Kardiale Wirkungen von authentischem PTHrP und dessen N-terminalen Peptidfragmenten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Christian Katzer
aus Fulda

Giessen 2003

Aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gf. Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper

Gutachter: PD Prof. Dr. Schlüter
Gutachter: PD Dr. Hölschermann
Vorsitzender: Prof. Dr. Mersch-Sundermann

Tag der Disputation: 12. Dezember 2003

Meinem Vater und meiner Schwester in tiefer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Kapitel: Einleitung 7

1.1 PTH 7
1.2 Übertragungswege des PTH 8
1.3 PTHrP 9
1.4 Struktur und Übertragungswege des PTHrP 9
1.5 Posttranslationale Modifikationen von PTHrP 10
1.6 Die Expression von PTHrP durch Zellen des kardiovaskulären Systems 11
1.7 Kardiovaskuläre Effekte von PTHrP 11
1.7.1 Vaskuläre Effekte von PTHrP 12
1.7.2 Kardiale Effekte von PTHrP 13
1.8 Aufgabenstellung 15

2. Kapitel: Material 18

2.1 Chemikalien 18
2.2 Medien 21
2.3 Puffer 22
2.4 Geräte und Laborbedarf 25
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur 25
2.4.2 SDS-Gelelektrophorese 25
2.4.3 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion 25
2.4.4 Sonstige Geräte 26
2.4.5 Verbrauchsmaterialien 26
2.4.6 Software 26

3. Kapitel: Methoden **27**

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen 27
3.1.1 Versuchstiere 27
3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten 27
3.2 Zellkultur 28
3.2.1 Vor- und Ausplattierung 28
3.2.2 Kurzzeitkulturen der isolierten Kardiomyozyten 29
3.3 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im Elektrischen Feld 29
3.3.1 Probenvorbereitung 29
3.3.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion 30
3.3.3 Messung der Kontraktionsparameter 31
3.3.4 Meßprotokoll 33
3.3.5 Auswaschversuche 34
3.3.6 Auswertung der Kontraktions-Parameter 35
3.4 Protein-Gelelektrophoretische Methoden 35
3.4.1 Herkunft des authentischen PTHrP 35
3.4.2 Probenvorbereitung 36
3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 36
3.4.4 Western-Blot-Verfahren 38
3.4.5 Proteinfärbung mit Amidoschwarz 39
3.4.6. Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot 39

4. Kapitel: Ergebnisse **42**

4.1 Kontraktile Wirkung von authentischem endothelialen PTHrP und synthetischem PTHrP(1-34) 42
4.1.1 Herstellung und Charakterisierung von authentischem endothelialen PTHrP 42

4.1.2 Die kontraktile Wirkung von authentischem PTHrP und synthetischem PTHrP(1-34) 44
4.1.3 Der lusitropische Effekt von authentischem PTHrP und PTHrP(1-34) 46
4.2 Kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) 47
4.3 Inhibitorische Wirkung von PTH(1-34) auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) 50
4.3.1 Inhibitorische Wirkung von PTH(1-34) auf die kontraktile Wirkung von PTHrP und PTHrP(1-34) 50
4.3.2 Inhibitorische Wirkung von PTH(1-34) auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) 52
4.4 Wirkung von Rp-cycloAMPS auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) 53
4.5 Inhibitorische Wirkung von BQ123 auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b 55
4.6 Inhibitorische Wirkung von β_1 -Antagonisten auf die kontraktile Wirkung von PTHrP, PTHrP(1-16) und Isoprenalin 57
4.6.1 Inhibitorische Wirkung von Atenolol auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Isoprenalin 57
4.6.2 Inhibitorische Wirkung von Propranolol auf die kontraktile Wirkung von PTHrP und Isoprenalin 59
4.7 Inhibitorische Wirkung von α-Antagonisten auf die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Phenylephrin 60
4.8 Kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Isoprenalin während der Exposition und nach dem Auswaschen 62
4.9 Kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b 63

5. Kapitel: Diskussion **67**

5.1 Die Wirkung von PTHrP und PTHrP(1-34) auf Kardiomyozyten der Ratte 67

5.2 Die Wirkungen von PTHrP(1-16) und PTHrP(1-34) auf Kardiomyozyten der Ratte 69

5.3 Interpretation der Ergebnisse 71

6. Kapitel: Literatur **74**

7. Kapitel: Zusammenfassung **80**

8. Kapitel: Dank **81**

9. Kapitel: Lebenslauf **82**

1. Kapitel: Einleitung

1.1 PTH

Parathormon (PTH) ist ein Peptidhormon, das in den Glandulae parathyreoideae (Epithelkörperchen/Nebenschilddrüse) produziert wird. Die normale Serumkonzentration beträgt 10 – 40 pmol/l, bzw. 100 – 400 pg/ml.

Parathormon beeinflusst den Calciumhaushalt des Organismus, die beiden wichtigsten Zielorgane des PTH sind Knochen und Nieren (Zielzellen: Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Tubuluszellen).

In den meisten dahingehend untersuchten Säugetieren handelt es sich bei PTH um eine 84 Aminosäuren lange Peptidkette, die sich bei den einzelnen Arten nur geringfügig unterscheidet, meist im NH_2-terminalen Teil des Peptids [24]. Die ersten 34 Aminosäuren scheinen an klassischen Zielzellen für die volle biologische Wirkung des PTH verantwortlich zu sein [28]. Dieser Teil des PTH-Moleküls besteht aus zwei α-Helices. Den funktionellen Teil des PTH-Moleküls scheinen die ersten beiden Aminosäuren zu bilden, da Peptidfragmente ohne die ersten beiden Aminosäuren kaum noch in der Lage sind, an der Zielzelle eine Reaktion hervorzurufen. Fehlen die ersten 6 Aminosäuren, wirkt das Peptidfragment als PTH-Antagonist ohne intrinsische Aktivität [14,28].

Es wurden auch PTH-Wirkungen auf nicht-klassische PTH-Zielzellen beschrieben, zum Beispiel auf Blutzellen, Leberzellen, glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen und auf Zellen des Erregungsleitungssystems des Herzens.

Seit Jahren sind kardiovaskuläre Effekte des PTH beschrieben worden [3,29,33,41], was auf die Existenz von PTH/PTHrP-Rezeptoren auf Zellen des kardiovaskulären Systems hinweist. Es ist bekannt, dass hohe Serumkonzentrationen von PTH zu kardiovaskulären Dysfunktionen führen. Die physiologische Rolle des PTH im kardiovaskulären System ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Bekannt ist, dass PTH vermutlich über eine Aktivierung der Proteinkinase C zur Entstehung von Herzhypertrophie beiträgt [29] und dass PTH einen vasodilatorischen Effekt ausübt [20].

1.2 Übertragungswege des PTH

Von den klassischen PTH-Zielzellen wurde ein PTH-Rezeptor geklont [12]. Da dieser Rezeptor sowohl das NH_2-terminale Ende von PTH als auch das NH_2-terminale Ende des strukturell verwandten PTHrP binden kann, wird er PTH/PTHrP-Rezeptor genannt. Es handelt sich um einen klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, der an mehrere intrazelluläre Signalübertragungswege gekoppelt ist.

Bindet PTH an den PTH/PTHrP-Rezeptor, kann PTH entweder die Adenylatzyklase oder die Phospholipase C aktivieren [28].

Wird die Adenylatzyklase aktiviert, steigt in der Zielzelle des PTH die Konzentration des Adenosin-3',5'-cyclo-Monophosphat (cAMP). Ein Anstieg des intrazellulären cAMP führt dann zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA).

Wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, setzt sie aus der Plasmamembran Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin frei. Dadurch wird die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) in der Zellmembran gesteigert.

Für die Aktivierung der Phospholipase C wiederum gibt es zwei verschiedene funktionelle Domänen im PTH-Molekül. Die eine Domäne ist entweder identisch mit der Domäne zur Aktivierung der Adenylatzyklase oder sie liegt zumindest in ihrer Nähe [28]. Die andere Domäne liegt zwischen den Aminosäuren 28 und 34 [35].

An klassischen Zielzellen (Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und verschiedenen Nierenzellen) wirkt PTH normalerweise über eine Aktivierung sowohl der Adenylatzyklase (NH_2-terminale Bindungsdomäne) als auch der Phospholipase C (Bindungsdomäne zwischen Aminosäure 28 und 34) [28].

Auf nicht klassische Zielzellen, zum Beispiel auf glatte Muskelzellen und auf Kardiomyozyten, wirkt PTH gewöhnlich nur über einen der genannten Übertragungswege, üblicherweise über eine Aktivierung der Phospholipase C (Bindungsdomäne zwischen Aminosäure 28 und 34) [28].

1.3 PTHrP

Die PTH-Wirkungen auf nicht-klassische Zielzellen ähnelt den Wirkungen von dem PTH strukturähnlichen Peptiden, die PTH related peptide (PTHrP) genannt werden. Dieses sogenannte PTHrP unterscheidet sich von PTH in drei wichtigen Aspekten:

- Erstens wird es von vielen normalen und malignen Geweben produziert und sekretiert, unter anderem auch im Herz [1].
- Zweitens ist es im Vergleich zum PTH am COOH-terminalen Ende verlängert.
- Drittens wirkt es in vielen Geweben als parakriner oder autokriner Faktor, jedoch nicht im Sinne eines klassischen Hormons.

1.4 Struktur und Übertragungswege des PTHrP

Die Struktur von PTH und PTHrP ähnelt sich im NH_2-terminalen Teil des Moleküls. Sechs der sieben ersten Aminosäuren sind in beiden Peptidketten identisch [7,28]. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass auch PTHrP nahezu alle Wirkungen auf Zellen zeigt, die PTH über die NH_2-terminale Domäne vermittelt [7,28]. Die Rezeptorbindungsdomänen zwischen den Aminosäuren 18 und 34 zeigen zwar bei PTH und PTHrP in der Aminosäurensequenz keine großen Ähnlichkeiten, die Sekundärstruktur ist jedoch vergleichbar [28]. Dies scheint der Grund dafür zu sein, dass beide Peptide an den gleichen Rezeptor, den PTH/PTHrP-Rezeptor, binden.
Das PTHrP-Molekül enthält Abschnitte, die gegenüber dem PTH keine Homologie aufweisen. Das PTHrP der Ratte besteht aus 141 Aminosäuren. Verglichen mit dem PTH ist es am COOH-terminalen Ende verlängert. Im menschlichen Gewebe werden drei Formen des PTHrP exprimiert: Das PTHrP(1-139), PTHrP(1-141) und das PTHrP(1-173). Alle diese Formen werden durch dasselbe Gen kodiert. Unterschiedlich ist jedoch, mit welchem Promotor die Transkription gestartet wird. Je nach Promotor entsteht eine andere mRNA. Auch das mRNA-Processing dieser drei verschiedenen Arten von mRNA unterscheidet sich [28,29].

Manche funktionelle Domänen sind in Teilen des PTHrP-Moleküls lokalisiert, die keine oder nur geringe Strukturähnlichkeit zum PTH aufweisen, was auf die Existenz PTHrP-spezifischer Rezeptoren hinweist. Trotzdem vermitteln auch diese Domänen wie PTH ihre Wirkung über die Adenylatzyklase und die Phospholipase C [28]. Eine dieser PTHrP-spezifischen funktionellen Domänen zur Aktivierung der Adenylatzyklase befindet sich in COOH-terminaler Richtung von der des durch das PTH bekannten NH_2-terminalen Domäne zur Aktivierung der Adenylatzyklase [28]. Eine zweite Domäne scheint zwischen den Aminosäuren 37 und 107 lokalisiert zu sein [28]. Eine dritte Domäne zur Aktivierung von Phospholipase C wurde zwischen den Aminosäuren 107 und 111 gefunden [6,30].

1.5 Posttranslationale Modifikationen von PTHrP

Das Molekulargewicht des PTHrP ist höher als das Molekulargewicht der singulären unmodifizierten Peptidkette mit 141, bzw. 139 oder 173 Aminosäuren. Es ist bekannt, dass PTHrP posttranslational glycosyliert wird [27,42]. Über die biologische Bedeutung dieses posttranslationalen Prozessings ist noch nichts bekannt.
Posttranslationale Modifikationen der drei verschiedenen humanen PTHrP-Peptide, PTHrP(1-139), PTHrP(1-141) und PTHrP(1-173), führen zur Synthese und Sekretion von NH_2-terminalen und COOH-terminalen PTHrP-Peptidfragmenten [29]. Anhand immunologischer Untersuchungen von Ratten-Herzgewebe mit Antikörpern, die entweder gegen PTHrP(1-34) oder gegen PTHrP(109-141) gerichtet waren, fand man heraus, dass die Antikörper gegen PTHrP(109-141) einen drei- bis fünffach höheren Gehalt an PTHrP anzeigten als die Antikörper gegen PTHrP(1-34) [2,25]. Dies ist ein Hinweis darauf, dass im kardiovaskulären System vor allem PTHrP-Peptide exprimiert werden, die den COOH-terminalen Teil des PTHrP-Moleküls repräsentieren. Dass gerade dieser Teil keine Homologie zum PTH-Molekül aufweist, legt die Vermutung von unterschiedlichen physiologischen Rollen von PTH und PTHrP im kardiovaskulären System nahe [29].

1.6 Die Expression von PTHrP durch Zellen des kardiovaskulären Systems

Die Synthese und Sekretion von PTHrP innerhalb des kardiovaskulären Systems wurde zuerst in glatten Muskelzellen innerhalb des Herzens entdeckt [1,2,8]. Im Herz wird PTHrP vor allem in den Vorhöfen exprimiert, zu einer geringeren Menge auch in den Ventrikeln [2,43]. Vasoaktive Peptide, wie Endothelin, Norepinephrin, Thrombin und Angiotensin II, und mechanische Dehnung steigern die Expression, also die Proteinsynthese, von PTHrP in glatten Muskelzellen [8,23,38]. Die Konzentrationen des PTHrP in den glatten Muskelzellen, die die Aorta und die Vena cava umgeben, und in den Herzmuskelzellen, die sich in den Herzvorhöfen befinden, sind vergleichbar [2]. Jedoch ist in den Herzmuskelzellen der Herzvorhöfe die Konzentration von mRNA nur ein Drittel mal so hoch wie in den glatten Muskelzellen von Aorta und Vena cava [2]. Das lässt darauf schließen, dass die Regulation der PTHrP-Expression in den Herzvorhöfen auf Transkriptionsebene, in Aorta und Vena cava auf Translationsebene erfolgt [29].
PTHrP wird in den Gefäßwänden nicht nur in glatten Muskelzellen exprimiert, sondern auch in Endothelzellen [9,25]. Im Unterschied zu den glatten Muskelzellen besitzen Endothelzellen jedoch keine eigenen PTH/PTHrP-Rezeptoren [25].

1.7 Kardiovaskuläre Effekte von PTHrP

PTHrP besitzt bei folgenden biologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems eine Bedeutung:

- PTHrP wird unter Energie-, bzw. Sauerstoffverarmung von koronaren Endothelzellen freigesetzt [27].
- PTHrP beeinflusst das haemodynamische Verhalten des Herzens [26,27,28,29].
- PTHrP besitzt einen vasodilatorischen Effekt [5,18,37,38].
- PTHrP wird von arteriosklerotischen Endothelzellen der Koronarien in übersteigerter Form exprimiert [17].
- PTHrP spielt eventuell eine Rolle in der Angiogenese [25].

1.7.1 Vaskuläre Effekte von PTHrP

Die Charakterisierung der kardiovaskulären Effekte von PTHrP hatte sich ursprünglich auf dessen hypotensiven Effekt konzentriert. Es wurde untersucht, ob auch PTHrP(1-34), der NH_2-terminale Teil des PTHrP-Moleküls mit einer hohen Homologie zu PTH, den vasodilatorischen Effekt von PTH und PTH(1-34) zeigt.

PTH und PTH(1-34) wirken auf vaskuläre glatte Muskelzellen vasodilatorisch, und zwar über die Aktivierung der Adenylatzyklase, was wiederum zu einer Inhibition der Calciumkanäle vom L-Typ führt [19,20,29,39,40]. Dieser Effekt wird über die ersten beiden Aminosäuren des PTH-, bzw. des PTH(1-34)-Peptids vermittelt [4,28,29]. Diese beiden Aminosäuren sind im PTH- und im PTHrP-Molekül identisch [7,28].

Die Experimente zeigten, dass PTHrP(1-34) einen entsprechenden vasodilatorischen Effekt aufweist, während PTHrP(3-34) und PTHrP(7-34) keine intrinsische Aktivität besitzen und sogar als Antagonisten der nicht am NH_2-terminalen Ende verkürzten PTHrP-Ketten wirken [4,29]. Die Wirkungsstärke des PTHrP(1-34) auf die Erniedrigung des Blutdruck war größer als die des PTH und des PTH(1-34) [5,18,37,38].

Dieses letztgenannte Ergebnis erwies sich als unabhängig von unterschiedlichen Versuchsaufbauten. Sowohl eine Vasodilatation, als auch ein Anstieg des Blutflusses, eine präglomuläre Vasodilatation und eine Relaxation der mit Norepinephrin kontrahierten Aorta, konnte mit PTHrP(1-34) ausgelöst werden [5,18,37,38].

