
Aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für Veterinärphysiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Expression von Parathormone-related Peptide in koronaren
Endothelzellen und der glatten Gefäßmuskulatur**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
KATJA SCHORR**

Gießen 2002

Aus dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Eingereicht über das Institut für Veterinärphysiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

**Expression von Parathormone-related Peptide in koronaren
Endothelzellen und der glatten Gefäßmuskulatur**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Eingereicht von
KATJA SCHORR
Tierärztin aus Talheim**

Gießen 2002

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

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	1
1. Einleitung	3
1.1 PTHrP – ein vielseitiges Peptidhormon	3
1.2 Kardiovaskuläre Wirkungen von PTHrP	5
1.3 Expression von PTHrP im kardiovaskulären System	7
1.4 Fragestellung	8
2. Material	10
2.1 Chemikalien	10
2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien	10
2.1.2 Spezielle Chemikalien	12
2.1.2.1 Rezeptorcharakterisierung	12
2.1.2.2 Immunohistochemie	12
2.1.2.3 Biochemische Charakterisierung	12
2.1.2.4 Apoptose-Assay	15
2.2 Geräte und Laborbedarf	13
2.2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände	13
2.2.1.1 Zellkultur	13
2.2.1.2 SDS-Gelelektrophorese	14
2.2.1.3 Transfektion	14
2.2.1.4 Sonstige Geräte	14
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	15
2.3 Auswertungs-Software	15

3	Methoden	16
3.1	Isolierung von koronaren Endothelzellen	16
3.1.1	Versuchstiere	16
3.1.2	Präparation isolierter Endothelzellen aus dem Rattenherz	16
3.2	Präparation denudierter Aortenringe aus der Ratte	19
3.3	Zellkultur	20
3.3.1	Ausplattieren	20
3.3.2	Inkubation und Zellernte	21
3.3.2.1	Endothelzellen	21
3.3.2.2	Zellüberstand	21
3.3.3	Transfektion der Endothelzellen mit Sense und Antisense Oligonucleotiden	22
3.3.4	Kernextraktion	23
3.4	Protein-Gelelektrophoretische Methoden	25
3.4.1	Probenvorbereitung	25
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
3.4.3	Western-Blot-Verfahren	27
3.4.4	Immunologischer Nachweis von PTHrP	28
3.5	Proteinbestimmung	30
3.5.1	Probenvorbereitung	30
3.5.2	Bestimmung des Proteingehaltes	30
3.6	Rezeptorcharakterisierung	31
3.7	Immunohistochemie	32
3.8	DIG Glycan-Detection-Assay	33

3.9 Proliferations-Assay	34
3.10 Apoptoseinduktion	35
3.10.1 UV-Bestrahlung	35
3.10.2 Chromatin-Färbung	35
3.11 Denudierte Aortenringe	36
3.12 Statistik	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Einfluß von Phenylephrin auf die Expression von PTHrP in koronaren Endothelzellen	37
4.1.1 Abhängigkeit vom Alter der Kulturen	37
4.1.2 Einfluß von Actinomycin D auf die Wirkung von Phenylephrin	40
4.1.3 Bestimmung der Halbwertszeit von PTHrP in koronaren Endothelzellen	41
4.2 Einfluß von Angiotensin II auf die Expression von PTHrP in koronaren Endothelzellen	42
4.3 Charakterisierung des beteiligten alpha-adrenergen Rezeptor- Subtyps	43
4.3.1 Rezeptorcharakterisierung an koronaren Endothelzellen	43
4.3.2 Einfluß von 5- Methylurapidil, Chlorethylclonidin und BMY 7378	44
4.4 Einfluß einer gesteigerten Expression auf die Freisetzung von PTHrP	46

4.5 Immunohistochemische Charakterisierung von PTHrP in koronaren Endothelzellen	47
4.5.1 Abhängigkeit vom Alter der Kulturen	47
4.5.2 Nukleäre Lokalisation von PTHrP in konfluenten Kulturen	48
4.6 Biochemische Charakterisierung des nukleären PTHrP	50
4.7 Einfluß einer Herabregulation von PTHrP auf koronare Endothelzellen	51
4.7.1 Einfluß von AS-Transfektion auf die Expression	51
4.7.2 Einfluß auf die Zellproliferation	52
4.7.3 Einfluß auf programmierten Zelltod (Apoptose)	53
4.8 Herabregulation von PTHrP in koronaren Endothelzellen durch TGF- β_1	55
4.9 Einfluß von Angiotensin II und Phenylephrin auf die Expression von PTHrP in denudierten Aortenringpräparaten	57
5. Diskussion	58
5.1. Hauptbefunde	58
5.2. Expression von PTHrP im Gefäßbett	58
5.3. Intrakrine Wirkungen von PTHrP	59
5.4. Pathophysiologische Relevanz der Befunde	62
6. Zusammenfassung	63
7. Summary	65

8.	Literaturverzeichnis	66
-----------	-----------------------------	-----------

9.	Danksagung	72
-----------	-------------------	-----------

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
AA/BA	Acrylamid/ Bisacrylamid
Ang II	Angiotensin II
AON	Antisense-Oligonucleotide
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest	demineralisiertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
CEC	Chlorethylclonidin
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethanolsulfonsäure
HOE 33258	Bisbenzimid H 33258 Fluorochrome
K_D	Dissoziationskonstante
M	mol/l
min	Minuten
MU	5-Methylurapidil
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NCS	Neonatales Kälberserum
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phenylephrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
pK_B	negativer dekadischer Logarithmus der Bindungskapazitätskonstante

PKC	Protein-Kinase C
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PTH	Parathormon
PTH1R	PTH/PTHrP-Rezeptor
PTHrP	Parathormone-related Peptide
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SON	Sense-Oligonucleotide
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TGF- β_1	Transforming growth factor- β_1
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
UPM	Umdrehung pro Minute
vs.	versus
VSMC	vascular smooth muscle cells
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 PTHrP- ein vielseitiges Peptidhormon

Das „Parathormone-related Peptide“, kurz PTHrP genannt, wurde 1987 nach fast 40-jähriger Suche als kausaler Faktor für das humorale Hyperkalzämie-Syndrom aus Lungentumoren isoliert und identifiziert (Burtis *et al.*, 1987; Moseley *et al.*, 1987; Strewler *et al.*, 1987). Dieses Peptidhormon, welches in Tumorzellen vermehrt gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben wird, stimuliert über einen endokrinen Signalweg den Knochenabbau und die renale Kalziumreabsorption.

PTHrP wird jedoch nicht nur von Tumorzellen sondern auch von vielen nicht-malignen Zellen, wie z.B. den Glattmuskelzellen des Uterus, des Magen-Darm-Traktes und des kardiovaskulären Systemes, gebildet.

