2R für die Regulation der Koronarperfusion. Im Gegensatz zur dilatativen Wirkung des PTH-1R ist die Wirkung des PTH-2R aber NO-abhängig. Durch die Versuche zur Desensibilisierung des PTH-1R mittels ^{5}Ile-PTHrP konnte außerdem eine Interaktion zwischen diesen Rezeptoren aufgezeigt werden.

6.Summary

In the present study the cardiac release and the physiological relevance of Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) for the coronary blood flow and the function of the heart was explored. Experiments were preformed in saline perfused rat hearts.

PTHrP is expressed in various mammilan tissues including microvascular and endocardial cells. Beside its vasodilatatory effects PTHrP exerts positive inotropic ffects on cardiac myocytes.

The present study shows that PTHrP is able to compensate the reduced blood flow in the postischemic myocard. This vascular stunning is caused by an increased release of vasoconstrictive factors during ischemia and missing compensation by endothelial produced NO. A postischemic endothelial dysfunction causes this deceased NO-release. Therefore PTHrP is among NO and EDHF an important endothelial released mediator with a vasodilatory effect.

The present study shows that the PTH-2 receptor is participating in the regulation of the coronary heart perfusion. In the contrast to the NO-depentent PTH-1 receptor the effect of the PTH-2 receptor ist not depending on NO. Experiments to desensitize the PTH-1 receptor with ^{5}Ile-PTHrP showed also an interaction between these two receptors.

7.Literaturverzeichnis

Barri M.E., Abbas S.K., and Care A.D. 1992
The effects in the rat of two fragments of parathyroid hormone-related protein on uterine contractions in situ
Exp Physiol, 77:481-490

Bauersachs J., Popp R., Hecker M., Sauer E., Fleming I., and Busse R. 1996
Nitrc oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor
Circulation, 94:3341-3347

Burtis W.J., Fodero J.P., Gaich G., Debeyssey M., and Stewart A.F. 1992
Preliminary characterization of circulating amino- and carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy
J Clin Endocrinol Metab, 75:1110-1114

Burtis WJ; Wu T; Bunch C; Wysolmerski JJ; Insogna KL; Weir EC; Broadus AE and Stewart AF1987
Identifikation of a novel 17,000-dalton parathyroid horoe-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumo associated with humoral hyper-Calcemia of malignany
Journal of Biological Chemistry, 262 (15):7151-7156

Burton D.W., Brandt D.W., and Deftos 1994
Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system
Endocrinology, 135(1)253-261

Campos R.V.,Asa S.L.,and Drucker D.J. 1991
Immuncytochemical localisation of parathyreoid hormone-like peptide in the rat fetus
Cancer Res, 51:6351-6357

Care A.D., Abbas S.K. Pickard D.W., Barri M.E., Drinkhill M., FindlayJ.B., White I.R., Caple I.W. 1990
Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein
Exp Physiol, 75:605-608

Crass M.F. Ill, Moore P.L., Strickland M.L., Pang P.K.T., and Citak M.S. 1985
Cardiovascular responses to parathyroid hormone
Am J Physiol Endocrinol Metab, 249:187-194

Crass M.F. Ill, and Pang P.K.T .1980
Parathyroid hormone: a coronary artery vasodilator
Science, 207:1087-1089

Daifotis A.G., Weir E.C., Dreyer B.E., and Broadus A.E. 1992
Stretch-induced parathyroid hormone-related peptide gene expression in the rat uterus.
J Biol Chem, 267:23455-23458

Davicco M.J., Rouffet J., Durand D., Lefaivre J., and Barlet J.P. 1993
Parathyroid hormone-related peptide may increase mammary blood flow
J Bone Miner Res, 8:1519-1524

Deftos W., Burton D.W., and Brandt D.W. 1993
Parathyroid hormone-like protein (PLP) is a secretory product of artrial myocytes
J Clin Invest, 92:727-735

Degenhardt H; Jansen J; Schulz R; Sedding D and Schlüter KD. 2002
Mechanosensitives release of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells
Am J Physiol, 283:1489-1496

DeMiguel F., Fiaschi-Taesch N., Lopez-Talavera J.C., Takane K.K., Massfelder T., Helwig J.J., Stewart 2001
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, 142:4096-4105

DiPette D.J., Christenson W., Nickols M.A., and Nickols G.A. 1992
Cardiovascular responsiveness to parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in genetic hypertension
Endocrinology, 130:2045-2051