Diese Ergebnisse konnten nicht allein mit einer strukturellen Ähnlichkeit von PTH und PTHrP erklärt werden. Es ist eher anzunehmen, dass auch andere Domänen außer den ersten beiden Aminosäuren des PTHrP zum kardiovaskulären Effekt des PTHrP beitragen. Dies deckt sich auch mit der bereits weiter oben unter 1.5 angesprochenen Vermutung, dass im kardiovaskulären System vor allem PTHrP-Peptide exprimiert werden, die den COOH-terminalen Teil des PTHrP-Moleküls repräsentieren [29].

1.7.2 Kardiale Effekte von PTHrP

Auch an Kardiomyozyten wurden die Effekte von PTH und PTHrP verglichen. PTH(1-34) steigert den Ca^{2+}-Einstrom in neonatale Kardiomyozyten, PTHrP(1-34) dagegen nicht [36]. In adulten Kardiomyozyten induziert PTH die zytosolische Kreatinkinase, PTHrP nicht (PTHrP antagonisiert die Induktion der zytosolischen Kreatinkinase durch PTH) [31,32,33].

Diese Aktivierung der zytosolischen Kreatinkinase durch PTH wird durch eine Domäne des Moleküls vermittelt, die die Aminosäuren 28 bis 34 umfasst [29,34]. In dieser Domäne unterscheiden sich PTH und PTHrP bis auf eine Aminosäure. Die Sekundärstruktur ist ähnlich, nur an Position 29 ist die hydrophile Aminosäure Glutamin des PTH gegen die hydrophobe Aminosäure Alanin des PTHrP getauscht. Diese Strukturähnlichkeit ist wohl der Grund, warum auch PTHrP in der Lage ist, die Proteinkinase C der Osteoblasten zu aktivieren [11]. Jedoch können N-terminale Fragmente des PTHrP an adulten Kardiomyozyten nicht den beschriebenen Effekt des PTH hervorrufen. PTHrP wirkt im Bezug auf den hypertropen Effekt, der von PTH über eine Aktivierung der zytosolischen Kreatinkinase hervorgerufen wird, als Antagonist [29,31,32,33].

Weiterhin wurde untersucht, wie PTHrP das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten beeinflusst und wie sich dieser Einfluss von dem des PTH unterscheidet. Auf isolierte perfundierte Rattenherzen hatte PTHrP(1-34) eine positive chronotrope und eine positive inotrope Wirkung [18], welche man für PTH nicht finden konnte. Auf der zellulären Ebene fand man eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch PTHrP(1-34), was zu den beschriebenen Effekten führte [27,29]. PTH(1-34) zeigte diese Wirkung nicht [30,33].

Auch ob andere Teilpeptide des PTHrP in der Lage sind, über eine Aktivierung von Phospholipase C und Proteinkinase C auf das Kontraktionsverhalten von adulten Kardiomyozyten Einfluss zu nehmen, wurde untersucht. Spezielles Augenmerk richtete man auf das PTHrP(107-111). Man fand, dass dieses Pentapeptid eine Domäne zur Aktivierung von Proteinkinase C besitzt, die sich völlig von den bekannten Aktivierungsdomänen des PTH unterscheidet. PTHrP(107-111) aktiviert die mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) in adulten Kardiomyozyten, steigert die Proteinsynthese und die Aktivität der Kreatinkinase BB [30]. Diese Daten legten die Vermutung nahe, dass PTHrP ganz eigene, mit denen des PTH nicht zu vergleichende Effekte auf Kardiomyozyten hat.

In der folgenden Tabelle soll noch einmal ein Überblick über die Wirkungen von PTHrP auf das kardiovaskuläre System gegeben werden [Quelle: 29]:

Biologische Wirkung	**Verantwortliche Domäne**	**Aktivität**	**Zielorgan**	**Literatur**
Steigerung der Kontraktilität	1-34	+	Isoliertes Rattenherz	[18]
	1-34	(+)	Adulte Kardiomyozyten	[30]
	7-34	(+)	Adulte Kardiomyozyten	[30]
Intrazellulärer cAMP-Anstieg	1-34	(+)	Adulte Kardiomyozyten	[30]
Aktivierung der Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ	1-34	–	Neonatale Kardiomyozyten	[36]
Steigerung der Proteinsynthese	107-111	+	Adulte Kardiomyozyten	[30]
Steigerung der Aktivität der Kreatinkinase	1-34	–	Adulte Kardiomyozyten	[31]
	7-34	–	Adulte Kardiomyozyten	[31]
	107-111	+	Adulte Kardiomyozyten	[30]
Vasodilatation	1-34	++	Gefäßwand der Aorta	[38]

Aktivität: ++ = sehr starker Effekt; + = starker Effekt; (+) = leichter Effekt;
– = kein Effekt

1.8 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte zum einen der Einfluss von PTHrP auf die Kontraktionskinetik adulter Kardiomyozyten untersucht werden. Zum anderen sollte die für die Effekte auf die Kontraktilität von adulten Kardiomyozyten verantwortliche Domäne genauer bestimmt werden.

Es ist bekannt, dass ein Verlust der ersten sechs Aminosäuren des PTHrP nicht dessen Fähigkeit zur Aktivierung der Adenylatzyklase von adulten Kardiomyozyten vermindert [30]. Das weist darauf hin, dass für die Aktivierung eine andere, bis jetzt noch nicht charakterisierte Domäne verantwortlich ist. Weiterhin ist bekannt, dass PTHrP(1-34) den Effekt von PTHrP auf Kardiomyozyten simulieren kann [26,27]. Dieses Peptid besitzt zwischen den Aminosäuren 18 und 32 eine Bindungsdomäne für den PTH/PTHrP-Rezeptor der klassischen PTH-Zielzellen [26,28].

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Vergleich der Wirkung auf Kardiomyozyten zwischen PTHrP und PTHrP(1-34) durchgeführt werden. Auch sollte überprüft werden, ob PTH in der Lage ist, sowohl den Effekt von authentischem, endothelialen PTHrP, als auch den Effekt von PTHrP(1-34) zu antagonisieren, um weitere Hinweise darauf zu sammeln, dass authentisches PTHrP und PTHrP(1-34) ihre Wirkung über den selben Rezeptor vermitteln. Damit wäre dann die aktive Bindungsdomäne des PTHrP für adulte Kardiomyozyten im Bereich der Aminosäuren 7 bis 34 zu vermuten. Wie unter 1.5 bereits erwähnt, wird PTHrP posttranslational glykosyliert. Es stellt sich die Frage, in wie weit diese Glykolysierung die Wirkung des PTHrP modifiziert. Auch deshalb sollte die kontraktile Wirkung von authentischem PTHrP und dem synthetischen, nicht modifizierten PTHrP(1-34) verglichen werden.

Um die aktive Domäne näher eingrenzen zu können, sollte auch mit C-terminal verkürzten Peptiden gearbeitet werden. Fokussiert wurde dabei auf PTHrP(1-16). PTHrP(1-16) ist aus negativen Kontrollexperimenten für die Wirkung von PTHrP auf klassische PTH-Zielzellen bekannt. PTHrP(1-16) ist nicht in der Lage, an den klassischen PTH/PTHrP-Rezeptor zu binden oder ihn zu aktivieren [13]. Man fand aber in einer früheren Arbeit heraus, dass PTHrP(1-16) an nicht-klassischen Zielzellen als Antagonist des PTHrP wirkt [16]. Das legt die Vermutung nahe, dass PTHrP(1-16) in der Lage ist, eine wie auch immer geartete Wirkung auf nicht-klassische Zielzellen zu vermitteln.

Es sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden, ob PTHrP(1-16) in der Lage ist, positive kontraktile Wirkungen an adulten Myokardzellen hervorzurufen. Dieser positive kontraktile Effekt wurde in der Tat gefunden und daraufhin mit dem positiven kontraktilen Effekt des PTHrP(1-34) verglichen. Ziel dieses Teils der Arbeit war herauszufinden, ob die Wirkung von PTHrP(1-16) über den gleichen Rezeptor wie die Wirkung von PTHrP(1-34) vermittelt wird und ob auch PTHrP(1-16) über cAMP als second-messenger wirkt. So sollte geklärt werden, ob die aktive Domäne des PTHrP eventuell zwischen den Aminosäuren 7 bis 16 liegt.
Als im Verlauf der Arbeit entdeckt wurde, dass sich der kontraktile Effekt von PTHrP(1-16) von dem des PTHrP(1-34) unterscheidet und der Effekt von PTHrP(1-16) offensichtlich über einen anderen Rezeptor vermittelt wird, wurde versucht herauszufinden, wie PTHrP(1-16) seine kontraktile Wirkung vermittelt. Aufgrund struktureller Homologien zwischen PTHrP(1-16) und Endothelin, welches ebenfalls auf Kardiomyozyten einen positiven kontraktilen Effekt ausübt [10,15], wurde die Hypothese aufgestellt, dass PTHrP(1-16) seine Wirkung über kardiale Endothelin-Rezeptoren entfaltet.

Vergleicht man PTHrP(1-16), Endothelin und Sarafotoxin 6b, einen bekannten ET_A-Rezeptoragonist, so findet man im Bereich der Aminosäuren 6 und 9 ein gemeinsames Muster: An Position 6 steht eine hydrophobe Aminosäure, an Position 7 eine variable, an Position 8 eine saure und an Position 9 eine basische. Im Bereich der Aminosäuren 8 bis 11 ist die Aminosäurensequenz von PTHrP(1-16), Endothelin und Sarafotoxin 6b identisch [26].

Es wurde also analysiert, ob PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b eine vergleichbare kontraktile Wirkung vermitteln und in wie weit sich ihre Wirkungsvermittlung ähnelt. Außerdem versuchte man auszuschließen, dass PTHrP(1-16) seine Wirkung über α- oder β_1-Adrenorezeptoren vermittelt.

2. Kapitel: Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid	Merck, Darmstadt
Adenosin-Di-Phosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-Desaminase	Sigma, Deisenhofen
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma, Deisenhofen
Amidoschwarz	Sigma, Deisenhofen
Monoklonaler Maus Anti-körper gegen Aminosäuren 38 to 64 des PTHrP)	Oncogene research Products, Cambridge, England
Antikörper (Anti Maus IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase)	Oncogene research Prokucts, Cambridge, England
Adenosin-Mono-Phosphat	Boehringer, Mannheim
Ammonium-Persulfat	Sigma, Deisenhofen
Adenosin-Tri-Phosphat	Boehringer, Mannheim
BCIP	Sigma, Deisenhofen
Bisacrylamid	Merk, Darmstadt
Bisindolylmaleimid	Sigma, Deisenhofen
BQ 123	Bachem, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Coomassie-Brillant-Blue G250	Sigma, Deisenhofen
Cytosin-β-Arabinofuranosid	Sigma, Deisenhofen
DDT	Sigma, Deisenhofen
DEAE-Zellulose	Boehringer, Mannheim

Desoxyglucose	Sigma, Deisenhofen
Diphenylamin	Merk, Darmstadt
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS	PAA; Laboratories, Cölbe
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glucose-6-Phosphat	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
H-BQ 123	Amersham, Braunschweig
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Boehringer, Mannheim
hPTHrP (1-16)	Bachem, Heidelberg
hPTHrP (1-34)	Bachem, Heidelberg
ICI 118.551	Zeneca, Heidelberg
Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumzyanat	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase Typ CLSII (332 U/mg)	Biochrom, Berlin
Karnitin	Sigma, Deisenhofen
Kreatin	Sigma, Deisenhofen
Kreatinphosphat	Boehringer, Mannheim
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earl´s Salts	GibcoBRL, Eggenstein
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (unter Lizenz von Riedel-de Haën GmbH)
Molekulargewichtstandards	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt

NAD^+	Boehringer, Mannheim
Protein A Sepharose	Sigma, Deishofen
NADH	Boehringer, Mannheim
Natrium-Ortho-Vanadat	Merck, Darmstadt
Nitro-Blue-Tetrazolium	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Sigma, Deishofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL,Eggenstein
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Phenylephrin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau-S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Prazosin	Sigma, Deisenhofen
Propranolol	Sigma, Deisenhofen
Protein A Sepharose	Sigma, Deishofen
Rapamycin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Rp-cyclicAMPS	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Sarafotoxin 6b	Bachem, Heidelberg
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Merck, Darmstadt
TEMED	Serva, Heidelberg
Trichloracetat	Merck, Darmstadt
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Medien

Calcium-Stammlösung:

$CaCl_2$	100 mMol/l

CCT-Kulturmedium:

M 199-HEPES gepuffert	x ml
Kreatin	5 mMol/l
Karnitin	2 mMol/l
Taurin	5 mMol/l
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	100 µMol/l

Gradienten-Lösung:

Powell-Medium	x ml
Albumin	4 % (w/v)
$CaCl_2$	1 mMol/l

M 199-HEPES gepuffert:

Medium 199 / Earl´s Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mMol/l
pH	7,4

Powell-Medium:

NaCl	110 mMol/l
$NaHCO_3$	25 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
KH_2PO_4	1,2 mMol/l
$MgSO_4$	1,2 mMol/l
Glucose	11 mMol/l

Vorinkubationsmedium:

M 199-HEPES gepuffert	x	ml
FCS	4	% (vol/vol)
Penicillin	100	IU/ml
Streptomycin	100	µg/ml

Cytosin-β-Arabinofuranosid wurde zur Hemmung der Proliferation verbliebener Nicht-Herzmuskelzellen zugesetzt. Alle Medien wurden sterilfiltriert, bei einer Temperatur von 4^{O}C aufbewahrt und vor dem Gebrauch auf 37^{O}C erwärmt.

2.3 Puffer

Anodenpuffer:

TRIS/HCl	30	mMol/l
Methanol	20	% (vol/vol)
pH-Wert	10,4	

Kathodenpuffer:

TRIS/HCl	25	mMol/l
6-Aminohexansäure	40	mMol/l
Methanol	20	% (vol/vol)
pH-Wert	9,4	

Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	40	ml
Kollagenase	25	mg
Calcium-Stammlösung	12,5	µl

Konzentrierter Anodenpuffer:

TRIS/HCl	300 mMol/l
Methanol	20 % (vol/vol)
pH-Wert	10,4

Laufpuffer:

Glycin	1,44 % (wt/vol)
TRIS	0,3 % (wt/vol)
SDS	0,1 % (wt/vol)

Lösungs-Puffer:

Tris/HCl	0,05 M
SDS	4 % (w/v)
DTE	0,045 M
PH	6,7

PBS-Puffer:

NaCl	150 mMol/l
KH_2PO_4	5 mMol/l
Na_2HPO_4	5 mMol/l
pH	7,4

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 ml

Substratpuffer:

TRIS/HCl	100 mMol/l
$MgCl_2$	5 mMol/l
NaCl	10 mMol/l
NBT	0,5 x 10^{-3} % (wt/vol)
BCIP	0,25 x 10^{-3} % (wt/vol)

TBS-Puffer:

TRIS-HCL	10 mMol/l
NaCl	150 mMol/l
pH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Stammlösung:

NaCl	125 mMol/l
KH_2PO_4	1,2 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
$MgSO_4$	1,2 mMol/l
$CaCl_2$	1,0 mMol/l
Glucose	10 mMol/l
HEPES	10 mMol/l
pH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung:

Zuckungspuffer-Stammlösung	100 ml
Adenosin-Desaminase	20 µl

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur:

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes in Düsseldorf
Gewebehacker	Bachofer, Reutlingen
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan

2.4.2 SDS-Gelelektrophorese:

Elekrophorese-Netzgerät	BIOTEC-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophoresekammer	BIOTEC-Fischer, Reiskirchen
Elektro-Blotkammer	BIOTEC-Fischer, Reiskirchen
Inkubator für Reaktionsgefäße	Techne, Wertheim-Bestenheid

2.4.3 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion:

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Physiologisches Labor des Physiologischen Instiututes der J.-L.-Universität Giessen

2.4.4 Sonstige Geräte:

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo,Seelbach
Anlage zur Demineralisierung von Wasser	Millipore, Bedford MA, USA

2.4.5 Verbrauchsmaterialien:

Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen (Typ Falcon 3004)	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten(Typ Falcon 3072)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
PVDF-Blot-Membran	Millipore, Bedford MA, USA
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel

2.4.6 Software:

Excel	Microsoft
Image-Quant	Molekular Dynamics, Krefeld
MUCEL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
SPSS	SAS Software-Version 6.11

3. Kapitel: Methoden

3.1 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Herzmuskelzellen wurden aus den adulten männlichen Wistar-Ratten (Lebendgewicht 250-350 g) isoliert. Die Tiere wurden im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität gezüchtet und gehalten. Sie erhielten freien Zugang zu Nahrung (Standard-Futter Altromin) und Wasser.