Eine begrenzte Sequenz- und Konformationshomologie zwischen den ersten 34 Aminosäuren von Parathormon (PTH) und PTHrP erklärt ihre Fähigkeit, mit gleicher Affinität an einen Rezeptor zu binden. Über diesen gemeinsamen PTH/PTHrP-Rezeptor (PTH1R) verläuft die Interaktion des PTHrP mit seinen Zielzellen (Juppner *et al.*, 1991).

Dadurch wurde auch deutlich, daß das PTHrP viele Effekte des PTH wie z.B. den Knochenabbau und Erhöhung der Kalziumkonzentration im Blut nachahmt. Es stimuliert in der Niere die Adenylatzyklase-Aktivität und verstärkt die Phosphatsekretion und die Kalziumreabsorption. Außerdem erhöht es die 1 α -Hydroxylase-Aktivität der Niere, welche zu einer verstärkten 1,25-Dihydroxyvitamin D- Bildung führt.

Kurz nach seiner Entdeckung wurde jedoch ersichtlich, daß das sogenannte PTHrP sich in einer Vielzahl von Merkmalen von PTH unterscheidet. Trotz ihrer N-terminalen Homologie und ihrer gemeinsamen kalziotropen Eigenschaften werden PTH und PTHrP auf verschiedenen Genen, welche sich auf separaten Chromosomen befinden, gebildet. In allen bisher untersuchten Spezies ist das Gen,

welches für PTHrP kodiert, komplexer als dasjenige, welches für PTH kodiert. So enthält z.B. das humane PTHrP-Gen neun Exons, welche sich durch alternatives Splicing in 12 verschiedene Transkripte und drei unterschiedlich lange Translationsprodukte entwickeln können, immer unter Berücksichtigung der gewebsspezifischen Verhaltensmuster und unter der Kontrolle von drei verschiedenen Promotoren.

Die Expression von PTHrP wird durch eine Vielzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren reguliert. Das instabile Muster in der Organisation der 3' nicht-translatierten Regionen erinnert an dasjenige der „immediate-early-Gene“, welche für Cytokine und Wachstumsfaktoren kodieren.

PTHrP gilt im normalen Blutkreislauf als kaum nachweisbar, wird aber auf parakrinem bzw. autokrinem Wege während dem fetalen und adulten Leben in einer Vielzahl von normalen Zellen und Geweben gebildet. So z.B. in Zellen des Epithels, Mesenchyms, endokriner Drüsen und des ZNS, in welchen - so wird angenommen - PTHrP eine wichtige Rolle in der Zellphysiologie über diesen parakrinen/autokrinen Weg spielt. PTHrP- bzw. PTH1R- Gen knockout Mäuse, welche in utero oder bei Geburt starben, unterstreichen dessen wesentliche Rolle.

Zusätzlich zeichnet sich PTHrP hinsichtlich seiner physiologischen Rolle noch durch zwei weitere wichtige Merkmale aus:

Erstens werden die entstehenden PTHrP-Isoformen durch Mitglieder der Prohormon-Convertase-Familie letztendlich zu 3 Fragmenten weiterverarbeitet; nämlich dem N-terminalen PTHrP (1-36), welches strukturverwandt mit PTH ist, einem mittleren PTHrP (38-94) und einem C-terminalen PTHrP (107-139). Jedes Fragment besitzt eigene biologische Eigenschaften und wirkt möglicherweise über unterschiedliche Rezeptoren. Von diesen wurde bis jetzt nur der Typ 1 PTH Rezeptor (PTH1R) in Säugern charakterisiert.

Zweitens haben sich durch Untersuchungen der letzten 5 Jahre Evidenzen dafür ergeben, daß PTHrP nicht nur über einen parakrinen/autokrinen Signalweg, sondern auch über einen sogenannten intrakrinen Weg agieren kann, welcher die Translokation des Proteins in den Nukleus beinhaltet. Folglich besitzt PTHrP eine nukleäre/nukleoläre Lokalisations-Sequenz (NLS) in der Region 88-107, die strukturell vergleichbar mit der NLS von viralen Proteinen ist.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß das nukleäre PTHrP in diesen Zellen vor Apoptose schützt oder Proliferation ermöglicht. Desweiteren konnte beobachtet werden, daß auch der PTH1R in den Zellkern transloziert, woraus man schlußfolgern kann, daß PTH und/oder PTHrP eine Rolle bei der Regulation von Ereignissen unmittelbar im Kern zukommen könnte, wie z.B. von physikalischen Gegebenheiten (Nukleoskelett, o.Ä.) oder der Genexpression direkt (Watson *et al.*, 2000a und 2000b).

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, daß PTHrP multiple Betätigungsfelder beispielsweise in der fötalen Entwicklung, dem trans-epithelialen Kalziumtransfer, der Laktation, der glattmuskulären Relaxation und dem Zellwachstum aufweist.

Obwohl PTHrP ursprünglich aus Tumorgewebe isoliert wurde, spielt dieses Peptidhormon primär eine Rolle bei der lokalen Regulation vieler physiologischer Prozesse.

1.2 Kardiovaskuläre Wirkungen von PTH und PTHrP

Neben den klassischen Effekten des PTH auf Niere und Skelett gibt es auch eine Vielzahl von Einflüssen auf das kardiovaskuläre System. So wurden in Untersuchungen neben einer Vasodilation, welche in einem Absinken des systemischen Blutdruckes resultiert, auch direkte kardiale Stimulationen in verschiedenen Spezies nachgewiesen. Wie aber kann dieses Hormon, welches nur in der Schilddrüse synthetisiert wird, in die lokale Kontrolle des Gefäßtonus eingebunden sein? Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Gegensatz in der biologischen Wirkung des PTH auf das kardiovaskuläre System taucht erstmals mit der Entdeckung des PTHrP auf.

Im Hinblick auf das Herz-Kreislauf-System besitzt das Protein eine wichtige regulatorische Funktion bezüglich Kontraktilität und Proliferation der glatten Muskulatur.

Kurz nach seiner Charakterisierung zeigten Untersuchungen mit synthetischem PTHrP (1-34), daß PTHrP viele Effekte des PTH nachahmt, so z.B. eine Vasorelaxation in der Aorta (Crass & Scarpace, 1993), in der Portalvene (Shan *et al.*, 1994), der Koronararterie (Nickols *et al.*, 1989) und den Nierenarterien (Musso *et al.*, 1989; Winquist *et al.*, 1987).