Fenton A.J., Kemp B.E., Hammonds R.G., Mitchelhill K.,Moseley J.M., Martin T.J. and Nicholson G.C. 1991
A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption with a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein;
PTHrP (107-111)
Endocrinology, 129:3424-3426

Fiaschi-Taesch N., Endlich N., Massfelder T., Endlich K., Stewart A.F., Helwig J.J. 1998
Renovascular parathyroid hormone-related protein in spontaneously hypertensive rats: dilator or trophic factor?
Kindey Int, 67:207-210

Gardella TJ; Luck MD; Wilson AK; Keutmann HT; Nussbaum SR; Potts JT and Kronenberg HM. 1995
Parathyroid hormone (PTH)-PTH-related peptide hybrid peptides reveal functional interactions between the 1-14 and 15-34 domains of the ligand
J Biol Chem, 12: 6584-6588

Henderson J.E., Amizuka N., Warshawsky H., Biasotto D., Lanske B.M. Goltzman D., Karpalis A.C. 1995
Nuclear localisation of parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation; PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor

Hoare, Clark and Usdin, 2000
Molecular determinants of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) selectivity for the parathyroid hormone-2 (PTH2) receptor. N-terminal truncation of TIP39 reverses PTH2 receptor/PTH1 receptor binding selectivity
J Biol Chem, 275: 27274-27283

Hongo T., Kupfer J., Enomoto H., Sharifi B., Gianella-Neto D., Forrester J.S., Singer F.R., Goltzman D., Hendy G.N., Pirola C. 1991
Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation
J Clin Invest, 88:1841-1847

Horiuchi N; Caulfield MP; Fisher JE; Goldman ME; McKee RL; Reagan JE; Levy JJ; Nutt RF; Rodan SB and Schofield TL 1987
Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro
Science, 238:1566-158

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

Ishikawa M.., Ouchi Y., Akishita M.., Kozaki K.,Toba K., Namiki Y., Yamaguchi T., Orimo H. 1994
Immunocytochemical detection of parathyroid hormone-related protein in vascular endothelial cells
Biochem Biophys Res Commun, 199:547-551

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

Kovacs C.S., and Kronenberg H.M. 1997
Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium and lactation
Endo Rev, 18:832-872

Karaplis A.C., Luz A., Glowacki J., Bronson R.T., Tybulewicz V.L., Kronenberg H.M.,Mulligan R.C. 1994
Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene
Genes & Dev, 8:277-289

Karaplis A.C. and Kronenberg H.M. 1996
Physiological roles for parathyroid hormone-related protein: lessons from gene knockout mice
Vitam Horm, 52:177-193

Kojda G., Kottenberg K., Stasch J.-P., Schroer K., and Noack E. 1997
Positive inotropic effect of exogenous and endogenous NO in hypertrophic rat hearts
Br J Pharmacol, 122:813-820

Lanske B., Amling M., Neff L., Guiducci J., Baron R., and Kronenberg H.M. 1999
Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in the bone development
J Clin Invest, 104(4):399-407

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

Maclsaac R.J., Heath J.A., Rodda C.P., Moseley J.M., Care A.D., Martin T.J., Caple I.W. 1991
Role of fetal parathyroid glands and parathyroid hormone-related protein in the regulation of placental transport of cacium, magnesium and inorganic pophate
Reprod Fertil Dev, 3:447-457

Maeda S,Sutliff RL,Qian J,Lorenz JN,Wang J,Tang H,Nakayama T,Weber C,Witte D,Strauch AR,Paul RJ,Fagin JA,Clemens TL
1999
Targeted overexpression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) to vascular smooth muscle in transgenic mice lowers blood pressure and alters vascular contractility
Endocrinology, 140:1815-1825

Massfelder T., Dann P., Wu T.L., Vasavada R., Helwig J.J., and Stewart A.F. 1997
Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting
Proc Nat Acad Sci, 94:13630-13635

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

Mok L.L., Ajiwe E., Martin T.J., Thompson J.C., and Cooper C.W. 1989
parathyroid hormone-related protein relaxes rat stric smooth muscle cells and shows cross-desensitization with parathyroid hormone
J Bone Miner Res, 4:433-439

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

Mombouli J.V. and Vanhoutte P.M. 1999
Endothelial dysfunction: from physiology to therapy
J Mol Cell Cardiol, 31:61-74