3.1.2 Präparation von Herzmuskelzellen adulter Ratten

Die Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte entsprechend der zuvor publizierten Methode (Piper et al., 1982).
Nach kurzer Äthernarkose (ca. 1 min) wurde der Thorax der Versuchstiere mittels Schnitt entlang des unteren Rippenbogens und zweier parasternaler Schnitte eröffnet, das Mediastinum dargestellt und das Perikard abpräpariert. Anschließend wurde das Herz-Lungenbündel angehoben und mit einem Scherenschlag herausgelöst, woraufhin es unmittelbar in eiskalte isotonische Kochsalzlösung verbracht wurde. Hierin wurden zunächst die Lunge sowie noch vorhandene Gewebereste entfernt und anschließend das Herz mit der Aorta ascendens an eine Langendorff-Apparatur angehängt, in der es retrograd perfundiert wurde. Nach Auswaschen des verbliebenen Blutes mit 20 ml Powell-Medium wurde das Herz für 25 Minuten mit 50 ml Kollagenasepuffer rezirkulierend perfundiert. Mit einem Ventil wurde dabei eine Flussrate von etwa 2-3 ml/min eingestellt. Vor und während der Perfusion wurde das Powell-Medium mit Carbogen begast.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewebe mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde es (unter Carbogenbegasung) für 10 Minuten im Rezirkulationspuffer mit 1% (w/v) Albumin bei 37^{O}C inkubiert. Die Mazeration der ventrikulären Herzmuskelzellen wurde dabei durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren (10 ml Pipetten) unterstützt.
Im Anschluss wurde die so gewonnene Zellsuspension durch ein Nylonnetz (0,2 mm Porengröße) filtriert, um die verbliebenen Zellaggregate abzutrennen. Die filtrierte Zellsuspension wurde bei 25 g für 3 Minuten zentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Kardiomyozyten wurden in Powell-Medium, das zusätzlich 200 µMol/l $CaCl_2$ enthielt, aufgenommen und erneut bei 25 g für 2 Minuten zentrifugiert. Das hierbei sedimentierte Pellet wurde in Powell-Medium plus 400 µMol/l $CaCl_2$ aufgenommen und zu einer homogenen Zellsuspension aufgeschüttelt. Diese Suspension wurde auf Reagenzgläser verteilt, die zuvor mit einer ca. 10 cm hohen Flüssigkeitssäule der Gradienten-Lösung beschickt worden waren. Nach erneuter Zentrifugation (60 Sekunden bei 25 g) wurde eine Zellpopulation gewonnen, die zu 70-80 % aus stäbchenförmigen, ventrikulären Kardiomyozyten bestand.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Vor- und Ausplattierung

Um eine Anheftung der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten auf Kulturschalen zu gewährleisten, wurden diese Schalen vor dem Ausplattieren über Nacht bei 37^{O}C mit Vorinkubationsmedium behandelt. Dieses wurde dann unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen wieder abgesaugt.
Das Zellpellet mit den isolierten Kardiomyozyten wurde mit CCT-Kulturmedium zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer resultierenden Plattierungsdichte von 5x10^{4} Zellen pro cm^{2} ausplattiert.

Anschließend wurden die Zellkulturen für vier Stunden bei 37^{O}C inkubiert und danach mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Bei diesem Schritt wurden abgerundete Zellen entfernt, so dass die verbliebene Zellkultur zu etwa 90 % aus stäbchenförmigen Kardiomyozyten bestand.

3.2.2 Kurzzeitkulturen der isolierten Kardiomyozyten

Unter Kurzzeitkulturen versteht man frisch isolierte Kardiomyozyten, die nach der bereits beschriebenen vierstündigen Anheftungsphase unmittelbar für die entsprechenden Experimente verwendet werden. Bei dieser Kulturform bleibt die charakteristische stäbchenförmige Gestalt der Zellen weitestgehend erhalten. Die Zellen werden serumfrei kultiviert.

3.3 Messung von Myokardzell-Kontraktionen im Elektrischen Feld

3.3.1 Probenvorbereitung

Bei der Messung von Myokardzell-Kontraktionen im elektrischen Feld wurde mit Kurzzeitkulturen von isolierten Kardiomyozyten gearbeitet. Unmittelbar vor dem Experiment wurde eine Zellkulturschale aus dem 37^{O}C warmen Inkubator genommen und das CCT-Kulturmedium abgesaugt. Daraufhin wurde die Kulturschale mit 3 ml auf 37^{O}C im Wasserbad angewärmter Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung gefüllt.
Wo ausdrücklich erwähnt wurde diesen Schalen eine bestimmte Reagenz zugesetzt, z.B. PTHrP. Vor Versuchsbeginn ließ man das Reagenz 15 Minuten lang auf die kultivierten Kardiomyozyten einwirken.

3.3.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Myokardzell-Kontraktion

Die mit Zellkontraktionspuffer und eventuell mit Reagenz gefüllte Kulturschale wurde auf den Objekttisch eines Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. In diesen Deckel waren vier Löcher gebohrt worden, die so angeordnet waren, dass sie annähernd die Eckpunkte des Quadrats bildeten, welches den Kreis des Deckels maximal ausfüllt. Der Draht, der später an die Kathode des Elektrostimulators angeschlossen wurde, war durch eines dieser Löcher in das Innere des Deckels geführt worden, so dass er in den Zellkontraktionspuffer in der Kulturschale eintauchen konnte. Durch ein benachbartes Loch wurde er wieder nach außen geführt. Dabei war er so gebogen, dass er annähernd senkrecht in den Zellkontraktionspuffer eintauchte, dann abknickte und horizontal durch den Puffer verlief, darauf wieder abknickte und senkrecht den Puffer wieder verließ. Mit dem Draht, der später an die Anode angeschlossen wurde, verfuhr man auf die selbe Weise. In der mit diesem Deckel geschlossenen Kulturschale lagen sich also zwei horizontal verlaufende Drähte gegenüber, die beiden in den Puffer eintauchten. Die beiden Drähte stellten Kathode und Anode in der Schale dar. Wurden sie an den Stimulator angeschlossen, baute sich zwischen ihnen ein elektrisches Feld auf, das aufgrund der Drahtform einem homogenen Feld angenähert war und so zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss zwischen den beiden Drähten und damit zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Zellen zwischen den beiden Drähten führte.

Die Zellen wurden mit biphasischen Stromstößen, die von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst wurden und jeweils 0,5 Millisekunden dauerten, zur Kontraktion stimuliert. Zeitweise auftretende Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz wurden durch die Stimulation vereinheitlicht, indem der Stimulator ihnen seine Stromstoßfrequenz als Kontraktionsfrequenz aufzwang. Zellen, die die vorgegebene Frequenz nicht annahmen, wurden in den Experimenten nicht berücksichtigt.

Man konnte nun den Myokardzellen verschiedene Frequenzen vorgeben, indem man die Stimulationsfrequenz änderte.

Diese Methode der Stimulation wurde bereits von Schlüter et al. 1997 beschrieben.

3.3.3 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments GmbH aus Heidelberg erfaßt. Während der Stimulation der Zellen in der Kulturschale befand sich die Kulturschale auf dem Objekttisch eines Mikroskops. Durch das Mikroskop war es möglich, die Zellen bei ihren Kontraktionen zu beobachten.
An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen. Die eine Kamera war eine Videokamera zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Bei der anderen handelte es sich um eine Zeilenkamera, die in der Lage war, Zellgrenzen zu erkennen, da sie verschiedene Helligkeiten wahrnehmen konnte, so auch den Hell-Dunkel- bzw. Dunkel-Hell-Übergang an der Grenze zwischen Zelle und Hintergrund. Um nun eine Kontraktion mit der Zeilenkamera beobachten zu können, musste man die Zeilenkamera so positionieren, dass beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile lagen. Dazu bewegte man die Kulturschale so, dass sich die zu untersuchende Zelle genau in der Mitte des Okularbildes befand, und drehte dann die Zeilenkamera, bis man am Videobild sehen konnte, das sich beide Zellenden im Erfassungsbereich der Zeilenkamera befanden.
Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde nicht auf einem Monitor, sondern über das Interface auf einem Oszillographen dargestellt. Die Ablenkzeit war auf dem Horizontalverstärker fest auf 0,1 ms/cm eingestellt, der Vertikalverstärker war auf 5 V/div geregelt. Für die Bilddarstellung wurde er intern getriggert, so dass man ein stehendes Bild erhielt. Wenn nun die Zeilenkamera verschiedene Helligkeiten wahrnahm, wurden diese auf dem Oszillographen als verschieden starke y-Auslenkungen dargestellt. Diejenigen Amplituden, die die Zellgrenzen darstellten, konnten an ihrer horizontalen Bewegung identifiziert werden. Es war also möglich, die Zellkontraktion auf dem Oszillographen zu beobachten.
Der Oszillograph wurde als Zweikanaloszillograph betrieben. Am zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wurde sie abgelesen, stellte sie sich als eine weitere horizontale Linie einer bestimmten Höhe auf dem Bildschirm des Oszillographen dar. Wurde sie nicht abgelesen, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie in der Höhe Null.

Diese zweite Spannung wurde extern über das Interface getriggert, und zwar auf folgende Weise: Man setzte einen Triggermarker des Interface, die ebenfalls vom Interface auf dem Oszillograph durch eine Amplitude sichtbar gemacht wurde, vor eine Amplitude des Zellbildes. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes (sichtbar gemacht durch den Anstieg der Amplitude des Zellbildes) den Wert, der durch den Triggermarker vorgegeben wurde (sichtbar gemacht durch die Amplitude des Triggermarkers), so begann der Oszillograph, die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Am Bildschirm des Oszillographen sah man an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals einen Sprung der Horizontalen aus der Null-Position in die Höhe. Veränderte nun die Amplitude des Zellbildes im Zuge der Kontraktion ihre Position, so veränderte sich auch die Position, an der der Trigger-Wert erreicht wurde. Damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Im bewegten Bild sah man, wie sich die obere Horizontale an ihrer Kante vor und zurück bewegte. Man konnte also die Zelllänge und die Zellkontraktion an dieser Zellkante anhand der Horizontalen beobachten. An der anderen Zellkante verfuhr man analog.
Die Information Interface-Spannung an bzw. Interface-Spannung aus wurde vom Oszillograph an das Interface weitergegeben, welches sie wiederum an einen Computer weiterleitete.
Auf diesem PC lief das Programm MUCELL der Firma Scientific Instruments GmbH. Dieses Programm registrierte aus der Information Spannung an bzw. Spannung aus die Länge der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anhand der Zelllängen zu verschiedenen Zeitpunkten erstellte das Programm einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit der Zeit darstellte, also eine Kurve, die die Kontraktion der Zelle darstellte.
Der Computer erkannte an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung den Beginn einer Kontraktion. Er nahm 5 Kontraktionen auf und ermittelte folgende Werte als Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Einzelmessungen:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometern
2. Die minimale Zelllänge, (systolische Zelllänge) in Mikrometern
3. Die Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (Time to peak) in Milisekunden

4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde
6. Die Zeit von der 10%-igen Zellkontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke

Aus diesen Parametern wurden noch drei weitere Parameter errechnet:

1. Der Quotient ΔL/L: Man bildete die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge und dividierte diese Differenz durch die diastolische Zelllänge. In Prozent ausgedrückt zeigt die ΔL/L an, um wieviel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.
2. Die Con_{max} als Ratenkonstante für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit: Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wurde durch die Zelllänge der betreffenden Zelle dividiert, um so die Geschwindigkeit auf die Länge zu normieren. Die Con_{max} wurde in der Einheit [s^{-1}] angegeben.
3. Die Rel_{max} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit: Analog zur Con_{max} wurde die maximale Relaxationsgeschwindigkeit durch die Zelllänge dividiert und in der Einheit [s^{-1}] angegeben.

3.3.4 Meßprotokoll

Jede Zelle wurde auf die oben beschriebene Weise bei einer Frequenz von 1 Hz viermal ausgemessen, wobei zwischen zwei Messungen jeweils 15 Sekunden verstrichen. Die so erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden in das Programm Excel übertragen und weiterverarbeitet: Aus diesen jeweiligen ersten vier Mittelwerten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt. Danach änderte man die Frequenz und maß die Zelle noch einmal bei 0,5 Hz und bei 2 Hz aus.
Das Meßprotokoll für eine einzelne Zelle soll hier noch einmal graphisch dargestellt werden:

1 Hz			0,5 Hz			2 Hz		
Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert	**Mittelwert Standardabweichung Median**	Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert	**Mittelwert Standardabweichung Median**	Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert	**Mittelwert Standardabweichung Median**
Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert		Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert		Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert	
Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert		Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert		Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert	
Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert		Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert		Messung Messung Messung Messung Messung	Mittelwert	

Zwischen jeder Messung lagen 15 Sekunden

Pro Kulturschale wurden je 3 Zellen untersucht. Pro Zellkultur und damit pro Rattenherz-Präparation wurden jeweils 6 Kulturschalen untersucht, also insgesamt 18 Zellen. Von diesen 6 Schalen diente je eine als Kontrollschalen, in die keine Reagenz zugegeben wurde. Den übrigen 5 Schalen wurde Reagenz zugesetzt.
Das selbe Experiment wurde mit 3 weiteren Zellkulturen anderer Präparationen wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3.5 Auswaschversuche

Es wurde außerdem untersucht, ob die Wirkung eines Reagenz auf die Zellen einer Kulturschale auch noch nach dem Auswaschen anhielt.
Die auf diese Weise zu untersuchenden Kulturschalen wurden zunächst wie unter 3.3.1 beschrieben vorbereitet. Nach einer Einwirkzeit der Reagenz von 15 Minuten wurden der Zellkontraktionspuffer und die darin enthaltene Reagenz abgesaugt. Danach wurden wiederum 3 ml Zellkontraktionspuffer zugesetzt und eine bestimmte Zeit (in dieser Arbeit jeweils 15 Minuten) abgewartet, bevor die Schale ausgemessen wurde.

3.3.6 Auswertung der Kontraktions-Parameter

Bei der Auswertung der Kontraktionsparameter wurden die in den Experimenten erhaltenen Mediane betrachtet, also pro Zelle und pro Frequenz jeweils ein Wert.
Die Kontraktions-Parameter wurden mit dem Statistik-Programm SPSS ausgewertet. Wurden zwei Teilexperimente verglichen (z.B. Schalen mit und ohne PTHrP), wurden die erhaltenen Parameter mit dem t-Test verglichen. Die jeweilige Arbeitshypothese wurde verworfen, wenn das empirische Signifikanzniveau, bzw. der p-Wert, Werte unter 0,05 annahm.
Wurden mehrere Gruppen untereinander verglichen, so wurde zunächst mit dem ANOVA-Test eine Varianzanalyse durchgeführt. Deutete dieser Test Unterschiede zwischen den Gruppen an, wurde zur post hoc Analyse der Student-Newman-Keuls-Test angewandt. Auch hier wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 als signifikant betrachtet.

3.4 Protein-Gelelektrophoretische Methoden

3.4.1 Herkunft des authentischen PTHrP

Authentisches PTHrP wurde aus dem Überstand von Endothelzellen gewonnen, die mit KCN (5 mmol/l) und Deoxyglucose (5 mmol/l) energieverarmt wurden. Die Überstände von energieverarmten Endothelzellkulturen wurden gesammelt, die Proteine in diesen Überständen mit Trichloressigsäure gefällt und anschließend wieder in Puffer gelöst. Danach wurden die so gewonnenen Proteine mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert, der gegen die Aminosäurensequenz 38-64 des PTHrP gerichtet ist. Zu diesen Proben wurde Protein A Sepharose gegeben. Nach einer Zentrifugation (3 000 g, 3 Minuten) wurden die Pellets dreimal mit einem Puffer gewaschen, der 50 mmol/l Natrium-Phosphat und 0,1% (vol/vol) NP-40 enthält. Protein A Sepharose wurde durch die Inkubation mit einem Lösungs-Puffer wieder entfernt. Das auf diese Weise immunpräzipitierte Protein wurde nun wieder in Wasser gelöst.

Danach wurde der Proteingehalt der Lösung bestimmt. Das zur Konzentrationsbestimmung in der Einheit µMol/l benötigte Molekulargewicht von authentischem PTHrP wurde abgeschätzt, indem man eine Protein-Gelelektrophorese durchführte und die Banden des gewonnenen Proteins mit den Banden von Molekulargewichtsmarkern verglich.

3.4.2 Probenvorbereitung

Vor der Durchführung der Protein-Gelelektrophorese wurde die PTHrP enthaltende Lösung in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proteine dieses Teils wurden vollständig denaturiert, indem man die Probe im Eppendorf-Inkubator für 10 Minuten auf 65^{O}C erhitzte. Danach erfolgte der Zusatz von 10% (vol/vol) einer Lösung aus:

Bromphenolblau	0,001% wt/vol
Wasser-Glycerin-Lösung	1:1 wt/vol

Die Proben konnten bei –20^{O}C bis zur späteren Weiterverwendung eingefroren werden.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) des wie im vorherigen Abschnitt beschrieben gewonnenen Proteinextraktes erfolgte nach LAEMMLI. Alle für den Aufbau der Gelkammer benötigten Teile wurden vor ihrer Verwendung gründlich gereinigt und mit Hilfe von 70%-igem Alkohol entfettet. Zwei parallel angeordnete Glasplatten, durch Abstandhalter voneinander getrennt, bildeten die Gelkammer, die seitlich durch die Abstandhalter und nach unten durch einen Silikonschauch abgedichtet wurde. Zur Verwendung kamen ausschließlich diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammelgel und Trenngel.
Folgende Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung wurde für Trenn-und Sammelgel verwendet:

AA/Bis-AA-Stammlösung (30/0,3):

Acrylamid	30% (wt/vol)
Bisacrylamid	0,3% (wt/vol)

Die verwendete 12,5%-ige Trenngel-Lösung setzte sich wie folgt zusammen:

Trenngel-Lösung:

H_2O	7,5 ml
AA/Bis-AA-Stammlösung	12,5 ml
TRIS/HCl (pH 8,8) 1,5 mMol/l	7,5 ml
SDS-Lösung (10% (wt/vol))	300 µl
TEMED	10 µl
Ammoniumpersulfat (10% (wt/vol))	150 µl

Die Bestandteile der Lösung wurden sorgfältig durchmischt und darauf sofort in die vorbereitete Gelkassette gegossen und mit Aqua demin. überschichtet. Die Polymerisation des Gels dauerte etwa 60-90 Minuten. Nach dem Aushärten des Gels konnte das überschichtete Wasser dekantiert werden und auf das Trenngel die vorbereitete 6%-ige Samelgel-Lösung aufgebracht werden.