Allgemein läßt sich sagen, daß die Stärke der Vasodilatation von PTHrP in Organbädern vergleichbar mit der des PTH ist. Im Gegensatz dazu erweist sich PTHrP (1-34) sogar als potenterer Vasodilatator in Portalvenen von Mäusen als PTH (1-34) (Shan *et al.*, 1994). Aus Studien an perfundierten Kaninchennieren (Massfelder *et al.*, 1996b) und an Rattenaorten (Nickols *et al.*, 1989) wurde geschlossen, daß die Vasorelaxation endothelunabhängig erfolgt. Wahrscheinlich handelt es sich aber hierbei um speziesspezifische Eigenschaften, da in Aortenringen von Mäusen durch Denudierung des Endothels die relaxierenden Effekte des PTHrP abgeschwächt werden (Sutliff *et al.*, 1999). Vasodilatorische Effekte können durch Aktivierung des PTH1R vermittelt werden, welcher in den Glattmuskelzellen der Gefäße von Ratten exprimiert wird (Urena *et al.*, 1993), und nach Aktivierung durch einen cAMP -Anstieg wirkt (Ishikawa *et al.*, 1994b).

Desweiteren wird bei Ratten unter Abfall des Blutdruckes eine Erhöhung der Herzfrequenz sowie eine Erhöhung der Kontraktilität am Herzen nachgewiesen (Nickols *et al.*, 1989). Am isolierten Herzen ist diese positive Chronotropie durch PTHrP stärker als durch PTH, wohingegen eine positive Inotropie ausgelöst durch PTH gänzlich fehlt.

Zusätzlich zu den Effekten bezüglich des Vasotonus greift PTHrP auch in die Zellproliferation der vaskulären Glattmuskelzellen ein. Das Peptidhormon senkt die serum- und PDGF(platelet-derived growth factor)-abhängige Aktivierung der DNA-Synthese in primären Kulturen arterieller Glattmuskelzellen (Hongo *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1995). Für diese antimitogenen Effekte bedarf es des PTH-verwandten N-terminalen Teiles von PTHrP, welcher an den PTH1Rezeptor bindet. Desweiteren kann PTHrP durch Kerntranslokation über einen sogenannten intrakrinen Effekt die Proliferation der Glattmuskelzellen steigern.

Diese Eigenschaft, in das Wachstum der Glattmuskelzellen einzugreifen, läßt den Schluß zu, daß das Protein möglicherweise an der Entwicklung des Herz-Kreislauf-

Systems beteiligt ist. Obwohl in PTHrP-knockout Mäusen dessen Entwicklung normal erscheint, resultiert aus einer PTH1R-Deletion eine höhere fetale Sterblichkeit um den Tag 9-10, in Übereinstimmung mit der Entwicklungsphase von Herz und großen Blutgefäßen (Lanske *et al.*, 1996). Darüberhinaus sterben transgene Mäuse, welche sowohl PTHrP als auch seinen korrespondierenden Rezeptor in vascular smooth muscle cells (VSMC) überexprimieren, in dieser Zeit mit dem Merkmal von unzureichend ausgebildeten Ventrikeln (Qian *et al.*, 1999). Eine weitere Evidenz für die Rolle des PTHrP bei der Herz-Kreislaufentwicklung findet sich bei der seltenen Blomstrand-Chondrodysplasie des Menschen, verursacht durch eine inaktivierende PTH1R-Mutation (Karaplis *et al.*, 1998). Hierbei entwickeln diese Feten einen Hydrops fetalis, vergesellschaftet mit einer hohen Rate an Herzinsuffizienzen und Aortenmißbildungen.

1.3 Expression von PTHrP im kardiovaskulären System

Im Gegensatz zu PTH wird PTHrP in vielen Geweben des Körpers, einschließlich dem kardiovaskulären System, exprimiert. Dort wird das Peptidhormon in den Glattmuskel- und Endothelzellen, der korrespondierende Rezeptor jedoch nur in den Glattmuskelzellen exprimiert. Hier erfolgt die bereits erwähnte Relaxation, welche wiederum eine Absenkung des Blutdruckes zur Folge hat.

Die Regulation der Expression von PTHrP ist bislang nur an Glattmuskelzellen untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, daß vasoaktive Substanzen wie z. B. Angiotensin II oder Norepinephrin die Expression von PTHrP in Glattmuskelzellen steigern (Maeda *et al.*, 1999). Man geht davon aus, daß eine nachfolgende gesteigerte Freisetzung als kompensatorischer Mechanismus zur Normalisierung des Blutdruckes dient. Jedoch liegen noch keine direkten Evidenzen für diese Kompensation vor.

1.4 Fragestellung

Die Rolle der PTHrP-Expression in Endothelzellen ist relativ unklar. Da sie den PTH1R nicht exprimieren, wurden sie bislang einfach als zusätzliche Quelle für PTHrP im Gefäßbett angesehen. Desweiteren hat man keine genauen Untersuchungen zum Regulationsmechanismus in Endothelzellen durchgeführt; jedoch zeigen initiale Studien, daß die Expression in den Endothel- und den Glattmuskelzellen unterschiedlich reguliert wird.

Meine Untersuchungen konzentrieren sich nun auf koronare Endothelzellen, welche aus Ventrikeln von Ratten isoliert wurden. Hierbei ist besonders zu beachten, daß diese Endothelzellen die Hauptquelle für PTHrP im Ventrikel darstellen, da ventrikuläre Kardiomyozyten kein PTHrP exprimieren. Es gibt mehrere Hinweise dafür, daß das lokal in den koronaren Endothelzellen produzierte PTHrP ein Teil des Regulationsmechanismus für die Ventrikelfunktion darstellt, und daß diese Funktion des PTHrP sich von seiner übrigen im Herz-Kreislauf-System unterscheidet:

Erstens übersteigt der lokale Effekt des PTHrP - bezogen auf den koronaren Fluß - denjenigen des PTH, im Gegensatz zu dem auf den systemischen Blutdruck.

Zweitens beeinflusst PTHrP die kardiale Funktion, jedoch nicht das PTH.

Drittens kommt es durch TGF- β_1 , einem Faktor, welcher beim Übergang von Herzhypertrophie zu Insuffizienz eine wichtige Rolle spielt, zu einer Herabregulation der PTHrP-Expression und infolgedessen zu einem Absinken der Expression von PTHrP im Ventrikel von Rattenherzen mit gleichzeitigen Anzeichen einer Herzinsuffizienz .

Aus diesem Grund erscheint die Untersuchung der Regulationsmechanismen der PTHrP-Expression in diesem Zelltyp von besonderem Interesse. Bekannt ist, daß in nicht-malignen Zellen die Expression häufig zellzyklusabhängig ist.