Nakayama T., Ohtsuru A., Enomoto H., Namba H., Ozeki S., Shibata Y., Yokota T., Nobuyoshi M., Ito M., SekineI. 1994
Coronary atherosclerotic smooth muscle cells overexpress human parathyroid hormone-related peptides
Biochem Biophys Res Commun, 200:1028-105

Nickols G.A., Nana A.D., Nickols M.A., DiPette D.J., and Asimakis G.K. 1989
Hypotnsion and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hyperclcemia of malignancy factor
Endocrinology, 125:834-841

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

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

Okano K., Pirola C.J., Wang W.M., Forrester J.S., Fagin J.A., and Clemens T.L.1995
Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells
Endocrinology, 136:1782-1789

Orloff J.J., Soifer N.E., Fodero J.P., Dann P., and Burtis W.J. 1993
Accumulation of carbox-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure
Kidney International, 43:1371-1376

Orloff JJ; Kats Y; Urena P; Schipani E; Vasavada RC; Philbrick WM; Behal A; Abou-Samra AB; Segre GV and Jüppner H 1995
Further evidence for a novel receptor for amino-terminal parathyroid hormone-related protein on keratinocytes and squamous carcinoma cell lines
Endocrinology, 136:3016-3023

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

Philbrick W.M., Wysolmerski J.J., Galbraith S., Holt E., Orloff J.J., Yang K.H., Vasavada R.C., Weir E.C.,Broadus A.E.,Stewart A.F.; 1996
Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology
Physiol Rev, 76:127-137

Pirola C.J., Wang H.M., Kamyar A., Wu S., Enomoto H., Sharifi B., Forrester J.S., Clemens T.L., Fagin J.A. 1993
Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms
J Biol Chem, 268:1987-1994

Pirola C.J., Wang H.M., Strgacich M.I., Kamyar A., Cercek B., Forrester J.S., Clemens T.L., Fagin J.A. 1994
Mechanical stimuli induce vascular parathyroid hormone-related protein Gene expression in vivo and in vitro
Endocrinology, 134:2230-2236

Quian J., Lorenz J.N., Maeda S., Sutcliff R.L., Weber Q., Nakayama T., Colbert M.C., Paul RJ., Fagin J.A., Clemens T.L. 1999
Reduced blood pressure and increased sensitivity f the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle
Endocrinology, 140:1826-1833

Roca-Cusachs A., DiPette D.J., and Nickols G.A.1991
Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure
J Pharmacol Exp Ther, 256:110-118

Rian E., Jemtland R., Olstad O.K., Endresen MJ., Grasser W., Thiede M.A., Henriksen T., Bucht E., Gauvik K.M. 1994
Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: A possible role in angiogenesis
Biochem Biophys Res Commun, 198:740-747

Rosales O.R., Isales C.M., Barrett P.Q., Brophy C., and Sumpio B.E. 1997
Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces elevations of cytosolic Calcium concentration through mobilizing of intacellular and extracellular pools
Biochem J, 326:385-392

Saussine C., Massfelder T., Parnin F., Judes C., Sime U., and Helwig J.J. 1993
Renin stimulating prosperties of parathyroid hormone-related peptide in the isolated perfused rat kidney
Kidney Int, 44:764-773

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

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

Schorr K., Taimor G., Degenhardt H.., Weber K., and Schlüter K.-D. 2003
Parathyroid hormone-related peptide is induced by stimulation of α-$_{1a}$-adrenoreceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothelial cells
Mol Pharmacol, 63:111-118

Soifer NE; Dee KE; Insogna KL; Burtis WJ; Matovcik LM; Wu TL; Milstone LM; Broadus AE; Philbrick WM and Stewart AF1992
Parathyroid hormone related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types
J Biol Chem, 367:18236-18243

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

Strewler G.J., and Nissenson R.A. 1987
Nonparathyroid hypercalcemia
Adv Intern Med, 32:235-258

Taimor G,Schlueter KD,Frischkopf K,Flesch M,Rosenkranz S,Piper HM. 1999
Autocrine regulation of TGF beta expression in adult cardiomyocytes
J Mol Cell Cardiol, 31:2127-2136

Thiede MA; Daifotis AG; Weir EC; Brines ML; Burtis WJ; Ikeda K; Dreyer BE; Garfield RE and Broadus AE 1990
Intrauterine occupancy controls expression of the parathyroid hormone-related peptide gene in preterm rat myometrium
Proc Nat Acad Sc USA, 87:6969-6973