Sammelgel-Lösung:

H_2O	5,2 ml
AA/Bis-AA-Stammlösung (30ml:0,75ml)	2 ml
TRIS/HCl (pH 6,8) 0,5 Mol/l	2,5 ml
SDS-Lösung (10% (wt/vol))	100 µl
TEMED	10 µl
Ammoniumpersulfat (10% (wt/vol))	150 µl

Die Bestandteile wurden sorgfältig durchmischt und mit der so erhaltenen Sammelgel-Lösung wurde das ausgehärtete Trenngel überschichtet. Ein Gelkamm zur Formung der Taschen, welche später die Proben aufnehmen konnten, wurde eingesetzt, Die Polymerisation des Sammelgels beanspruchte eine Dauer von etwa 30-60 Minuten.

Nach Aushärtung des Gels wurden der Gelkamm sowie der Silikonschlauch zur Abdichtung der Kassette nach unten entfernt. Die Elektrophoresekammer wurde nun mit Laufpuffer beschickt.
Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 40 V über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt. Um eine Zuordnung der identifizierten Banden durchführen zu können, wurde das Molekulargewicht der untersuchten Proteine durch Auftragen von Protein-Molekulargewichts-Markern bekannter Größe (SDS-6H-High-Molecular-Weight-Standard; Sigma, Darmstadt) mit den zu untersuchenden Proben aufgetragen.

3.4.4 Western-Blot-Verfahren

Um die zellulären Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung analysieren zu können, mussten sie zunächst auf eine Membran fixiert werden. Dazu wurde das „Semi-Dry Blotting“-Verfahren nach Khyse-Anderson angewandt, bei dem die Proteine von dem Trenngel elektrophoretisch auf eine Polyvinyliden-Difluorid-(PVDF-)Membran transferiert werden. Im Puffer getränkte Filterpapiere wurden hierbei als Pufferreservoir verwendet. Mit Hilfe von Antikörpern konnten auf diese Weise die fixierten Proteine detektiert werden.
Jeweils vier auf die Größe des Trenngels zugeschnittene Filterpapiere wurden mit den entsprechenden Puffern getränkt. Die PVDF-Membran (ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten) wurde zunächst mit Methanol benetzt und darauf für 30 Minuten mit Anodenpuffer equilibriert. Nun wurden zunächst die vier mit konzentriertem Anodenpuffer getränkten, dann die vier mit Anodenpuffer getränkten Filterpapiere und die PVDF-Membran auf die Anode der Western-Blot-Apparatur aufgebracht. Das Trenngel wurde, an der Glasscheibe der Gelkassette haftend, auf die Membran gelegt und durch Kippen die Glasscheibe vom Gel gelöst. Über das Gel wurden schließlich die vier mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere gelegt und mittels einer Handwalze sorgfältig zwischen den Schichten entstandene Luftblasen entfernt, bevor der Kathodendeckel der Western-Blot-Apparatur aufgelegt wurde.

Der Elektrotransfer fand bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 4 Stunden bei Raumtemperatur statt. Die Molekulargewichts-Marker wurden mit Amidoschwarz gefärbt.

3.4.5 Proteinfärbung mit Amidoschwarz

Zur dauerhaften Färbung von Proteinen auf der PVDF-Membran (z.B. ungefärbter Molekulargewichts-Marker) wurde diese für 5 Minuten mit Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit Amidoschwarz-Entfärber so lange, bis die unspezifische Hintergrundfärbung der PVDF-Membran weitestgehend verschwand und sich nur noch die Proteinbanden schwarz gefärbt darstellten.

Amidoschwarz-Färbelösung:

Amidoschwarz	0,1	% (wt/vol)
Essigsäure	7	% (wt/vol)
Methanol	45	% (wt/vol)

Amidoschwarz-Entfärber:

Essigsäure	7	% (wt/vol)
Methanol	70	% (wt/vol)

3.4.6 Immunologische Nachweismethoden nach Western-Blot

Anders als die vorbeschriebenen unspezifischen Färbemethoden mit Amidoschwarz erfolgte die spezifische Darstellung bestimmter Proteine mittels Antikörper.

Um unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran für die später zum Einsatz kommenden Antikörper abzusättigen, wurde diese nach erfolgtem Proteintransfer zunächst für mindestens 2 Stunden mit einer 3%-igen BSA-Lösung (bovines Serumalbumin, Sigma, Deisenhofen) in TBS bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach darauf folgendem zweimaligem Waschen in TBS für 5 Minuten war die Membran für die Inkubation mit dem Erstantikörper präpariert. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden mit Erst-Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur.
Für den PTHrP-Nachweis wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper verwendet, der gegen die Aminosäuren 38 bis 64 des Proteins gerichtet ist.

Erst-Antikörper-Lösung:

Erst-Antikörper	1 µg/ml
BSA	3 % (wt/vol)
Triton X-100	0,1 % (wt/vol)
pH-Wert	7,4
Gelöst in TBS	

Die Erst-Antikörper-Lösung konnte mehrere Male wiederverwendet werden und wurde zwischenzeitlich bei –20^{O}C gelagert. Im Anschluss an die Inkubation mit der Erst-Antikörper-Lösung wurde die PVDF-Membran zweimal für jeweils 10 Minuten mit TBS gewaschen, das mit 0,1% Triton X-100 (vol/vol) versetzt war.
Nun erfolgte die Inkubation mit der Zweit-Antikörper-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Bei dem Zweit-Antikörper handelte es sich um einen Anti-Maus-Ig-Antikörper gegen den C-Terminus des Erst-Antikörpers, an den das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war.

Zweit-Antikörper-Lösung:

Zweit-Antikörper	1 µg/ml
BSA	3 % (wt/vol)
Triton X-100	0,1 % (wt/vol)
pH-Wert	7,4

Schließlich wurde die PVDF-Membran zunächst zweimal für je 10 Minuten mit TBS / 0,5% Triton X-100 (vol/vol) und anschließend zweimal (je 10 Minuten) mit TRIS / HCl (10 mMol/l, pH 7,4) gewaschen.
Die zu untersuchenden Proteine waren somit auf der Membran fixiert und durch die Behandlung mit den beiden Antikörpern markiert. In einem letzten Schritt konnten sie mittels einer Farbreaktion, die durch die an den Zweit-Antikörper gekoppelte Alkalische-Phosphatase katalysiert wurde, sichtbar gemacht werden. Für diesen Schritt der Entwicklung des Immunoblots wurde eine Substrat-Puffer-Lösung verwendet, die unmittelbar vor Gebrauch angesetzt wurde. Sie enthielt die beiden Substrate Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP). BCIP wurde durch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in ein violettes Präzipitat umgesetzt.
Dieser Entwicklungsschritt erfolgte unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur bis keine weitere Zunahme der Farbintensität mehr zu beobachten war (2-20 Minuten). Um ein Nachdunkeln der Membran zu verhindern, wurde sie mehrmals mit Aqua demin. gewaschen. Zur Trocknung wurde sie zwischen zwei Filterpapiere gelegt und anschließend mit Hilfe eines Video-Systems (Intas, Göttingen) dokumentiert.

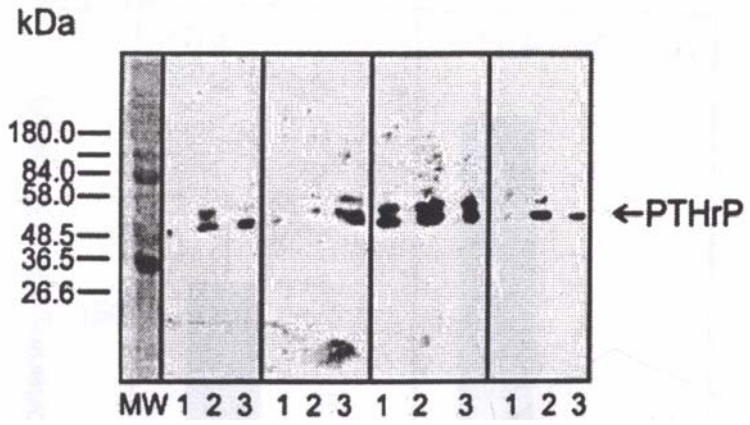
4. Kapitel: Ergebnisse

4.1 Kontraktile Wirkung von authentischem endothelialen PTHrP und synthetischem PTHrP(1-34)

4.1.1 Herstellung und Charakterisierung von authentischen endothelialem PTHrP

Aus Endothelzell-Kulturen wurde durch Immunpräzipitation eine PTHrP-Lösung wie unter 3.4.1 beschrieben gewonnen.
Diese wurde mit gelelektrophoretischen Methoden auf Reinheit überprüft. Dazu wurde eine wie unter 3.4.2/3 beschriebene Gelelektrophorese durchgeführt. Der Western-Blot (3.4.4) wurde zunächst mit Amidoschwarz (3.4.5), dann mit Hilfe immunologischer Nachweismethoden mit BCIP (3.4.6) gefärbt.
Mit der unspezifischen Amidoschwarz-Färbung wurde eine singuläre Bande sichtbar gemacht. Daher wurde davon ausgegangen, dass nur eine Proteinart in nennenswerter Konzentration in der Lösung vorhanden waren.
Mit der spezifischen BCIP-Färbung wurde überprüft, ob es sich bei der gefundenen Bande tatsächlich um PTHrP handelt.

Abbildung 1 zeigt einen repräsentativen Western-Blot mit der typischen Bande von authentischem PTHrP.

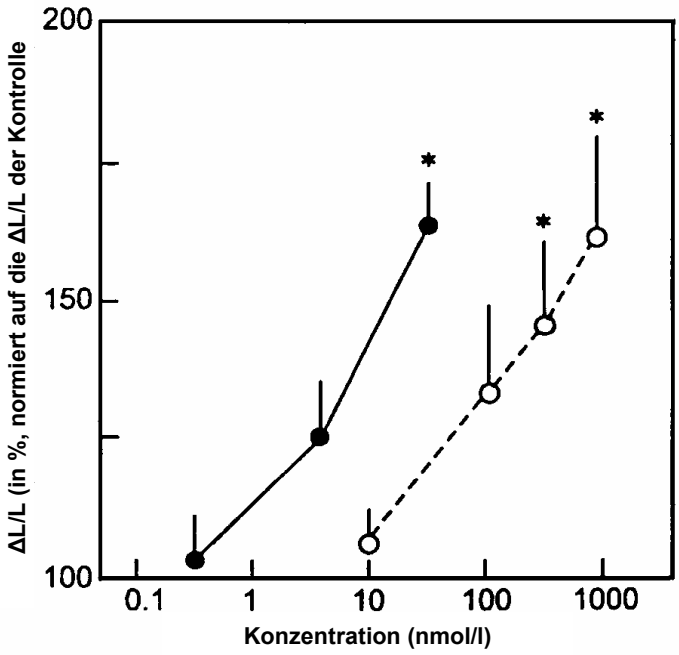


Bildunterschrift:
Abbildung 1 zeigt einen repräsentativen, mit BCIP gefärbten Western-Blot verschiedener aus Endothelzellkulturen gewonnener PTHrP-Lösungen.
Die Zellkulturen wurden zur Energieverarmung mit KCN (5 mmol/l) und Desoxyglucose (5 mmol/l) über einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert. Alle 20 Minuten wurden Proben des Überstands genommen, die bei ausreichendem PTHrP-Gehalt zu PTHrP-Lösungen weiterverarbeitet wurden.
Die mit MW bezeichnete Bahn zeigt die Molekulargewichtsmarker. Die mit 1, 2 und 3 bezeichneten Säulen repräsentieren Proben, die nach 20, 40 und 60 Minuten gewonnen wurden. Es wurden vier verschiedene Endothelzellkulturen untersucht.

Anhand des apparenten Molekulargewichts von ca. 50 kDa und des Proteingehalts der Lösung wurde die PTHrP-Konzentration der durch Immunpräzipitation gewonnenen Lösung berechnet. Das hohe apparente Molekulargewicht ist Folge einer posttranslationalen Glykosylierung [27].

4.1.2 Die kontraktile Wirkung von authentischem PTHrP und synthetischem PTHrP(1-34)

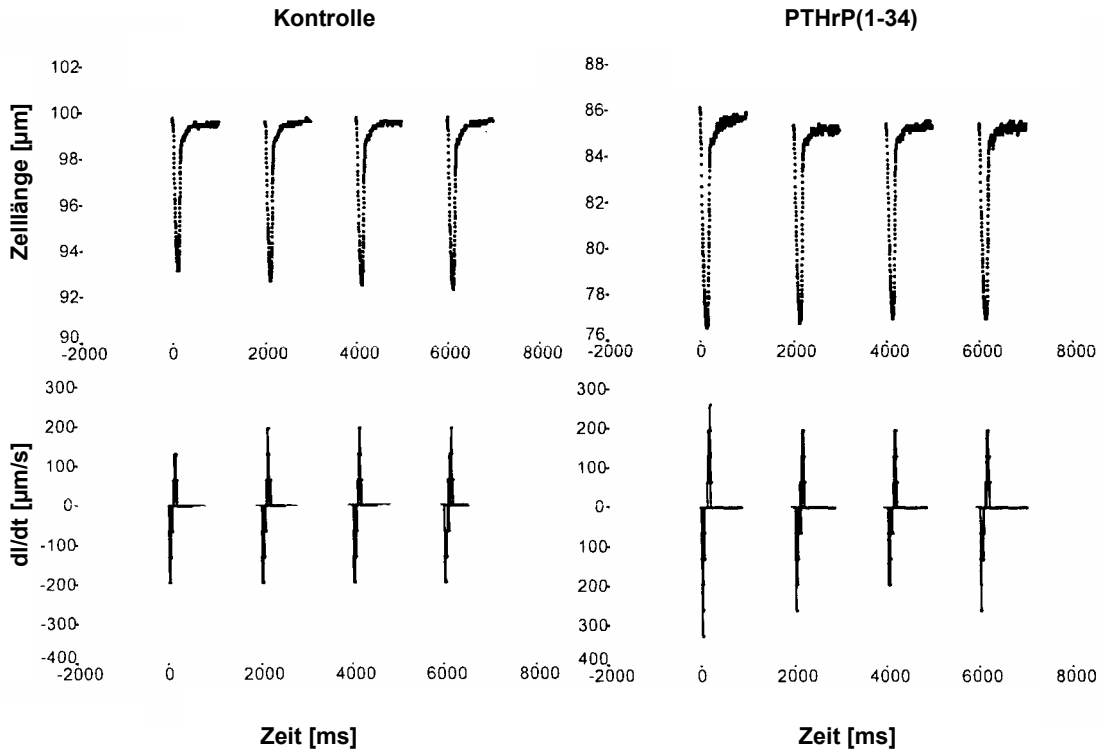
Es wurde untersucht, ob sich die biologische Aktivität von authentischem, endothelial gebildetem und posttranslational glykolysiertem PTHrP von der des synthetischen Teilpeptids PTHrP(1-34) unterscheidet. PTHrP(1-34) repräsentiert die prospektive Aktivierungsdomäne des PTHrP für die Adenylatzyklase und die prospektive primäre Bindungsdomäne des PTHrP. Für beide Peptidlösungen wurden Konzentrationswirkungskurven aufgenommen (siehe Abbildung 2).



Bildunterschrift:
Abbildung 2 zeigt den Effekt von PTHrP auf die Zellkontraktion, ausgedrückt in Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (ΔL/L in %). Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Die Zellen wurden in den auf der Abszisse angegebenen Konzentrationen inkubiert. Verwendet wurde zum einen authentisches, endothelial gebildetes PTHrP, das durch Immunpräzipitation gewonnen worden war (●), zum anderen synthetische PTHrP(1-34) (○). Die Daten wurden von 16 verschiedenen Zellpräparationen erhoben. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts. Der 100%-Wert der Kontrollzellen entspricht einer relativen Zellverkürzung ΔL/L von 4,8 $\pm$ 0,6 %. * $p < 0,05$ gegen die Kontroll-Zellen ohne PTHrP.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl authentisches PTHrP als auch synthetisches PTHrP(1-34) die Zellverkürzung elektrisch stimulierter Kardiomyozyten konzentrationsabhängig steigert. Die Konzentrationswirkungskurve von authentischem PTHrP ist im Vergleich mit der des synthetischen PTHrP(1-34) um eine Größenordnung nach links verschoben.