Abgesehen davon ist unbekannt, ob in koronaren Endothelzellen PTHrP einen intrakrinen Effekt ausübt. Es erscheint jedenfalls möglich, da dies bereits für andere PTHrP-exprimierende Zelltypen nachgewiesen werden konnte. Bei diesen Effekten,

welche einer Translokation des PTHrP in den Kern bedürfen - ebenfalls in Abhängigkeit vom Zellzyklus – wird Zellproliferation oder Apoptose reguliert.

Meine Untersuchungen hatten zum Ziel, die Interaktion von α -Adrenorezeptoren bzw. Angiotensin II-Rezeptoren mit der erhöhten Expression von PTHrP in koronaren Endothelzellen zu analysieren. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an wachsenden und nicht-wachsenden Kulturen durchgeführt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Frage nach der zellulären Lokalisation des PTHrP.

Schließlich wurde untersucht, ob die Expression dieses Peptidhormones in den koronaren Endothelzellen Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen und/oder deren Apoptose hat und wenn ja, ob Änderungen in der Expression diesen Effekt beeinflussen.

2 Material

2.1 Chemikalien

2.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Calbiochem, Bad Soden
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin II	Bachem, Heidelberg
Antisense-/Sense-Oligonucleotide	Gibco BRL, Eggenstein
APS	Serva, Heidelberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Merck, Darmstadt
Bisindolylmaleimid	Calbiochem, Bad Soden
BCIP	Calbiochem, Bad Soden
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase; Typ CLSII, (322U/mg)	Biochrom, Berlin
DTT	Sigma, Taufkirchen
EDTA-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Boehringer, Mannheim

Medium 199	Gibco BRL, Eggenstein
Mercaptopropanol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker	Fluka, Seelze
NBT	Roche, Mannheim
NCS	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Phenylephrin	Sigma, Taufkirchen
PMA	Research Biochemicals Internationals, MA, USA
PMSF	Sigma, Taufkirchen
PTHrP-Antikörper	Calbiochem, Bad Soden
PTH/PTHrP-Rezeptor-Antikörper	Upstate biotechnologies, NY, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TCA	Merck, Darmstadt
Temed	Serva, Heidelberg
TGF- β_1	Biolabs, Frankfurt/Main
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Vanadat	Merck, Darmstadt

2.1.2 Spezielle Chemikalien

2.1.2.1 Rezeptorcharakterisierung

BMY 7378	Plano, Wetzlar
Chlorethylclonidin	Calbiochem, Bad Soden
5-Methylurapidil	New England Biolabs, Frankfurt/M
[furanyl-5- ³ H]-Prazosin	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Prazosin	Sigma, Taufkirchen
Yohimbin	Sigma, Taufkirchen

2.1.2.2 Immunohistochemie

Anti-Mouse+TRITC	Sigma, Taufkirchen
HOE 33258	Calbiochem, Bad Soden
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt

2.1.2.3 Biochemische Charakterisierung

DIG Glycan Detection Kit:	Roche, Mannheim
Natriummetaperjodat	
DIG-3-0-succinyl- ϵ -aminocaprinsäure-hydrazid	
Anti-Digoxigenin-AP	
NBT/X-phosphat-Lösung	
Blockierungsreagenz	
Transferrin	
Creatinase	

2.1.2.4 Apoptose-Assay

HOE 33258

Calbiochem, Bad Soden

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

2.2 Geräte und Laborbedarf

2.2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

2.2.1.1 Zellkultur

Präparationsbesteck

Aesculap, Tuttlingen

Langendorff-Apparatur

Eigenbau, Physiologisches
Institut, Universität Gießen

Gewebehacker

Bachofer, Reutlingen

Nylonnetz

NeoLab, Heidelberg

Sterilbank

Heraeus, Hanau

Brutschrank

Heraeus, Hanau

Mikroskop TMS-F

Nikon, Japan

50 ml Röhrchen (Falcon 2070)

Becton Dickinson, Heidelberg

Primaria Falcon (Typ 3803)

Becton Dickinson, Heidelberg

2.2.1.2 SDS-Gelelektrophorese

Elektrophorese-Netzgerät	Biotech-Fischer, Reiskirchen
Vertikale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen

2.2.1.3 Transfektion

Elektroporationsgerät (Gene Pulser II)	Bio-Rad, München
--	------------------

2.2.1.4 Sonstige Geräte

Anlage zur Demineralisierung von Wasser	Millipore, Eschborn
Flüssig-Szintillationszähler	Canberra-Packard, Frankfurt/Main
Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Küvetten	Bio-Rad, München
Mikrotiterplatten-Photometer	Dynatech, Denkendorf
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran	Millipore Corporation, MA, USA
Deckgläser	Sigma, Taufkirchen
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001 + 3004 Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Szintillationsgefäß	Canberra-Packard, Frankfurt a.M.
Einweg-Zellschaber	Typ: Falcon 3087 Becton Dickinson, Heidelberg

2.3 Auswertungs-Software

Biolinx 2.0	Dynatech, Denkendorf
Image-Quant	Molecular Dynamics, Krefeld

3. Methoden

3.1 Isolierung von Endothelzellen aus dem Rattenherz

3.1.1 Versuchstiere

Die koronaren Endothelzellen wurden aus adulten, 300-400 g schweren, männlichen Wistar-Ratten isoliert. Die Tiere stammten aus eigener Züchtung des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen. Im Tierstall hatten sie freien Zugang zu Wasser und dem Standardfuttermittel Altromin®.

3.1.2 Präparation isolierter Endothelzellen aus dem Rattenherz (Piper et al, 1982)

Zu Beginn der Präparation wurde die verwendete Langendorff-Perfusionsanlage mit Powell-Medium gespült, mit 80 ml des gleichen Mediums luftblasenfrei befüllt und auf 37°C erwärmt. Das Powell-Medium wurde während der gesamten Präparation mit Carbogen begast.

Nach kurzer Narkose der Ratten mit Diethylether (für ca. 1-2 min) wurde der Thorax eröffnet und das Perikard entfernt. Danach wurden Herz und Lunge mit einem Scherenschlag abgetrennt und in ein Gefäß mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Die Aorta wurde freipräpariert, indem das noch am Herzen befindliche Mediastinal- und Pulmonalgewebe entfernt wurde. Daraufhin wurde das Herz mit der Aorta an die Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gehängt und retrograd perfundiert. Dabei wurde das im Herzen noch befindliche Blut mit 40 ml Powell-Medium ausgewaschen.

Powell-Medium

NaCl	110 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
Glukose	11 mM
Mg ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,2 mM

Plus Carbogenbegasung

Anschließend wurde das Herz mit 50 ml Collagenase-Puffer für 25 min rezirkulierend perfundiert. Dabei erfolgte eine Einstellung der Flußrate durch ein Ventil auf ca. 2-3 ml/min pro Herz (5 ml/g Frischgewicht/min).