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

Usdin, T.B., Hilton J., Vertesi,T., Harta, G, Segre, S., and Mezey, E. (1999)
Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells
Endocrinology, 10: 3363-3371

Usdin, T.B, Hoare, S.R.J, Wang, T. Mezey, E. und Kowalak,
TIP 39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus
Nature Neuroscience, 2: 941-943

Wenzel S; Schorr K; Degenhardt H; Frischkopf K; Kojda G; Wiesner RJ; Rosenkranz S; Piper HM and Schlüter KD 2001
TGF-beta(1) downregulates PTHrP in coronary endothelial cells
J Mol Cell Cardiol, 33:1181-1190

Winquist R.J., Baskin E.P., and Vlasuk G.P. 1987
Synthetic tumor-derived human hypercalcemic factor exhibits parathyroid hormone-like vasorelaxation in renal arteries
Biochem Biophys Res Commun, 149:227-232

Wolzt M., Schmetterer L., Dorner G., Zelger G., Entlicher J., Kapiotis S., Eichler H.G. 1997
hemodynamic effects of parathyroid hormone-related peptide-(1-34) in humans
J Clin Endocrinol Metab, 82:2548-2551

Wu S; Pirola CJ; Green J; Yamaguchi DT; Okano K; Jüppner H; Forrester JS; Fagin JA and Clemens TL.1993
Effects of N-terminal, midregion and C-terminal parathyroid hormone-related peptides adenosine 3′,5′-mono-phophte and ctoplasmic free calcium in rat aortic smooth muscle cells and UMR-106 oesteoblast-like cells
Endocrinology, 133:2437-2444

Wysolmerski J.J., McCaughem-Carucci J.F., Daifotis A.G., Broadus A.E. Philbrick W.M. 1996
Overexpression of parathyroid hormone-related protein or parathyroid hormone in transgenic mice impairs branching morphogenesis during Mammary gland development
Development, 121:3539-3547

Wysolmerski J.J., Broadus A.E., Zhou J., Fuchs E., Milstone L.M., Philbrick W.M.1994
Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the skin of transgenic mice interferes with hair follicle development
Proc Nat Acac Sci USA, 91:1133-1137

Yamamoto S., Morimoto 1., Yanagihara N., Zeki K., Fujihira T., Izumi F., Yamashita H., Eto S. 1997
Parathyroid hormone-related peptide-(1-34) induces vasopressin release from the rat supraoptic nucleus in vitro through a novel receptor distinct from a type I or type II PTH/PTHrP receptor
Endocrinology, 138:2066-2072

Yates AJ; Gutierrez GE; Smolens P; Travis PS; Katz MS; Aufdemorte TB; Boyce BF; Hymer TK; Poser JW and Mundy GR. 1988
Effects of a synthetic peptide of a parathyroid hormone-related protein
On calcium homeostasis, renal tubular calcium reabsorption and
Bone metabolism
J Clin Invest, 81:932-938

8.Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter nicht nur für die Themenstellung dieser Arbeit, sondern vor allem für die außerordentlich gute Betreuung auch in stressigen Zeiten,

allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung, nicht nur in technisch-methodischen Belangen,

sowie den anderen Doktoranden des Physiologischen Institutes für die gute Einarbeitung und das rege Interesse an außeruniversitären Themen,

meinen Eltern, für alles was Sie für mich getan haben,

sowie meinen Schwiegereltern und meiner Oma für die langjährige und liebevolle Unterstützung,

und vor allem Nici, ohne die ich gar nicht erst Medizin studiert hätte und die maßgeblich zum Voranschreiten dieser Arbeit durch moralische Unterstützung beteiligt war.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Marcus Peter Heinemann
Adresse:	Richinesstrasse 22a
	67071 Ludwigshafen
	Tel.: 06237-977480
Geburtsdatum, -ort:	25.05.1978, Frankenthal
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1997	Abitur an der Integrierten Gesamtschule Ernst-Bloch, Ludwigshafen-Oggersheim

Studium

1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
2003	Abschluss Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Justus-Liebig-Universität Gießen
2004	Praktisches Jahr am St.Vincenz-Krankenhaus in Limburg a.d. Lahn: Wahlfach Anästhesie
2004	Abschluss Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Seit Dezember 2004	Assistenzarzt in der Facharztweiterbildung für Urologie in der Urologischen Klink des Stadtkrankenhauses Worms