Abbildung 3 zeigt einige beispielhafte Kontraktionskurven von mit synthetischem PTHrP(1-34) inkubierten Kardiomyozyten.



Bildunterschrift:
Abbildung 3 zeigt einzelne beispielhafte Kontraktionskurven von mit 0,5 Hz stimulierten Myokardzellen. Die Kontrollzellen wurden nicht vorbehandelt, die anderen Zellen mit synthetischem PTHrP(1-34) (1 µmol/l) vorinkubiert. Die oberen Graphen zeigen die Zelllängenänderung im zeitlichen Verlauf der Kontraktion, die unteren Graphen die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im zeitlichen Verlauf der Kontraktion.

Um die Spezifität der durch Immunpräzipitation gewonnenen PTHrP-Lösung zu überprüfen, wurde ein Versuch gewählt, bei dem ein IgG-Mausantikörper, der nicht gegen PTHrP gerichtet war, verwendet wurde. Wurde nun diese Lösung wie eine PTHrP-Lösung gebraucht, so wurden folgenden Ergebnissen erzielt:

	Anzahl	**Konzentration**	**ΔL/L [%]**
Kontrolle	12	-	4,63 ± 0,23
Test-Lösung	12	1 µmol/l	4,43 ± 0,92

Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Zugesetzt wurde die wie oben beschrieben hergestellte Testlösung (Immunopräzipitat, welches mit einem Antikörper ohne PTHrP-Spezifität gewonnen worden war). Es war also kein kontraktiler Effekt nachzuweisen.

4.1.3 Der lusitropische Effekt von authentischem PTHrP und PTHrP(1-34)

Zeitgleich zur Zelllängenverkürzung wurden Parameter zur Kinetik der Kontraktion erfasst. Dabei wurden die Kardiomyozyten mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert und die Rel_{max} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit und die Zeit von maximaler Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke (R_{90}) erfasst. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

Tabelle 1:

	Anzahl	**Konzentration**	**Rel_{max} [s^{-1}]**	**R_{90} [ms]**
Kontrolle	12	-	58,2 ± 3,1	76,4 ± 5,2
PTHrP	12	1 µmol/l	87,3 ± 5,4 *	53,8 ± 3,2 *

* $p < 0,05$ gegen die Kontrollen

Tabelle 2:

	Anzahl	Konzentration	Rel_{max} [s^{-1}]	R_{90} [ms]
Kontrolle	36	-	20,74 ± 2,28	203 ± 7
PTHrP(1-34)	12	1 µmol/l	26,91 ± 2,91 *	154 ± 23 *

* $p < 0,05$ gegen die Kontrollen

Aus den Tabellen ist ersichtlich, dass PTHrP und PTHrP(1-34) die maximale Relaxationsgeschwindigkeit signifikant erhöhen und die Zeit zur 90%igen-Relaxation signifikant verkürzen.

4.2 Kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16)

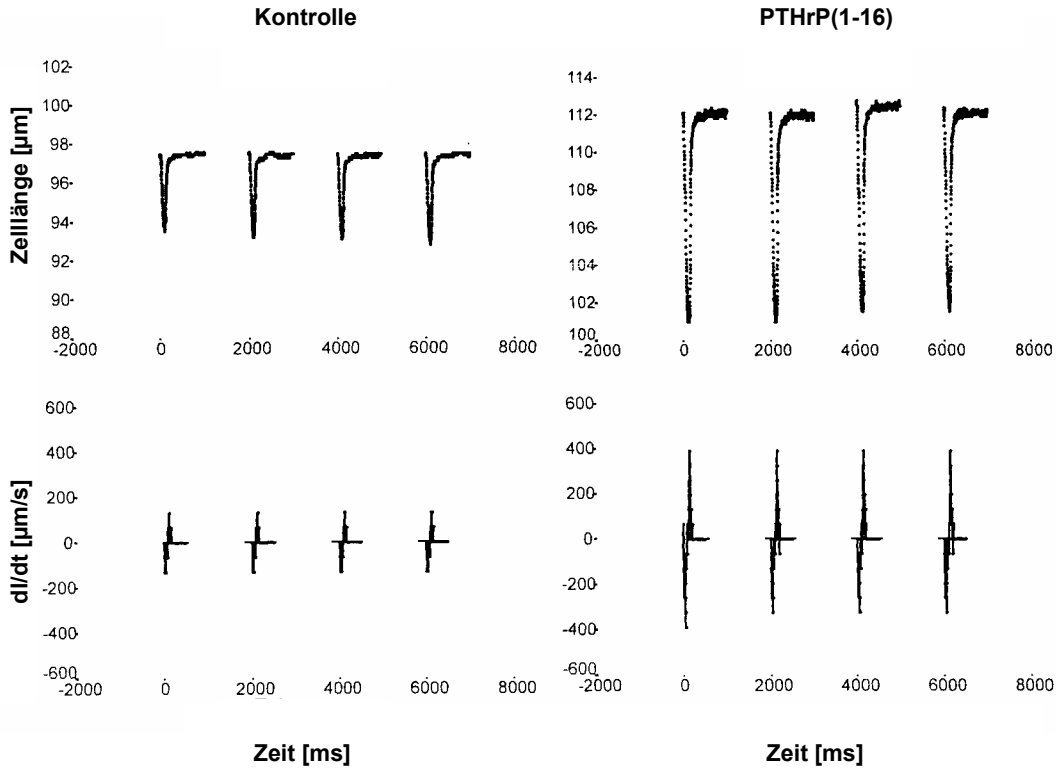
Um die für die kontraktile Wirkung des PTHrP verantwortlichen strukturellen Bereiche genauer zu charakterisieren, sollten weitere Experimente mit weiter COOH-terminal verkürzten synthetischen Teilpeptiden durchgeführt werden. Zunächst wurde das PTHrP(1-16) gewählt.
Die Myokard-Zellen wurden bei einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert. Als Maß für die Kontraktilität wurde die Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (ΔL/L in %) gewählt. PTHrP(1-16) wurde in einer Konzentration von 1 µmol/l verwendet.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	36	5,33 ± 0,72
PTHrP(1-16)	12	8,95 ± 1,10 *

* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrolle

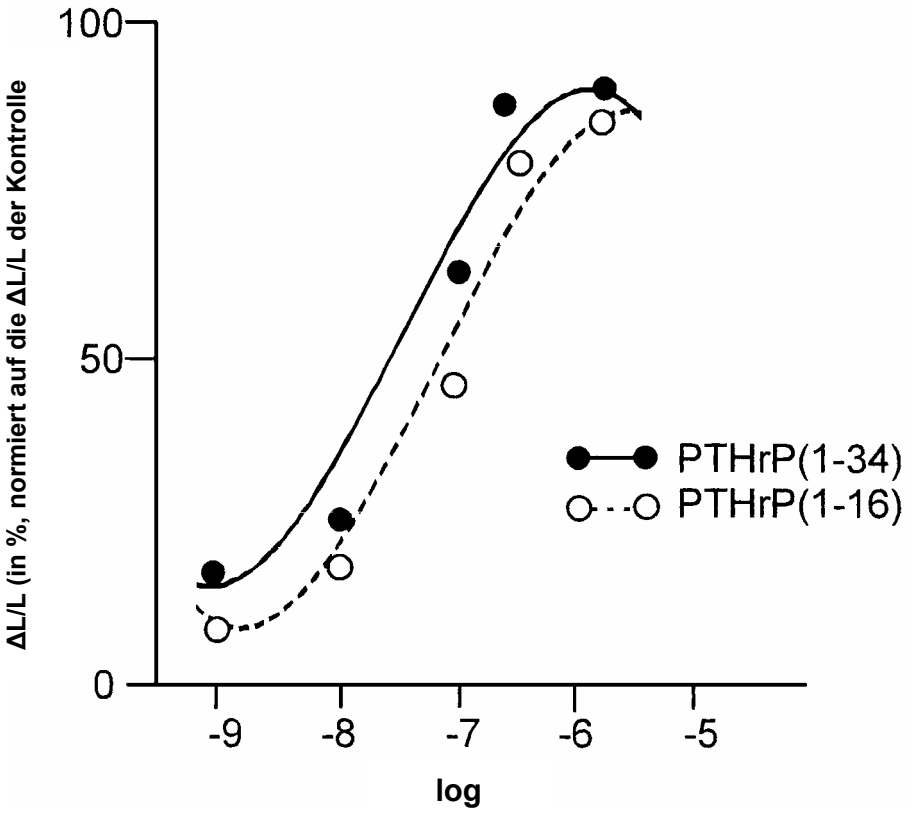
Abbildung 4 zeigt einige repräsentative Kontraktionskurven, die die Wirkung von PTHrP(1-16) auf Myokardzellen veranschaulichen sollen:



Bildunterschrift:
Abbildung 4 zeigt einzelne beispielhafte Kontraktionskurven von mit 0,5 Hz stimulierten Myokardzellen. Die Kontrollzellen wurden nicht vorbehandelt, die anderen Zellen mit PTHrP(1-16) (1 µmol/l) vorinkubiert. Die oberen Graphen zeigen die Zelllängenänderung im zeitlichen Verlauf der Kontraktion, die unteren Graphen die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im zeitlichen Verlauf der Kontraktion.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass PTHrP(1-16) einen positiven kontraktilen Effekt vorweist, der den kontraktilen Effekten von authentischem PTHrP und PTHrP(1-34) ähnelt.

PTHrP(1-34) war in der Lage, eine der des PTHrP(1-16) vergleichbare kontraktionssteigernde Wirkung schon bei geringeren Konzentrationen zu erzielen. Abbildung 5 veranschaulicht dies graphisch:



Bildunterschrift:
Abbildung 5 zeigt die Konzentrationswirkungskurven für die positiven kontraktilen Wirkungen von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16). Die horizontale Achse zeigt die Konzentration in [mol/l]. Die vertikale Achse zeigt die ΔL/L der getesteten Kardiomyozyten, welche auf die ΔL/L der jeweiligen Kontrollen normiert wurde. Für jede Kurve gilt n = 12 Zellen.

Von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) wurde jeweils die Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung erreicht wird, bestimmt. Die EC_{50} von PTHrP(1-34) wurde auf 31 nmol/l kalkuliert, die EC_{50} von PTHrP(1-16) auf 64 nmol/l.

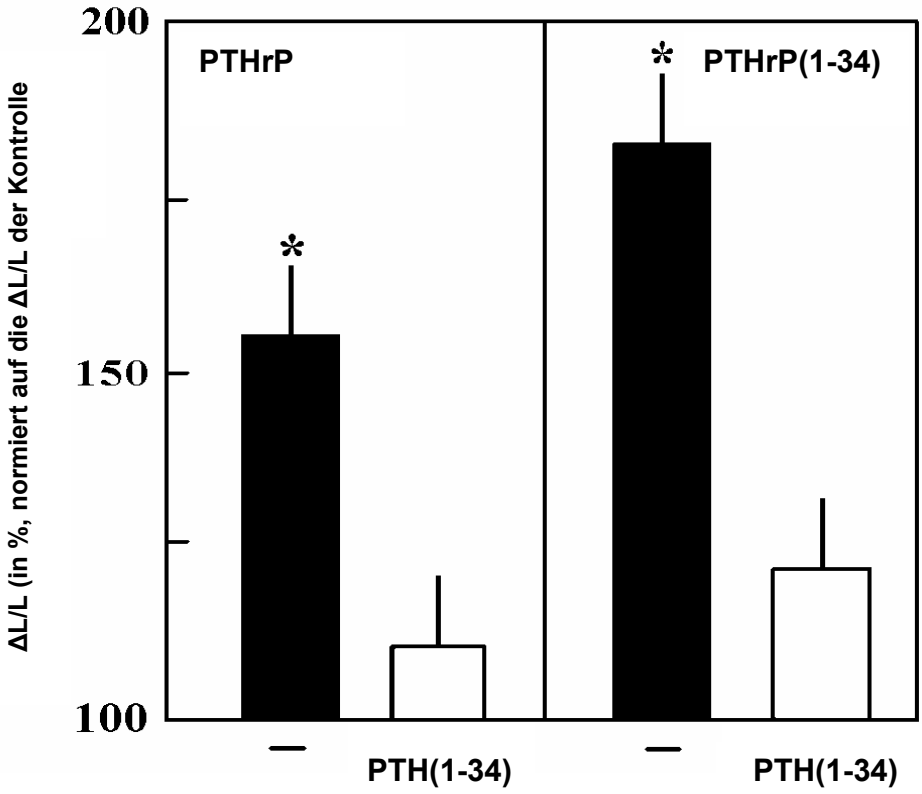
4.3 Inhibitorische Wirkung von PTH(1-34) auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16)

Es ist bekannt, dass PTH(1-34) die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34) an ventrikulären Herzmuskelzellen antagonisiert [30]. Es wurde jetzt untersucht, ob PTH(1-34) auch die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) antagonisiert.

4.3.1 Inhibitorische Wirkung von PTH(1-34) auf die kontraktile Wirkung von PTHrP und PTHrP(1-34)

Die Kulturschalen wurden entweder mit PTHrP oder mit PTHrP(1-34) inkubiert (jeweils 1 µmol/l). Einem Teil der Schalen wurde 5 Minuten vor Versuchsbeginn 1 µmol/l PTH(1-34) zugesetzt. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert, die kontraktile Wirkung wurde durch die Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge (ΔL/L in %) ausgedrückt.

Die Ergebnisse wurden in folgender Graphik zusammengefasst:



Bildunterschrift:
Abbildung 6 zeigt den Einfluß von PTH(1-34) auf die Wirkung von authentischem PTHrP und PTHrP(1-34). Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Die Zellen wurden entweder mit authentischem PTHrP (10 nmol/l) oder mit PTHrP(1-34) (1 µmol/l) inkubiert. Jeweils ein Teil der Zellen war mit PTH(1-34) (1 µmol/l) vorinkubiert worden (weiße Balken), der andere Teil nicht (schwarze Balken). Die Daten wurden aus den Mittelwerten $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte aus 12 Herzpräparationen gewonnen. Der 100%-Wert der Kontrollzellverkürzung entspricht einer ΔL/L von 5,1 $\pm$ 0,5 %.
* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrollen

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wirkung beider Peptide über den selben Rezeptor vermittelt wird.

4.3.2 Inhibitorische Wirkung von PTH(1-34) auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16)

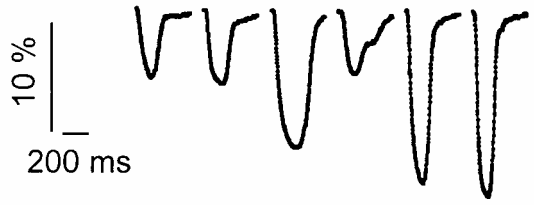
Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) wurden in einer Konzentration von 1 µmol/l verwendet, PTH(1-34) in einer Konzentration von 10 µmol/l.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	12	4,12 ± 0,25
PTH(1-34)	12	4,35 ± 0,44
PTHrP(1-34)	12	7,92 ± 1,50 *
PTHrP(1-34) + PTH(1-34)	12	3,67 ± 0,87
PTHrP(1-16)	12	8,67 ± 1,10 *
PTHrP(1-16) + PTH(1-34)	12	7,10 ± 0,62 *

* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrollen

Abbildung 7 zeigt noch einmal am Beispiel einiger Kontraktionskurven den Effekt von PTH(1-34) auf Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-34) oder PTHrP(1-16) inkubiert wurden:



PTH(1-34)	-	+	-	+	-	+
PTHrP(1-34)	-	-	+	+	-	-
PTHrP(1-16)	-	-	-	-	+	+

Bildunterschrift:
Abbildung 7 zeigt repräsentative Kontraktionskurven von Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-16) (1 µmol/l) oder mit PTHrP(1-34) (1 µmol/l) inkubiert wurden. Ein Teil dieser Zellen war 5 Minuten vorher mit PTH(1-34) (10 µmol/l) vorinkubiert worden. Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Welche Reagenzien die entsprechende Kurve der Graphik beeinflusst haben, ist aus den „+“-Zeichen unter den Kurven ersichtlich. An der vertikalen Achse ist die ΔL/L abzulesen.

Wie erwartet veränderte PTH(1-34) die Kontraktilität selber nicht, antagonisierte jedoch den Effekt des PTHrP(1-34). Die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) wurde durch PTH(1-34) nicht beeinflusst. Das spricht gegen die Möglichkeit, dass PTHrP(1-16) seine Wirkung vermittelt, indem es an einen kardialen PTHrP-Rezeptor bindet.

Da diese Ergebnisse vermuten ließen, dass PTHrP(1-16) seinen positiven kontraktilen Effekt über einen anderen Übertragungsweg als authentisches PTHrP und PTHrP(1-34) vermittelt, wurden weitere Experimente zur Aufdeckung der Wirkungsvermittlung von PTHrP(1-16) und zum Vergleich der kontraktilen Wirkungen von PTHrP(1-16) mit authentischem PTHrP und PTHrP(1-34) durchgeführt.