Collagenase-Puffer

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

Nach Perfusionsende wurden Vorhöfe und Aorta entfernt und die Ventrikel mittels eines Gewebhackers mit einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde der Gewebebrei in einem Teflongefäß für 10 min in 30 ml Perfusionsmedium mit Collagenase bei 37°C und ständiger Carbogen-Begasung nachverdaut. Unterstützt wurde die Mazeration der ventrikulären Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pipette.

Diese Suspension wurde daraufhin durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm filtriert und danach bei 25 x g für 3 min zentrifugiert. Hierbei erfolgte eine Separierung von intakten Zellen gegenüber Zelltrümmern, kleineren Zellen und dem Collagenase-Puffer.

Während der Zentrifugation wurde das Teflongefäß mit Powell-Medium gespült und 10 mg Trypsin sowie 30 µl CaCl₂ (100 mM) hineingeben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, welcher die Endothelzellen beinhaltete, ins Teflongefäß pipettiert.

Das Teflongefäß hängte man anschließend ins 37°C-Wasserbad und durchmischte mit einem Rührer die Suspension langsam (immer unter Carbogenbegasung).

Danach füllte man sterile 50 ml Röhrchen mit je 30 ml M199 CO₂ und erwärmte sie im Wasserbad. Nach 30 min wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf die beiden Röhrchen verteilt und bei 200 x g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets in ca. 10 ml Kulturmedium aufgenommen und auf 100 mm Primaria Kulturschalen ausplattiert.

Kulturmedium für Endothelzellen (M199-CO₂)

M 199	x ml
Mixed Serum (FCS+NCS, 1:1)	20 % (vol/vol)
Penicillin-Streptomycin	5 % (vol/vol)
pH 7,4, mit CO ₂ äquilibriert	
sterilfiltriert	

Das Medium wurde bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens alle 2 Tage gewechselt. Danach wurden die Endothelzellen in der ersten Passage für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

3.2 Präparation denudierter Aortenringe aus der Ratte

Aus den gleichen Tieren wurden durch vorsichtiges Heraustrennen von Aortenstücken mit den Herzen Aortenpräparate mit einer Länge von ca. 1,5 bis 2 cm gewonnen, welche in kalter physiologischer NaCl-Lösung vom umgebenden Gewebe und der Adventitia freipräpariert wurden. Das Endothel wurde mechanisch mittels eines Stiftes mit rauher Oberfläche zerstört. Danach wurden Aortenringe mit einer Länge von 0,5 cm hergestellt, die in einem Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C inkubiert wurden.

Krebs-Henseleit-Puffer

NaCl	145 mM
NaHCO ₃	25 mM
KCl	5,9 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM
Glucose	5,5 mM
Penicillin-Streptomycin	2% (vol/vol)
pH 7,4	

3.3 Zellkultur

3.3.1 Ausplattieren

Nach dem Erreichen des Konfluenzstadiums wurden die Endothelzellen zweimal mit 30-40 ml HEPES/EDTA-Puffer (37°C) gewaschen und danach mit 5 ml Trypsin-Lösung (Trypsin-EDTA, 1x) überschichtet. Bis zur sichtbaren Auflösung der Zell-Zell-Kontakte erfolgte eine Aufbewahrung der Schalen im Brutschrank bei 37°C. Die Zellsuspension wurde in 5 ml 37°C warmen M199-CO₂ aufgenommen und auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Mittels einer Neubauer Zählkammer wurde nun die so gewonnene Zellzahl pro Milliliter berechnet und die Zellen in einer Dichte von ca. 2×10^5 auf bereits mit M199-Medium beschichtete 32 mm Schalen verteilt.

HEPES/EDTA-Puffer

NaCl	7,31 M
KCl	0,196 M
MgCl ₂	0,244 M
HEPES	2,38 M
EDTA-Na ₂	0,186 M
pH 7,4, sterilfiltriert	

M199-Medium

Medium 199 / Earl's Salts	x ml
Mixed Serum (FCS+NCS)	20 % (vol/vol)
Penicillin-Streptomycin	2 % (vol/vol)
pH 7,4, mit CO ₂ äquilibriert und sterilfiltriert	

3.3.2 Inkubation und Zellernte

3.3.2.1 Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden im wachsenden Stadium entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll mit Substanzen inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml kaltem 1x PBS gewaschen. Danach wurde jeder Schale (Falcon Typ 3001) 100 µl Lysispuffer zugesetzt und die Schalen für ca. 10 min kräftig geschüttelt. Daraufhin wurde zu jeder Schale 10 µl Benzonase (50 U/ml) zwecks Verdau der Nukleinsäuren gegeben und erneut für 10 min geschüttelt. Im Anschluß daran wurde mit einem Zellschaber die eventuell noch anhaftenden Zellen vom Boden abgelöst und zusammen mit der Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 20 µl 2x Laemmli-Puffer gegeben und anschließend kurz gemischt. Die Proben wurden dann 10 min bei 65°C erhitzt und bis zur Elektrophorese bei -18°C eingefroren.

10x PBS

NaCl ₂	150 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM
Na ₂ HPO ₄	5 mM

Lysis-Puffer

Tris/HCl	50 mM (pH 6,7)
SDS	2% (wt/vol)
Mercaptopropanol	2% (vol/vol)
Na ₃ VO ₄	1 mM

Natrium-ortho-Vanadat hemmte die Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

2x Laemmli-Puffer

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

3.3.2.2 Zellüberstand

1 ml vom Kulturüberstand der gemäß Versuchsprotokoll stimulierten Zellen wurden 100 µl Desoxycholat (1 mg in 1 ml H₂O gelöst) zugegeben und das Ganze für mind. 15 min bei 4°C aufbewahrt. Danach wurden 100 µl einer 100%igen TCA-Lösung (500g in 227 ml H₂O gelöst) zugegeben, gut vermischt und erneut für 30 min bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 13000 x g. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 30 µl 1x Lämmli-Puffer aufgenommen und zwecks Neutralisation mit ca. 3 µl Tris-Lösung (Blaufärbung) vermischt. Zum Schluß denaturierte man die Proteine bei 60°C für 10 min und erhielt so seine Proben, die man direkt für die Gelelektrophorese einsetzen oder bei -18°C aufbewahren konnte.

3.3.3 Transfektion der Endothelzellen mit Sense und Antisense Oligonucleotiden

Nach Trypsinierung und Aufnahme in gewünschte Gesamtvolumina Kulturmedium, wurden die Zellen in 3 Bedingungen aufgeteilt:

- a) Kontrolle,
- b) plus PTHrP Antisense Oligonucleotide (5'-TEF FOC AGC CTC CGC FEO FT-3')
- c) plus PTHrP Sense Oligonucleotide (5'-AZE OZG CGG AGG CTG EZZ OA-3')

Die eingesetzte Oligonucleotid-Konzentration betrug 10 µg/ml.