4.4 Wirkung von Rp-cycloAMPS auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16)

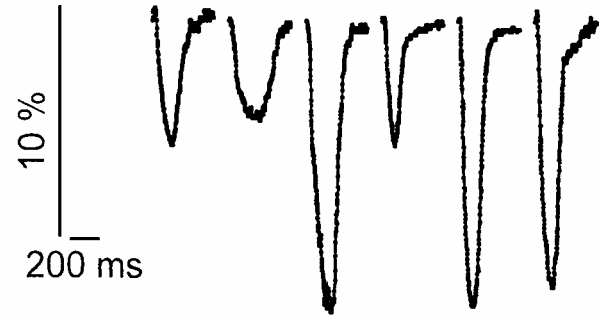
PTHrP(1-34) und PTHrP vermitteln ihre myokardiale Wirkung über die Aktivierung der Adenylatzyklase [28]. Es sollte nun getestet werden, ob die Adenylatzyklase auch in die Wirkungsvermittlung der PTHrP(1-16)-Stimulation eingebunden ist.
Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Zellen 5 Minuten vor Beginn des Experiments zum Teil mit Rp-cycloAMPS vorinkubiert. Rp-cycloAMPS ist ein kompetitiver Antagonist der cAMP-abhängigen Proteinkinase A.
Die Myokardzellen wurden wiederum mit 0,5 Hz stimuliert. Zugegeben wurden PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) jeweils in der Konzentration von 1 µmol/l, Rp-cyclicAMPS in der Konzentration von 10 µmol/l. Betrachtet wurde wiederum die relative Zellverkürzung ΔL/L.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	12	4,12 ± 0,25
Rp-cycloAMPS	12	5,55 ± 0,63
PTHrP(1-34)	12	7,92 ± 1,50 *
PTHrP(1-34) + Rp-cyclicAMPS	12	3,67 ± 0,87
PTHrP(1-16)	12	8,67 ± 1,10 *
PTHrP(1-16) + Rp-cycloAMPS	12	7,10 ± 0,62 *

***** p-Wert < 0,05 gegen die Kontrolle

Abbildung 8 zeigt noch einmal am Beispiel einiger Kontraktionskurven den Effekt von Rp-cyclicAMPS auf Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-34) oder PTHrP(1-16) inkubiert wurden.



Rp-cAMPS	-	+	-	+	-	+
PTHrP(1-34)	-	-	+	+	-	-
PTHrP(1-16)	-	-	-	-	+	+

Bildunterschrift:
Abbildung 8 zeigt repräsentative Kontraktionskurven von Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-16) (1 µmol/l) oder mit PTHrP(1-34) (1 µmol/l) inkubiert wurden. Ein Teil dieser Zellen war 5 Minuten vorher mit Rp-cycloAMPS (10 µmol/l) vorinkubiert worden. Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Welche Reagenzien die entsprechende Kurve der Graphik beeinflusst haben, ist aus den „+“-Zeichen unter den Kurven ersichtlich. An der vertikalen Achse ist die ΔL/L abzulesen.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass Rp-cycloAMPS wie erwartet selbst keine Wirkung auf das Kontraktionsverhalten der Zellen besitzt, jedoch in der Lage ist, den positiven kontraktilen Effekt des PTHrP(1-34) zu antagonisieren.
Die positive kontraktile Wirkung des PTHrP(1-16) wird aber offensichtlich nicht durch Rp-cycloAMPS beeinflusst. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von PTHrP(1-16) nicht über die Adenylatzyklase vermittelt wird.

4.5 Inhibitorische Wirkung von BQ123 auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b

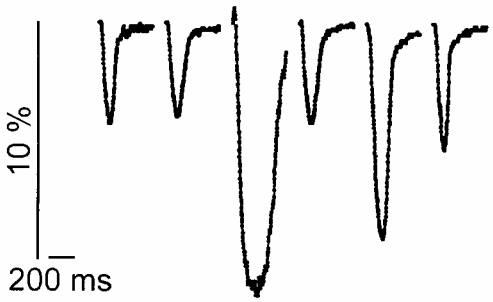
Wie schon in der Einleitung erwähnt besteht eine strukturelle Homologie zwischen PTHrP(1-16) und Endothelin. Es wurde untersucht, wie sich eine Antagonisierung des Endothelin-ET_A-Rezeptors auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) auswirkt.
Zu Kontrollzwecken wurden auch Versuche mit Sarafotoxin 6b durchgeführt, einem ET_A-Rezeptoragonisten.
Wiederum wurden die Zellen mit 0,5 Hz stimuliert und die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die Kontraktilität ermittelt. PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und BQ123 wurden in einer Konzentration von 1 µmol/l verwendet, Sarafotoxin 6b in einer Konzentration von 10 µmol/l. Wurde der ET_A-Blocker BQ123 verwendet, wurden die Schalen vor Versuchsbeginn 5 Minuten lang mit ihm vorinkubiert.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	12	4,88 ± 1,13
BQ123	12	4,51 ± 0,35
Sarafotoxin 6b	12	7,75 ± 0,31 *
Sarafotoxin 6b + BQ123	12	5,63 ± 0,44
PTHrP(1-16)	12	8,78 ± 0,50 *
PTHrP(1-16) + BQ123	12	3,63 ± 0,19
PTHrP(1-34)	12	7,88 ± 1,31 *
PTHrP(1-34) + BQ123	12	8,14 ± 1,42 *

* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrolle

Abbildung 9 zeigt noch einmal am Beispiel einiger Kontraktionskurven den inhibitorischen Effekt von BQ123 auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b.



BQ123	-	+	-	+	-	+
Sfx6b	-	-	+	+	-	-
PTHrP(1-16)	-	-	-	-	+	+

Bildunterschrift:
Abbildung 9 zeigt repräsentative Kontraktionskurven von Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-16) (1 µmol/l) oder Sarafotoxin 6b (10 µmol/l) inkubiert wurden. Ein Teil dieser Zellen war 5 Minuten vorher mit BQ123 (1µmol/l) vorinkubiert worden. Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Welche Reagenzien die entsprechende Kurve der Graphik beeinflusst haben, ist aus den „+“-Zeichen unter den Kurven ersichtlich. An der vertikalen Achse ist die ΔL/L abzulesen

Man erkennt, dass BQ123 weder selber das Kontraktionsverhalten der Zellen beeinflusst, noch den kontraktilen Effekt von PTHrP(1-34) antagonisiert. Es antagonisiert jedoch die Wirkung von PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b. Dies ist ein Hinweis darauf, das PTHrP(1-16) seine Wirkung über den ET_A-Rezeptor vermittelt.

4.6 Inhibitorische Wirkung von β_1 -Antagonisten auf die kontraktile Wirkung von PTHrP, PTHrP(1-16) und Isoprenalin

4.6.1 Inhibitorische Wirkung von Atenolol auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Isoprenalin

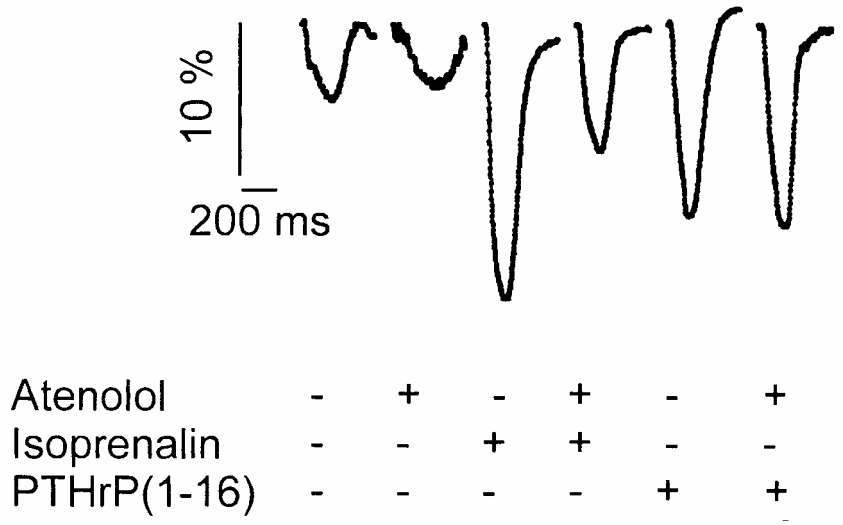
Weiterhin wurde der Einfluß von β_1-Adrenorezeptor-Antagonisten auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) untersucht. Als β_1-Adrenorezeptor-Antagonist diente Atenolol, welches in einer Konzentration von 10 µmol/l verwendet wurde. Wurden Experimente mit Atenolol durchgeführt, wurde die Schale 5 Minuten vor Experimentbeginn mit Atenolol vorinkubiert. Zu Kontrollzwecken wurde ebenfalls Isoprenalin als β_1-Adrenorezeptor-Agonist in der Konzentration von 1 µmol/l verwendet. PTHrP(1-16) wurde in der Konzentration von 1 µmol/l verwendet. Die Zellen wurden mit 0,5 Hz stimuliert und die relative Zellverkürzung ΔL/L als Maß für die Kontraktilität ermittelt.

Folgenden Ergebnisse wurden erlangt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	12	4,88 ± 1,17
Atenolol	12	5,33 ± 0,64
Isoprenalin	12	12,24 ± 2,98 *
Isoprenalin + Atenolol	12	5,46 ± 0,85
PTHrP(1-16)	12	9,10 ± 1,16 *
PTHrP(1-16) + Atenolol	12	9,21 ± 0,19 *

* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrolle

Abbildung 10 zeigt noch einmal am Beispiel einiger Kontraktionskurven den Effekt von Atenolol auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Isoprenalin.



Bildunterschrift:
Abbildung 10 zeigt repräsentative Kontraktionskurven von Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-16) (1 µmol/l) oder Isoprenalin (1 µmol/l) inkubiert wurden. Ein Teil dieser Zellen war 5 Minuten vorher mit Atenolol (1µmol/l) vorinkubiert worden. Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Welche Reagenzien die entsprechende Kurve der Graphik beeinflusst haben, ist aus den „+“-Zeichen unter den Kurven ersichtlich. An der vertikalen Achse ist die ΔL/L abzulesen.

Es stellte sich heraus, dass Atenolol selbst das Kontraktionsverhalten nicht signifikant beeinflusst, jedoch die positive kontraktile Wirkung von Isoprenalin abblockt. Die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) wird durch die Anwesenheit von Atenolol nicht antagonisiert.
Die Ergebnisse sprechen für verschiedene Übermittlungswege von Isoprenalin und PTHrP(1-16).

4.6.2 Inhibitorische Wirkung von Propranolol auf die kontraktile Wirkung von PTHrP und Isoprenalin

Auch der Einfluß subtypunspezifischer β-Adrenorezeptor-Antagonisten auf die kontraktile Wirkung von authentischem PTHrP wurde untersucht. Als β-Adrenorezeptor-Antagonist diente das Propranolol in einer Konzentration von 1 µmol/l. Wurde ein Experiment mit ihm durchgeführt, wurde die Schale 5 Minuten vor Versuchsbeginn mit Propranolol vorinkubiert. PTHrP wurde in einer Konzentration von 1 µmol/l verwendet, Isoprenalin zur Positivkontrolle in einer Konzentration von 100 nmol/l.
Die Zellen wurden mit 0,5 Hz stimuliert und die relative Zellverkürzung ΔL/L als Maß für die Kontraktilität verwendet.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

	n	**ΔL/L [%]**
Isoprenalin	12	12,24 ± 2,98
Isoprenalin + Propranolol	8	5,46 ± 1,85
PTHrP	12	9,10 ± 1,16
PTHrP + Propranolol	12	9,21 ± 0,06

Aus einem Vergleich der beiden Gruppen „Isoprenalin“ und „Isoprenalin + Propranolol“ ist ersichtlich, dass die bekannte positive kontraktile Wirkung von Isoprenalin durch Propranolol antagonisiert wird (p-Wert < 0,01). Ein Vergleich zwischen den Gruppen „PTHrP“ und „PTHrP + Propranolol“ führt zu der Erkenntnis, dass der kontraktile Effekt des PTHrP nicht durch Propranolol antagonisiert wird.
Die Ergebnisse sprechen für verschiedene Übertragungswege der PTHrP-Wirkung und der Isoprenalin-Wirkung.

4.7 Inhibitorische Wirkung von α-Antagonisten auf die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Phenylephrin

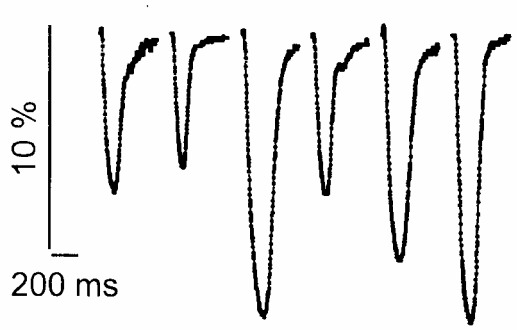
Außerdem wurde der Einfluß von α-Adrenorezeptor-Antagonisten auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) untersucht. Als α-Adrenorezeptor-Antagonist diente Prazosin, welches in einer Konzentration von 10 µmol/l verwendet wurde. Wurden Experimente mit Prazosin durchgeführt, wurde die Schale 5 Minuten vor Experimentbeginn mit Prazosin vorinkubiert. Zu Kontrollzwecken wurde Phenylephrin als α-Adrenorezeptor-Agonist in der Konzentration von 10 µmol/l verwendet. PTHrP(1-16) wurde in der Konzentration von 1 µmol/l verwendet.
Die Zellen wurden mit 0,5 Hz stimuliert und die relative Zellverkürzung ΔL/L als Maß für die Kontraktilität verwendet.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	12	5,96 ± 0,81
Prazosin	12	4,88 ± 1,13
Phenylephrin	12	9,65 ± 0,31 *
Phenylephrin + Prazosin	12	6,39 ± 0,44
PTHrP(1-16)	12	8,81 ± 0,50 *
PTHrP(1-16) + Prazosin	12	8,23 ± 0,21 *

* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrolle

Abbildung 11 zeigt noch einmal am Beispiel einiger Kontraktionskurven den Effekt von Prazosin auf die kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) und Phenylephrin.



Bildunterschrift:
Abbildung 11 zeigt repräsentative Kontraktionskurven von Kardiomyozyten, die mit PTHrP(1-16) (1µmol/l) oder Phenylephrin (10 µmol/l) inkubiert wurden. Ein Teil dieser Zellen war 5 Minuten vorher mit Prazosin (10 µmol/l) vorinkubiert worden. Die Zellen wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Welche Reagenzien die entsprechende Kurve der Graphik beeinflusst haben, ist aus den „+“-Zeichen unter den Kurven ersichtlich. An der vertikalen Achse ist die ΔL/L abzulesen

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass Prazosin selbst das Kontraktionsverhalten nicht signifikant beeinflusst, jedoch die positive kontraktile Wirkung von Phenylephrin abblockt. Die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) wird durch die Anwesenheit von Prazosin nicht abgeblockt.
Die Ergebnisse sprechen für verschiedene Übermittlungswege von Phenylephrin und PTHrP(1-16).

4.8 Kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Isoprenalin während der Exposition und nach dem Auswaschen

Es ist bekannt, dass Endothelin über die Bindung an den ET_A-Rezeptor eine postitive kontraktile Wirkung entfalten kann, die weiter anhält, auch wenn der Rezeptor-Agonist schon ausgewaschen worden ist. Dagegen verschwindet der positive kontraktile Effekt von β_1-Rezeptor-Agonisten, die ihre Wirkung über eine Aktivierung der Adenylatzyklase vermitteln, nach dem Auswaschen des Agonisten.
Es sollte getestet werden, ob sich die positive kontraktile Wirkungen von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) nach dem Auswaschen verlieren.
Zu diesem Zweck wurden die Kardiomyozyten mit 0,5 Hz stimuliert und die relative Zellverkürzung ΔL/L als Maß für die Kontraktilität verwendet. PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Isoprenalin wurden in einer Konzentration von 1 µmol/l verwendet.
Die zu untersuchenden Kulturschalen wurden zunächst wie unter 3.3.1 beschrieben vorbereitet. In den Schalen, in denen die Wirkung nach dem Auswaschen untersucht werden sollte, wurde nach einer Einwirkzeit der Reagenz von 5 Minuten der Zellkontraktionspuffer und die darin enthaltene Reagenz abgesaugt. Danach wurden wiederum 3 ml Zellkontraktionspuffer zugesetzt und 15 Minuten abgewartet, bevor die Schale ausgemessen wurde.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

	n	ΔL/L [%]
Kontrolle	12	6,12 ± 1,25
PTHrP(1-34)	12	11,18 ± 1,44 *
PTHrP(1-34) 15 Minuten nach dem Auswaschen	12	12,74 ± 1,16 *
PTHrP(1-16)	12	11,26 ± 2,44 *
PTHrP(1-16) 15 Minuten nach dem Auswaschen	12	11,97 ± 1,50 *
Isoprenalin	12	14,83 ± 2,87 *
Isoprenalin 15 Minuten nach dem Auswaschen	12	7,14 ± 1,13

* p-Wert < 0,05 gegen die Kontrolle

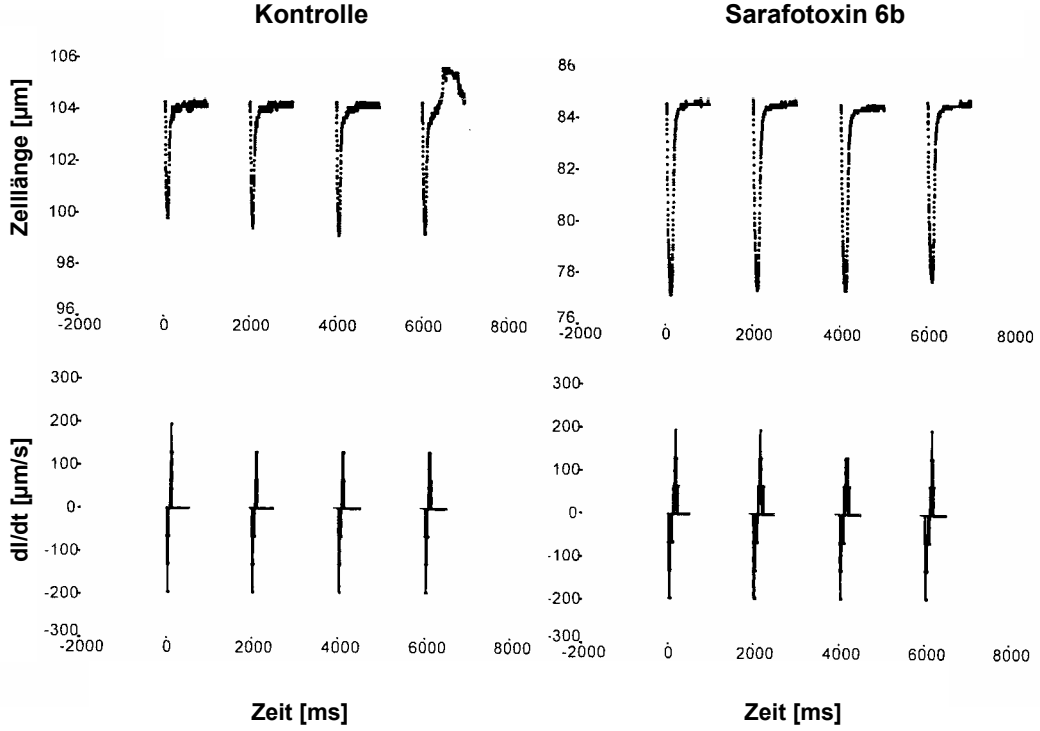
Es war ersichtlich, das die positive kontraktile Wirkung von Isoprenalin durch das Auswaschen aufgehoben wurde, während die positiven kontraktilen Effekte von PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) nicht beeinflusst wurde, was für verschiedene Wirkmechanismen von Isoprenalin einerseits und PTHrP(1-34) und PTHrP(1-16) andererseits spricht.

4.9 Kontraktile Wirkung von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b

Die bisher erzielten Ergebnisse wiesen auf eine Wirkungsvermittlung des Effektes von PTHrP(1-16) über den ET_A-Rezeptor hin. Es sollte nun untersucht und verglichen werden, inwieweit PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b Einfluss auf die Kinetik der Zellkontraktionen nehmen.

Die Myokard-Zellen wurden bei einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert. Folgende Parameter wurden erhoben: Zelllänge, Zellverkürzung, ΔL/L, Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (Time to Peak / TTP), die Con_{max} als Ratenkonstante für die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit, die Rel_{max} als Ratenkonstante für die maximale Relaxationsgeschwindigkeit und die Zeit von maximaler Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzungsstrecke ($R_{90\%}$). Die so gewonnenen Parameter wurden mit den entsprechenden Parametern der Kontrollen verglichen.
Als Reagenzien wurden PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b zugesetzt.

Abbildung 12 zeigt einige repräsentative Kontraktionskurven, die die Wirkung von Sarafotoxin 6b auf Kardiomyozyten veranschaulichen sollen:



Bildunterschrift:
Abbildung 12 zeigt einzelne beispielhafte Kontraktionskurven von mit 0,5 Hz stimulierten Myokardzellen. Die Kontrollzellen wurden nicht vorbehandelt, die anderen Zellen mit Sarafotoxin 6b vorinkubiert. Die oberen Graphen zeigen die Zelllängenänderung im zeitlichen Verlauf der Kontraktion, die unteren Graphen die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit im zeitlichen Verlauf der Kontraktion.

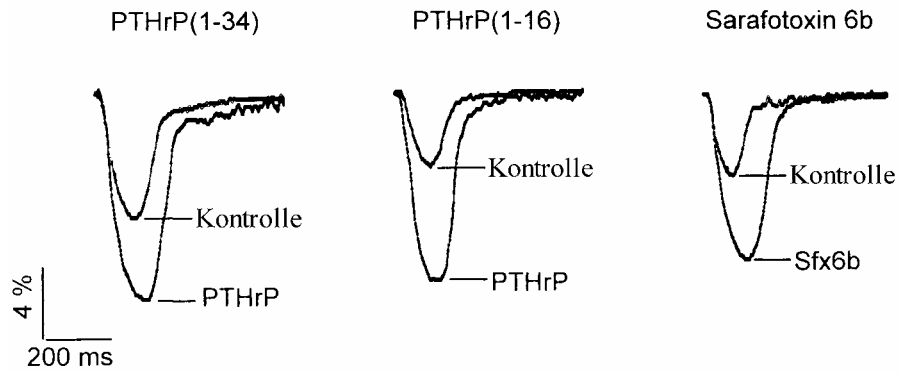
In den Experimenten wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

	n	Konz. [µmol/l]	Zelllänge [µm]	Zellverkürzung [µm]	ΔL/L [%]	TTP [ms]	Con_{max} [s^{-1}]	R_{90} [ms]	Rel_{max} [s^{-1}]
Kontrolle	36	-	106,74 ± 26,69	5,69 ± 0,77	5,33 ± 0,72	162 ± 6	25,13 ± 2,64	203 ± 7	20,74 ± 2,28
PTHrP(1-34)	12	1	102,45 ± 35,41	8,25 ± 1,19 *	8,05 ± 1,16 *	116 ± 9*	32,97 ± 5,70 *	154 ± 23 *	26,91 ± 2,91 *
PTHrP(1-16)	12	1	114,41 ± 26,31	10,24 ± 1,26 *	8,95 ± 1,10 *	137 ± 5	22,46 ± 2,83	192 ± 2	19,04 ± 0,39
Sarafotoxin 6b	12	10	110,74 ± 22,15	9,06 ± 2,43 *	8,18 ± 2,19 *	152 ± 7	24,83 ± 1,55	186 ± 11	21,41 ± 1,55

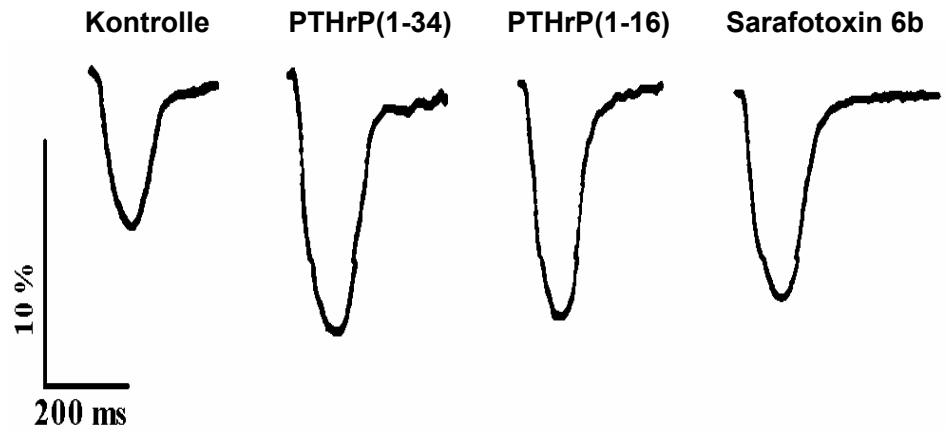
***** p-Wert < 0,05 gegen die Kontrollen.

Aus der Tabelle geht hervor, dass PTHrP(1-34) die Kontraktilität (ausgedrückt durch die Parameter Zellverkürzung und ΔL/L) steigert, sowie die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (TTP), die Con_{max}, die Rel_{max} und die $R_{90\%}$ (Zeit bis zur 90%igen Kontraktion) verkürzt. PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b steigerten die Kontraktionsparameter, ohne die Kinetik der Kontraktion zu beeinflussen.

Abbildungen 13 und 14 sollen den Einfluss von PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b auf die ΔL/L veranschaulichen:



Bildunterschrift:
Abbildung 13 zeigt repräsentative Kontraktionskurven einzelner Zellen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Den Kontrollen wurden keine weiteren Reagenzien zugesetzt. Die übrigen Zellen wurden mit PTHrP(1-34) (1 µmol/l), PTHrP(1-16) (1 µmol/l) oder Sarafotoxin 6b (10 µmol/l) vorinkubiert. Der horizontale Balken zeigt die Zeit, der vertikale Balken zeigt die ΔL/L.



Bildunterschrift:
Abbildung 14 zeigt ebenfalls repräsentative Kontraktionskurven einzelner Zellen. Die Kardiomyozyten wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz stimuliert. Den Kontrollen wurden keine weiteren Reagenzien zugesetzt. Die übrigen Zellen wurden mit PTHrP(1-34) (1 µmol/l), PTHrP(1-16) (1 µmol/l) oder Sarafotoxin 6b (10 µmol/l) vorinkubiert. Der horizontale Balken zeigt die Zeit, der vertikale Balken zeigt die ΔL/L.

Zusammenfassend kann man sagen, dass PTHrP(1-34), PTHrP(1-16) und Sarafotoxin 6b in etwa die gleiche maximale Wirkungsstärke besitzen. Aber nur PTHrP(1-34) war in der Lage, die Kinetik der Kontraktion zu verändern. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass PTHrP(1-16) seinen Effekt über den ET_A-Rezeptor vermittelt.

5. Kapitel: Diskussion

5.1 Die Wirkung von PTHrP und PTHrP(1-34) auf Kardiomyozyten der Ratte

Authentisches PTHrP wurde für diese Arbeit aus dem Kulturüberstand energieverarmter koronarer Endothelzellen der Ratte gewonnen [21,22]. Die Aufreinigung des Hormons erfolgte durch Immunpräzipitation. Dazu wurden Antikörper benutzt, die gegen eine mittlere Region des PTHrP gerichtet waren und deshalb intaktes und nicht durch Proteasen gespaltenes PTHrP detektieren. Wurden die durch die Immunpräzipitation erhaltenen Proteinlösungen im Immunoblot analysiert, so fand sich eine einzelne Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 50 000 Dalton. Das kalkulierte Gewicht für ein Protein mit 141 Aminosäuren liegt etwa bei 16 000 Dalton. Die Differenz zwischen authentischem endothelialen PTHrP und dem aufgrund seiner Primärstruktur berechneten Molekulargewicht erklärt sich durch posttranslationale Modifikation (Glykosylierung) [27,42]. In fast allen vorherigen Arbeiten waren zur Untersuchung des Effekts von PTHrP auf Kardiomyozyten synthetische, nicht glykosylierte Teilpeptide verwendet worden. Man weiß aufgrund dieser vorherigen Arbeiten, dass PTHrP-Fragmente, die den N-terminalen Teil des Peptids besitzen, in der Lage sind, an einen kardialen PTH/PTHrP-Rezeptor zu binden und auf diesem Weg die Adenylatzyklase zur Bildung von cAMP als second messenger für die Wirkungsvermittlung zu aktivieren [30,31]. Da in dieser Arbeit synthetische PTHrP-Teilpeptide zur weiteren Charakterisierung der für die kontraktile Wirkung essentiellen Sequenzabschnitte verwendet werden sollten, wurde zunächst überprüft, inwieweit sich synthetische Teilpeptide mit biologischer Aktivität in ihren Eigenschaften von authentischem PTHrP unterscheiden.

Zunächst wurde also der Effekt von PTHrP auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit lassen darauf schließen, dass PTHrP neben seiner bekannten und in dieser Arbeit noch einmal nachgewiesenen positiven kontraktilen Wirkung auch die Kontraktionskinetik beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass PTHrP die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (Rel_{max}) erhöht und die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90% der Zellverkürzugsstrecke (R_{90}) verkürzt. PTHrP übt demnach einen lusitropen Effekt aus.

Die positiv kontraktile und lusitrope Wirkung konnte auch für synthetisches PTHrP(1-34) nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen synthetischem und authentischem PTHrP ergab sich in den Konzentrationswirkungskurven. Authentisches PTHrP erwies sich als potenter als synthetisches PTHrP mit einer Linksverschiebung der Konzentrationswirkungskurven um etwa eine 10er Potenz.

Obwohl das immunpräzipitierte Material rein erschien, da in der Elektrophorese nur eine einzelne Bande zu sehen war, kann man nicht ausschließen, dass die PTHrP-Lösungen mit kleinen Mengen anderer Proteine verunreinigt waren, so dass der Gehalt an PTHrP in der Lösung überschätzt worden war. Sollte dies der Fall gewesen sein, wäre die Dosis-Wirkungs-Kurve von PTHrP noch weiter nach links verschoben.

Die Wirkung von PTHrP und PTHrP(1-34) konnte durch PTH(1-34) abgeblockt werden. Es ist bekannt, dass PTHrP und PTH aufgrund ihrer Homologie an die gleichen Rezeptoren klassischer PTH/PTHrP-Zielzellen (z.B. Knochenzellen) binden und dort die Adenylatzyklase auf ähnliche Weise aktivieren [7,28]. Die aktive Domäne, die diese Wirkung übermittelt, wurde im Bereich der Aminosäuren 1 bis 6 lokalisiert [7,28]. An dieser Position ähneln sich die beiden Peptide. Ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte, die ebenfalls Zielzellen für PTH und PTHrP sind, bilden eine Ausnahme. Zwar binden sowohl PTH als auch PTHrP an einen Rezeptor der Kardiomyozyten der Ratten, aber nur PTHrP aktiviert hier die Adenylatzyklase [27,29], während PTH, aber nicht PTHrP, die PKC aktiviert [33]. Damit kann PTH als Antagonist für die positive kontraktile Wirkung von PTHrP verwendet werden [18,30,33].

Da die positive kontraktile Wirkung von PTHrP und PTHrP(1-34) durch PTH gehemmt wurde, ist davon auszugehen, dass beide PTHrP-Formen an den gleichen Rezeptortyp binden.

5.2 Die Wirkungen von PTHrP(1-16) und PTHrP(1-34) auf Kardiomyozyten der Ratte

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch C-terminale Verkürzung des biologisch aktiven Teilpeptides PTHrP(1-34) die für die positiv kontraktile Wirkung des PTHrP essentiellen strukturellen Bestandteile des Peptidhormons genauer zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst mit PTHrP(1-16) gearbeitet, welches keine Wirkung auf die klassischen PTH-Zielzellen ausübt, da es nicht die Rezeptorbindungsdomäne 18 bis 32 repräsentiert [13,16].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein positiver kontraktiler Effekt des PTHrP(1-16) auf Kardiomyozyten von Ratten beschrieben. Dieser Effekt scheint der positiven kontraktilen Wirkung von PTHrP(1-34) zu ähneln, aber der Mechanismus der Wirkungsvermittlung von PTHrP(1-16) und PTHrP(1-34) scheint offensichtlich grundverschieden zu sein. Für diesen Unterschied sprechen folgende Beobachtungen:

PTH(1-34) antagonisiert den positiven kontraktilen Effekt von PTHrP(1-16) nicht, jedoch den des PTHrP(1-34). Rp-cyclicAMPS, ein Antagonist der Adenylatzyklase, ist in der Lage, die adenylatzyklasenabhängige Wirkungsvermittlung von PTHrP(1-34) abzublocken, hat aber keinen Einfluss auf den Effekt von PTHrP(1-16). PTHrP und PTHrP(1-34) verändern die Kontraktionskinetik, PTHrP(1-16) verändert die Kontraktionskinetik nicht. Dies alles lässt darauf schließen, dass PTHrP(1-16) auf Kardiomyozyten über einen anderen Rezeptor als PTHrP(1-34) wirkt.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung verschiedener Rezeptoren der Kardiomyozyten zu einer positiven kontraktilen Wirkung führt. Die Struktur von PTHrP ähnelt in gewisser Weise der Struktur von Endothelin (siehe 1.8). Endothelin übt auf Kardiomyozyten ebenfalls einen positiven kontraktilen Effekt aus [10,15]. Es wurde deshalb die Hypothese verfolgt, dass PTHrP(1-16) an den ET_A-Rezeptor bindet und ihn aktiviert. Dafür sprechen auch folgende Beobachtungen dieser Arbeit:

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Sarafotoxin 6b, ein bekannter ET_A-Endothelin-Rezeptor-Agonist, auf ventrikuläre Kardiomyozyten von Ratten den gleichen Effekt wie PTHrP(1-16) hat. Die systolische Zellverkürzung wurde durch Sarafotoxin 6b in der gleichen Weise wie durch PTHrP(1-16) gesteigert. Auch Sarafotoxin 6b veränderte wie PTHrP(1-16) nur die Zellverkürzung, nicht aber die anderen Kontraktionsparameter, wie dies PTHrP(1-34) tat. Wurde der ET_A-Endothelin-Rezeptor mit BQ123 antagonisiert, so wurden die positiven kontraktilen Effekte von Sarafotoxin 6b und PTHrP(1-16) abgeblockt, während der positive kontraktile Effekt von PTHrP(1-34) nicht beeinflusst wurde. Frühere Studien, die den positiven kontraktilen Effekt von Endothelin beschreiben, fanden keine Anzeichen für eine Änderung der Kontraktionskinetik durch Endothelin. In diesen Studien wurde gezeigt, dass Endothelin weder die Zeit vom Beginn der Systole bis zur maximalen Zellverkürzung, noch die Zeit vom Beginn der Diastole bis zur 50%-igen Relaxation verkürzt [10,15]. Die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) wurde nicht wie diejenigen von Isoprenalin durch Auswaschen des Hormons beendet. Diese Auswaschbarkeit ist typisch für Hormone, die ihre Wirkung über die Aktivierung der Adenylatzyklase vermitteln, wie zum Beispiel die Katecholamine (allerdings wurde auch die Wirkung von PTHrP(1-34) nicht ausgewaschen). Die Wirkungspersistenz von PTHrP(1-16) ist auch für Endothelin charakteristisch [15]**.** Die positive kontraktile Wirkung von PTHrP(1-16) konnte weder durch den α-Adrenorezeptor-Antagonisten Prazosin, noch durch den β_1-Adrenorezeptor-Antagonisten Atenolol aufgehoben werden. Dies spricht gegen eine unspezifische Rezeptorstimulation von PTHrP(1-16).