Z,E,F und O sind Phosphorthioate , wobei Z für T, E für G, F für A und O für C steht.

Die einzelnen Bedingungen wurden nacheinander in 800 µl Küvetten elektroporiert und die so transfizierten bzw. Kontroll-Zellen wurden gemäß der Versuchprotokolle ausplattiert. Die Elektroporation wurde mit 400 V und 400 µF bei einer durchschnittlichen Elektroporationsdauer von 4,6-5,2 msec durchgeführt.

3.3.4 Kernextraktion

Die Endothelzellen wurden wie in Abschnitt 3.3.1 ausplattiert und entsprechend den Versuchsprotokollen inkubiert. Anschließend wurden jeweils die Zellen von drei Schalen des Typs Falcon 3001 mit einem Zellschaber abgekratzt und zusammen mit dem Kulturmedium in ein 10 ml Röhrchen überführt. Danach wurden die Zellen bei 800 x g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 225 x g wurde nochmals der Überstand abgesaugt und das Pellet entweder bei –80°C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

Zunächst wurde das Zellpellet in 400 µl Schwellungspuffer aufgenommen und gründlich bis zur vollständigen Lösung gemischt. Nachdem die Proben dann für 30 bis 40 min auf Eis stehen gelassen wurden, zentrifugierte man sie für 10 min bei 50 x g und 4°C. Abermals wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 400 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen, kurz geschüttelt und wiederum für 5-10 min auf Eis stehen gelassen.

Schwellungspuffer

Tris/HCl	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1 mM
DTT	1 mM
pH 7,9	

Homogenisierungspuffer

Tris/HCl	10 mM
Saccharose	300 mM
MgCl ₂	1,5 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,3% (wt/vol)
pH 7,9	

Die so gewonnene Suspension wurde mit insgesamt acht Stößen in einem Glasmörser homogenisiert und erneut bei 50 x g für 10 min und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, gab man 40 µl des Storagepuffers hinzu und ließ die Proben ein weiteres Mal für 30 min auf Eis stehen, wobei nun alle 5 min gemischt wurde.

Storagepuffer

HEPES	10 mM
KCl	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Glycerol	20 % (vol/vol)
pH 7,5	

Zum Schluß wurden die Proben für 5 min bei 9000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand bei -80°C tiefgefroren bzw. sofort weiterverarbeitet:

Hierfür gab man zu den Proben jeweils ca. 25 µl 2x Laemmli-Puffer und erhitzte sie für 10 min bei 65°C. Danach konnte man sie bei -18°C aufbewahren oder direkt eine Gelelektrophorese durchführen.

3.4 Protein-Gelelektrophoretische Methoden

3.4.1 Probenvorbereitung

Die Proteinproben wurden wie bereits in den Abschnitten 3.3.2.1 und 3.3.2.2 beschrieben aus den Endothelzellen bzw. den Aortenringpräparaten gewonnen und konnten entweder sofort oder nach Tiefgefrieren für die Gelelektrophorese verwendet werden.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vom Gesamtproteinextrakt der Endothelzellen erfolgte nach Laemmli (1970). Dafür wurden zunächst die Glasplatten der Gelkammer gründlich gereinigt und mit 70%igem Alkohol entfettet. Zum Gießen eines Geles benötigte man folgendes Zubehör: eine rechteckige Glasplatte, eine Glasplatte mit Ausschnitt, zwei Spacer (Dicke 1mm) sowie einen Silikonschlauch entsprechender Dicke.

Nun brachte man zwischen den Glasplatten beidseits die Spacer und zum Abdichten der unteren Seite einen Silikonschlauch an. Danach wurde diese Kammer mit Klammern so an dem Pufferbehälter befestigt, daß die Glasplatte mit Ausschnitt am Pufferbehälter anlag. Anschließend wurde das Trenngel bis auf 2/3 der Höhe zwischen die Glasplatten gegossen. Damit das Gel unter Luftausschluß polymerisieren konnte, wurde es mit Wasser überschichtet. Dann wurde nach ca. 30 min Polymerisation das Sammelgel nach Entfernen des Wassers bis zur Oberkante eingegossen und sofort der Profilformer für die Taschen eingesetzt. Nach weiteren 20 min konnte der Silikonschlauch entfernt und die Elektrophoresekammer in den unteren Pufferbehälter, der ebenfalls gefüllt war, gesetzt werden.

Für die Untersuchung der PTHrP Expression wurde ein 10%iges Trenngel verwendet.

4x Trenngelpuffer

Tris/HCl	1,5 M (pH 8,8)
SDS 10 % (wt/vol)	0,4% (wt/vol)

Trenngel

AA/BA (30:1)	10 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml
aqua bidest	12,5 ml
APS 10% (wt/vol)	300 µl
TEMED	30 µl
SDS 10 % (wt/vol)	300 µl

Sammelgelpuffer

Tris/HCl	0,5 M (pH 6,8)
SDS 10 % (wt/vol)	0,4% (wt/vol)

Sammelgel

AA/BA (30:1)	2,4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
aqua bidest	12,8 ml
APS 10% (wt/vol)	300 µl
TEMED	30 µl
SDS 10 % (wt/vol)	300 µl

Die Mengenangaben beziehen sich auf das Gießen von 2 Gelen.

Laufpuffer

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

Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei 200 V für 3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4.3 Western-Blot-Verfahren

Die Proteine, welche in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden danach im „Semi Dry Blotting Verfahren“ nach Kyhse-Andersen (1984) elektrophoretisch auf Polyvinyliden-Difluorid-(PVDF-) Membranen transferiert. Als Pufferreservoir wurden in Puffer getränkte Filterpapiere (Fa. Biotech Fischer, Reiskirchen) verwendet. Dadurch konnten die auf diese Weise fixierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden.

Für das Western-Blot-Verfahren wurden folgende Puffer verwendet:

Kathodenpuffer

Tris/HCl	25 mM
6-Aminohexansäure	40 mM
Methanol	20% (vol/vol)
pH 9,4	

Anodenpuffer A

Tris/ HCl	30 mM
Methanol	20% (vol/vol)
pH 10,4	

Anodenpuffer B

Tris/HCl	300 mM
Methanol	20% (vol/vol)
pH 10,4	

Eine PVDF-Membran und 9 Filterpapiere wurden in Gelgröße zugeschnitten. Davon wurden je 3 Filterpapiere in den 3 verschiedenen Puffern getränkt. Die PVDF-Membran wurde zusätzlich für ca. 10 sec mit 70%igem Methanol benetzt und anschließend in den Anodenpuffer A getaucht. Nun wurden zunächst die drei in Anodenpuffer B getränkten Filterpapiere luftblasenfrei auf die Anode der Blotkammer gebracht, um anschließend die drei in Anodenpuffer B getränkten Filterpapiere in entsprechender Weise darüberzulegen.

Als nächste folgte die PVDF-Membran - ebenfalls frei von Luftblasen - um darauf nun das Polyacrylamidgel nach Entfernen des Sammelgels vorsichtig auf die Membran zu legen. Zuletzt erfolgte das Darüberschichten der drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere und das Aufsetzen der Kathode. Der Proteintransfer erfolgte nun mit einer Stromstärke von 90 mA (entspricht 0,8 mA/cm) für 2 Stunden bei Raumtemperatur.

3.4.4 Immunologischer Nachweis von PTHrP

Nach dem in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Proteintransfer konnte PTHrP mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Hierfür inkubierte man die PVDF-Membran bei Raumtemperatur für 2 Stunden - bzw. bei 4°C über Nacht - in einer 2%igen BSA-Lösung (in TBS gelöst) zwecks Absättigung unspezifischer Bindungsstellen.

10x TBS-Puffer

Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM

Danach wurde die Membran zweimal für jeweils 5 min mit 1x PBS gewaschen und schließlich mit einem polyklonalen PTHrP-Antikörper für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur überschichtet.

Antikörper-Lösung

anti PTHrP	1 µg/ml
Tris/HCl	50 mM (pH 7,5)
NaCl	150 mM
BSA	2% (wt/vol)
Tween 20	0,5% (vol/vol)

Nach der Erstantikörper-Inkubation wurde die Membran zweimal für 5 min mit 1x TBS + 0,1% Triton X-100-Lösung gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte eine Markierung der Antigen-Antikörper-Komplexe durch eine mindestens zweistündige Inkubation mit der Antikörper-Lösung, welche nun 1µg/ml Antiserum gegen Kaninchen IgG (alkalische Phosphatase konjugiert) beinhaltete.

Anschließend wurde wiederum zweimal gewaschen, diesmal für je 5 min mit einer 1x TBS + 0,5% Triton X-100-Lösung, um so überschüssiges Konjugat von der Membran zu entfernen.

Durch Zwischeninkubation für 10 min in 20 ml alkalischem Phosphatasepuffer wurde danach die Membran äquilibriert.

Alkalischer Phosphatasepuffer

Tris/HCl	100 mM
Mg ₂ Cl ₃ x 6 H ₂ O	25 mM
NaCl	10 mM
pH 9,5	

Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde mittels einer Farbreaktion mit Nitro Blue Tetrazolium (NBT) sichtbar gemacht. Dabei wurde 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) zugegeben, wodurch es durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase und das NBT in ein violettes Präzipitat umgesetzt wurde.

Hierfür wurden unmittelbar vor dem Gebrauch 2,6 mg BCIP und 6,6 mg NBT in 20 ml alkalischem Phosphatpuffer lichtgeschützt vollständig gelöst und anschließend die Membran damit überschichtet. Nach 1-20 min Färbung (abhängig von der Reaktionsintensität) wurde die Membran gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3.5 Proteinbestimmung

3.5.1 Probenvorbereitung

Die Inkubation der Zellen erfolgte wie bereits in Abschnitt 3.3.2 besprochen. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde zu dem Zellrasen 1 ml einer 1N NaOH-Lösung, die mit 0,1% (wt/vol) SDS versetzt war, hinzugegeben. Danach wurden die Zellen bis zu ihrer Lyse für eine weitere Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes (Bradford et al., 1976)

Die Gesamtproteinmenge wurde mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 quantitativ bestimmt. Durch die Bindung dieses Farbstoffes an die Proteine wurde das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben. Hierzu wurden 5–10 µl des unter 3.5.1 beschriebenen Zellysates in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes diente BSA, welches in 1N NaOH/0,01% (wt/vol) SDS gelöst wurde, als Standard in folgenden Konzentrationen: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G 250	0,1% (wt/vol)
Methanol, 96%ig	5% (vol/vol)
ortho-Phosphorsäure, 85%ig	10% (vol/vol)
aqua bidest	ad 1 l
vor Gebrauch filtrieren	

3.6 Rezeptorcharakterisierung

Zur genaueren Detektion der alpha-adrenergen Rezeptoren in den Endothelzellen wurden die Zellen auf den Schalen wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben ausplattiert. Im konfluenten Stadium wurden sie dann entsprechend dem Versuchsprotokoll inkubiert. Danach gab man Tritium-markiertes Prazosin ($[^3\text{H}]$ -Prazosin) in verschiedenen Konzentrationen hinzu und inkubierte die Schalen 2 Stunden bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden 0,5 ml des Kulturmediums entnommen und in Röhrrchen, welche mit 4 ml Universal-LSC-Cocktail (Ultima Gold®) gefüllt waren, überführt. Das restliche Kulturmedium wurde entsorgt, die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und jede Schale wurde mit 1 ml 1 N NaOH/ 0,01% (wt/vol) SDS überschichtet. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 37°C mit anschließender Entnahme von 0,5 ml des Zelllysates.

Dieses wurde dann ebenfalls in Röhrrchen mit den 4 ml Universal-LSC-Cocktail verbracht. Danach wurden alle Proben im Flüssig-Szintillationszähler ausgewertet; wobei im Medium die ungebundenen Prazosin-Counts und im Zelllysate die gebundenen Prazosin-Counts gezählt wurden.

3.7 Immunhistochemie

Die Endothelzellen wurden auf Coverslips (Menzel 25 mm Durchmesser, Dicke 0,13-0,16 m), welche sich auf dem Boden der Kulturschalen befanden, ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Gemäß der Versuchsprotokolle wurden am 1., 2. und 4. Tag nach dem Ausplattieren einige Schalen mit 37°C warmen HEPES-Puffer dreimal gewaschen, mit 3 ml Puffer überschichtet und für 10 min zurück in den Brutschrank gestellt. Danach wurde der Puffer abgesaugt und die Zellen mit 3 ml 3%iger (vol/vol) HEPES-gepufferter Paraformaldehydlösung überschichtet.

Die Zellen wurden so für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie erneut dreimal mit HEPES-Puffer gewaschen und für 5-10 min in warmer HEPES-gepufferter 0,1%iger (vol/vol) Triton X-100-Lösung lysiert. Es folgte wiederum dreimaliges Waschen mit HEPES-Puffer und Inkubation mit 3 ml Puffer für 10 min bei 37°C.