5.3 Interpretation der Ergebnisse

Mit dieser Arbeit war unter anderem das Ziel verfolgt worden, mehr über die Struktur und die Positionen der aktiven Domänen im PTHrP-Molekül zu erfahren. Die Erkenntnis, dass PTHrP-Fragmente ohne die nötige Rezeptor-Bindungs-Domäne in der Lage sind, mit anderen Rezeptorsystemen Bindungen einzugehen und sie zu aktivieren, ist für zukünftiges Peptid-Design von Bedeutung.

Auch die physiologische und pathophysiologische Rolle des PTHrP muss neu überdacht werden: Endothelzellen der Koronararterie der Ratte geben unter hypoxischen oder energieverarmenden Bedingungen PTHrP ab. Man nimmt an, dass PTHrP in der frühen Phase der Reperfusion des Herzens die vaskuläre und kontraktile Funktion beeinflusst. Ein positiv inotroper Effekt des PTHrP könnte dazu beitragen, die Herzmuskulatur nach der Reperfusion wieder zur Aufnahme seiner Arbeit anzuregen [27].

In vivo wird PTHrP durch Proteasen zu Peptidfragmenten abgebaut, wodurch kleine N-terminale Peptidfragmente ohne Bindungsdomäne für den PTH/PTHrP-Rezeptor entstehen könnten. Obwohl bis jetzt noch kein Nachweis von PTHrP-Spaltprodukten im Perfusat von Herzen erbracht worden ist, hat die vorliegende Arbeit doch gezeigt, dass solche Spaltprodukte in der Lage sind, mit anderen Rezeptoren wie dem ET_A-Rezeptor zu interagieren.

PTHrP(1-34) wurde in dieser Arbeit in einer Konzentration verwendet, die etwa derjenigen entsprach, in der PTHrP verwendet wurde, um die Effekte von PTHrP auf klassische PTH/PTHrP-Zielzellen, wie zum Beispiel Osteoblasten, zu untersuchen. Die Konzentration dieses synthetischen PTHrP(1-34) entsprach damit der Konzentration, die normalerweise bei der Untersuchung von in-vitro-Systemen angewendet wird. Es wurde aber auch gezeigt, dass die koronaren Endothelzellen, die wohl den Hauptteil des PTHrP produzieren, welches auf die ventrikulären Myokardzellen wirkt, ein posttranslational modifiziertes, sprich glykosyliertes, PTHrP exprimieren, dessen biologische Wirksamkeit annähernd 10 mal höher ist als die des synthetischen PTHrP(1-34) [27]. In in-vitro-Systemen sind Endothelzellen in der Lage, 2,6 pg PTHrP pro Milligramm und pro Stunde zu sezernieren [26].

Der Mechanismus, über den PTHrP(1-34) seine Wirkung vermittelt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da PTHrP(1-34) aber wie authentisches PTHrP durch PTH(1-34) antagonisiert wird, ist anzunehmen, dass auch PTHrP(1-34) an einen kardialen Subtyp des PTH/PTHrP-Rezeptors bindet und auf diese Weise seine Wirkung entfaltet.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten auch darauf hin, dass es nicht möglich ist, N-terminale PTHrP-Fragmente wie das PTHrP(1-34) noch weiter vom C-terminalen Ende her zu deletieren, da diese Peptide ansonsten ihre Bindungs- und Aktivierungs-Domäne für den kardialen PTH/PTHrP-Rezeptor verlieren und statt dessen mit anderen Rezeptoren reagieren, wie zum Beispiel mit dem ET_A-Rezeptor. Sollten zukünftig weitere PTHrP-Fragmente synthetisch hergestellt werden, ist darauf zu achten, dass sie die typischen Bindungs- und Aktivierungs-Domänen enthalten.

Bis jetzt ist wenig über die physiologische und pathophysiologische Rolle des PTHrP im kardiovaskulären System bekannt. Wie bereits weiter oben erwähnt, wird PTHrP von koronaren Endothelzellen unter hypoxischen und energieverarmenden Bedingungen sezerniert. Daher kann man vermuten, dass es in der frühen Phase der Reperfusion des Herzens die vaskuläre und kontraktile Funktion beeinflusst. Der positive inotrope Effekt des PTHrP könnte dazu beitragen, die Herzmuskulatur nach der Reperfusion wieder zur Aufnahme seiner Arbeit anzuregen. Der vasodilatorische Effekt des PTHrP mag in der reaktiven Hyperämie nach Ischämie des Herzens eine Rolle spielen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse auf folgendes hinweisen:

Ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten sind physiologische Zielzellen für das von koronaren Endothelzellen parakrin sezernierte PTHrP. Dieses authentische PTHrP spielt eine Rolle in der Reperfusion vormals ischämischer Myokardbezirke, indem es eine positive kontraktile und eine vasodilatorische Wirkung entfaltet. Das synthetisch hergestellte PTHrP(1-34) entfaltet am Herzen die gleiche Wirkung über den gleichen Wirkmechanismus, besitzt aber aufgrund seiner fehlenden Glykolysierung eine geringere biologische Potenz als authentisches PTHrP. PTHrP(1-16) besitzt nicht die Bindungsdomäne für den kardialen PTH/PTHrP-Rezeptor, bindet jedoch an den ET_A-Endothelin-Rezeptor und vermittelt über ihn eine positive kontraktile Wirkung, ohne jedoch die Kontraktionskinetik zu verändern.

6. Kapitel: Literatur

[1] Bui TD, Shallal A, Malik AN, Al-Mahdawi S, Moscoso G, Bailey MES, Burton PBJ, Moniz C. Parathyroid hormone related peptide gene expression in human fetal and adult heart. Cardiovasc Res 1993;27:1204-1208.

[2] Burton DW, Brandt DW, Deftos LJ. Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system. Endocrinology 1994;135:253-261.

[3] Collin JB, Clark P. Further studeis on the physiological action of a parathyroid hormone. J Biol Chem 1925;64:133-137.

[4] Dowe JP, Joshua IG. In vivo arteriolar dilation in response to parathyroid hormone fragments. Peptide 1987;8:443-448.

[5] Endlich K, Massfelder T, Helwig JJ, Steinhausen M. Vascular effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. J Physiol 1995;483:481-490.

[6] Fenton, A, Kemp BE, Hammonds RG Jr., Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, Nicholson GC. A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone-related protein; PTHrP[107-111]. Endocrinology 1991;129:3424-3426.

[7] Hara M, Liu YM, Zhen L, Cohen IS, Yu H, Danilo P Jr., Ogino K, Bileikian JP, Rosen MR. Positve chronotropic actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are associated with increases in the currrent, I(f), and the slope of the pacemaker potential. Circulation 1997;96:3704-3709.

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

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

[10] Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. Am J Physiol 1988;255:H970-H973.

[11] Jousihomme H, Whitfield JF, Gagnon L, MacLean S, Isaacs R, Chakravarthy B, Durkin J, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH. Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone. J Bone Min Res 1994;9:943-949.

[12] Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT, Kronenberg HM, Segre GV. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. Science 1991;254:1024-1026.

[13] Kemp BE, Moseley JM, Rodda CP, Ebeling PR, Wettenhall REH, Stapleton D, Diefenbach-Jagger H, Ure F, Michelangali VP, Simmons HA, Raisz LG, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein of malignancy: Active synthetic fragments. Science 1987;238:1568-1570.

[14] McGowan JA, Chen TC, Fragola J, Puschett JB, Rosenblatt M. Parthyroid hormone: effects of the 3-34 fragment in vivo and vitro. Science 1983;219:67-69.

[15] Mebazza A, Mayoux E, Maeda K, Martin LD, Lakatta EG, Robotham JL, Shah AM. Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. Am J Physiol 1990;265:H1841-H1846.

[16] Musso MJ, Plante M, Judes C, Barthelmebs M, Helwig JJ. Renal vasodilatation and microvessel adenylate cyclase stimulation by synthetic parathyroid hormone-like protein fragments. Eur J Pharmacol 1989;174:139-151.

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

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

[19] Nickols GA. Increased cyclic AMP in cultured vascular smooth muscle cells and relaxation of aortic strips by parathyroid hormone . Europ J Pharmacol 1985;116:137-144.

[20] Pang PKT, Tenner TE Jr., Yee JA, Yang M, Janssen HF. Hypotensive action of parathyroid hormone preparations on rats and dogs. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:675-678.

[21] Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hitter JF, Spieckermann PG. Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 1982;14:397-412.

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

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

[24] Potts JT Jr., Kronenberg HM, Rosenblatt M. Parathyriod hormone: chemistry, biosynthesis, and mode of action. Adv Protein Chem 1982;35:323-396.

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

[26] Schlüter K-D, Katzer C, Piper HM. A N-terminal PTHrP peptide fragment void of a PTH/PTHrP-receptor binding domain activates cardiac ET_A receptors. Britisch Journal of Pharmacology 2001;132:427-432.

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

[28] Schlüter K-D. PTH and PTHrP: Similar structures but different functions. News Physiol Sci 1999;14:243-249

[29] Schlüter K-D, Piper HM Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. Cardiovasc Res 1998;37:34-41.

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

[31] Schlüter K-D, Wingender E, Tegge W, Piper HM. Parathyroid hormone-related peptide antagonizes the action of parathyroid hormone on adult cardiomyocytes. J Biol Chem 1996;271:3074-3078.

[32] Schlüter K-D, Millar BC, McDermott BJ, Piper HM. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. Am J Physiol 1995;296:C1347-C1355.

[33] Schlüter K-D, Weber M, Piper HM. Parathyroid hormone induces protein kinase C but not adenylate cyclase in adult cardiomyocytes and regulates cyclic AMP levels via protein kinase C-dependent phosphodiesterase activity. Biochem J 1995;310:439-444.

[34] Schlüter K-D, Piper HM. Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. Am J Physiol 1992;261:H1945-H1950.

[35] Schlüter K-D, Hellstern H, Wingender E, Mayer H. The central part of parathyroid hormone stimulates thymidine incorporation of chondrocytes. J Biol Chem 1989;264:11087-11092.

[36] Schweitzer DH, Löwik CWGM, van der Laarse A. Effects of bPTH(1-84) and PTH-rP(1-34) on intracellular calcium concentration (Ca_i^{2+}) of rat heart cells. J Endocrinol Invest 1991;14(Suppl.3):53.

[37] Shan J, Pang PKT, Lin H-C, Yang MCM. Cardiovascular effects of human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. J Cardiovasc Pharmacol 1994;23:S38-S41.

[38] Takahashi K, Inoue D, Ando K, Matsumoto T, Ikeda K, Fujita T. Parathyroid hormone-related peptide as a locally produced vasorelaxant: Regulation of its mRNA by hypertension in rats. Biochem Biophys Res Commun 1995;208:447-445.

[39] Wang R, Wu L, Karpinski E, Pang PKT. The effect of parathyroid hormone on L-type voltage-dependent calcium channel currents in vascular smooth muscle cells and ventricular myocytes are mediated by a cyclic AMP dependent mechanism. FEBS Lett 1991;282:331-334.

[40] Wang R, Karpinski E, Pang PKT. The modulation of votage-dependent calcium channels in three types of cells by parathyroid hormone. Europ J Pharmacol 1990;1983:1242-1243.

[41] Wing AJ, Brunner FP, Brynger H, Jacobs C, Kramer P, Selwood NH, Gretz N. patients with renovascular disease. Contr Nephrol 1984;41:306-311.

[42] Wu TL, Soifer NE, Burtis WJ, Milstone LM, Stewart AF. Glycosylation of parathyroid hormone-related peptide secreted by human epidermal keratinocytes. J Clin Endocrinol Metab. 1991;73:1002-1007.

[43] Deftos LJ, Burton DW, Brandt DW. Parathyroid hormone-like protein is a secretory product of atrial myocytes. J Clin Invest 1993;92:727-735.

7. Kapitel: Zusammenfassung

Parathormone (PTH) und PTH-related Peptide (PTHrP) vermitteln Wirkungen an das kardiovaskuläre System, die physiologische Rollen dabei sind noch weitestgehend unbekannt. Die Verlängerung des PTHrP im Vergleich zum PTH am COOH-terminalen Ende des Moleküls weist auf die Existenz spezieller PTHrP-Rezeptoren hin. PTHrP vermittelt so über die Aktivierung der Adenylatzyklase oder der Phospholipase C Wirkungen, die sich von denen des PTH unterscheiden.
Kardiovaskuläre Effekte von PTHrP auf adulte Kardiomyozyten sind Steigerung von Proteinsynthese, Aktivität der Kreatinkinase, Kontraktilität der Kardiomyozyten und intrazellulärem cAMP-Anstieg. PTHrP verändert die Kontraktionskinetik der Kardiomyozyten und wirkt vasodilatorisch.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von PTHrP auf die Kontraktionskinetik adulter Kardiomyozyten der Ratte untersucht und die für die Wirkungsvermittlung verantwortliche Domäne des PTHrP-Moleküls genauer bestimmt werden, die vermutlich zwischen den Aminosäuren 7 bis 34 lokalisiert ist. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit mit N-terminalen PTHrP-Fragmenten gearbeitet.
Dabei fand man eine kontraktile Wirkung des PTHrP-Fragments PTHrP(1-16), woraufhin der kontraktile Effekt von PTHrP(1-16) mit dem des PTHrP verglichen wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf folgendes hin:
Ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten sind physiologische Zielzellen für das von koronaren Endothelzellen parakrin sezernierte PTHrP. Dieses authentische PTHrP spielt eine Rolle in der Reperfusion vormals ischämischer Myokardbezirke, indem es eine positive kontraktile und eine vasodilatorische Wirkung entfaltet. Das synthetisch hergestellte PTHrP(1-34) entfaltet am Herzen die gleiche Wirkung über den gleichen Wirkmechanismus, besitzt aber aufgrund seiner fehlenden Glykolysierung eine geringere biologische Potenz als authentisches PTHrP. PTHrP(1-16) besitzt nicht die Bindungsdomäne für den kardialen PTH/PTHrP-Rezeptor, bindet jedoch an den ET_A-Endothelin-Rezeptor und vermittelt über ihn eine positive kontraktile Wirkung, ohne jedoch die Kontraktionskinetik zu verändern.

8. Kapitel: Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter. Ich möchte mich für die Überlassung des Themas, die ausführliche Einführung in die methodische Problematik und die intensive Diskussion bedanken, die es mir ermöglichten, diese Arbeit fertigzustellen.

Ich danke den Mitarbeitern und Doktoranden des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen, besonders Daniela Schreiber, Iris Schumacher, Dr. Sibylle Wenzel, Hermann Holzträger und Armin Rakow.

Ich danke meinen Freunden Peter Drexler und Rüdiger Renk für ihre Unterstützung.

9. Kapitel: Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Christian Katzer
Geburtsdatum	09.07.1971 in Fulda
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Karl-Heinz Katzer
	Dagmar Katzer (†)

Schulausbildung:

1978 - 1982	Marquard-Schule Fulda
1982 - 1991	Rabanus-Maurus-Schule Fulda,

Dienstzeiten:

07/1991 – 06/1992	Wehrdienst im Panzeraufklärungs-Bataillon in Sontra
10/1992 – 09/1993	FSJ im Altenzentrum St. Vinzenz der Stadt Fulda
Oktober 1997	Anerkennung als Kriegsdienstverweigerer

Hochschulausbildung:

WS 93/94 bis SS 00	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
WS 98/99 und SS 01	Ergänzungsstudium „Grundlagen der Praktischen Informatik und angewandten Mathematik“ (noch nicht abgeschlossen)
August 1995	Ärztliche Vorprüfung
November 2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, vorläufige Approbation
11/2001 – 01/2002	Arzt im Praktikum im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin am Uni-Klinikum Gießen
02/2002 – 04/2003	Arzt im Praktikum in der Abteilung Anaesthesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie am Uni-Klinikum Gießen
Mai 2003	Approbation als Arzt
seit Mai 2003	Assistenzarzt im Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Uni-Klinikum Gießen

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 veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemach. 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.

Christian Katzer