Daraufhin wurde der Puffer abgesaugt und die Coverslips mit 200 µl monoklonalem PTHrP-Antikörper, welcher zuvor in HEPES-Puffer 1:100 verdünnt wurde, überschichtet.

Die Schalen wurden nun für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend erneut dreimal mit HEPES gewaschen. Daran schloß sich eine weitere Inkubation für 10 min bei 37°C in 3 ml HEPES an. Nach dieser Inkubation wurde jedes Coverslip mit 200 µl einer mit HEPES 1:200 verdünnten anti-mouse-IgG-Lösung, welche außerdem mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC markiert war, überschichtet und für zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit HEPES gewaschen und die Schalen über Nacht bei 4°C mit 2 ml HEPES-Puffer aufbewahrt. Entweder wurden die Coverslips danach noch zwecks Kernfärbung mit HOE 33258 in einer Konzentration von 5 µg/ml für 15 min gefärbt oder direkt mit 10-15µl HEPES-gepuffertem Glycerin blasenfrei auf einen mit Alkohol entfetteten Objektträger aufgebracht.

HEPES-Puffer

NaCl	125 mM
KCl	2,6 mM
MgCl ₂	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
HEPES	25 mM

pH 7,4; sterilfiltriert

3.8 DIG Glycan Detection Assay

Dieses Immunoassay diente zum Nachweis von Zuckern in Glykokonjugaten. Die Proben, welche zum einen Teil aus Proteinen aus dem Zytosol und zum anderen Teil aus den Kernextrakten stammten, wurden wie in den Abschnitten 3.3.2 bzw. 3.3.4 erläutert hergestellt. Diesen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, und anschließend im Western-Blot-Verfahren geblottet (Abschnitt 3.4.3).

Danach wurde die Membran mit ca. 50 ml PBS (pH 6,5) gewaschen, gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation in 10 mM Natriummetaperjodat, in Natriumacetat-Puffer, (pH 5,5) bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde dreimal je 10 min mit ca. 50 ml PBS gewaschen. Im Anschluß wurde 1 µl DIG-3-O-succinyl-ε-aminocapronsäure-hydrazid, gelöst in 5 ml Natriumacetat-Puffer (pH 5,5), für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran einwirken gelassen.

Dann wurde wiederum dreimal mit ca. 50 ml PBS gewaschen und die Membran für mind. 30 min mit der Blockierungslösung inkubiert. Nun erfolgte ein dreimaliges Waschen mit ca. 50 ml TBS und danach eine einstündige Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten, konjugiert mit alkalischer Phosphatase.

Erneut wurde daraufhin dreimal mit TBS gewaschen, bevor schließlich folgende Färbelösung auf die Membran gegeben wurde:

10 ml Tris-Puffer (pH 9,5) + 200 µl NBT/BCIP-Lösung

Die Farbreaktion (grau bis schwarz) benötigte von wenigen Minuten bis zu einigen Stunden und wurde durch Waschen der Membran in aqua bidest gestoppt. Die Auswertung erfolgte analog der anderen im Western-Blot-Verfahren gewonnenen Membranen.

3.9 Proliferations-Assay

Abhängig vom Versuchsprotokoll wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.3 beschrieben trypsiniert und auf Mikrotiterplatten mit geradem Boden (Falcon Typ 3072) ausplattiert und induziert. Die Zelldichte betrug ca. 3×10^4 pro Well. Nach 48 h Inkubation wurde das Kulturmedium abgesaugt und jedes Well 30 min mit 50 µl 3%igem (vol/vol) Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Absaugen erfolgte das Anfärben mit je 50 µl 1%igem (wt/vol) Methylenblau gelöst in 1xTBE für 30 min bei Raumtemperatur.

10x TBE-Puffer

Tris	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	0,02 M

Danach wurden die Wells fünfmal mit je 200 µl 1x TBE gewaschen und 100 µl Ethanol/HCl (1:1) dazugegeben. Im ELISA-Reader erfolgte dann die Messung der Proteinmenge als Extinktion bei 630 nm.

3.10 Apoptose-Induktion

3.10.1 UV-Bestrahlung

Die Endothelzellen wurden dem Versuchsprotokoll entsprechend wie in dem Abschnitt 3.3 beschrieben ausplattiert und inkubiert. In Abhängigkeit vom Konfluenzstadium des Zellrasens wurden die Schalen am 1. bzw. 3. Tag nach dem Ausplattieren mit 80 J/m^2 UV-Licht bei 254 nm im UV-Stratalinker bestrahlt, um so einen programmierten Zelltod hervorzurufen. Danach wurden sie erneut für 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde das Kulturmedium abgesaugt und 1 ml $1\times$ PBS auf die Schalen gegeben.

3.10.2 Chromatin-Färbung

Zum Anfärben des Chromatins wurde der Fluorochromfarbstoff HOE 33258 (Absorptionsmaximum bei 346 nm , Emissionsmaximum bei 460 nm) in einer Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Auswertung der Apoptoserate im Fluoreszenzmikroskop. Die intakten Zellen wurden nur sehr schwach und diffus blau angefärbt, wohingegen die apoptotischen Zellen deutlich angefärbte Chromatinbündel aufwiesen. Pro Schale wurden dann von den drei Bedingungen (Kontrolle, plus Antisense-Oligonucleotide, plus Sense- Oligonucleotide) jeweils 5 Gesichtsfelder ausgezählt und die darin enthaltene Apoptoserate berechnet.

3.11 Denudierte Aortenringe

Die Aortenringpräparate wurden einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen und danach in Flüssigstickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Ringe in Flüssigstickstoff zermörsert und in 1 ml Aorten-Lysispuffer aufgenommen. In den darauffolgenden 10 min wurden die Proben immer wieder kurz gemischt und schließlich bei 2000 x g für 2 min zentrifugiert.

Im Überstand befand sich nun die Proteinlösung, welche mit Bromphenol-Blau 1:1 versetzt, für 10 min bei 65°C erhitzt und danach bei -18°C eingefroren wurde.

Aorten-Lysispuffer

Tris/HCl	10 mM
Sucrose	250 mM
EDTA	1 mM
Pyridoxalphosphat	0,5 mM
pH 7,3	

3.12 Statistik

Aus n unabhängigen Experimenten wurden die Meßwerte als Mittelwerte \pm der Standardabweichung (SD) oder dem Standardfehler vom Mittelwert (SEM) angegeben. Beim Vorliegen von statistischen Differenzen innerhalb einer Gruppe wurden durch Varianzanalysen (ANOVA) und durch nachfolgenden Student-Newmann-Keuls-Test das Signifikanzniveau ermittelt (Godfrey *et al.*, 1985; SAS/STAT., 1992). Als statistisch signifikant galten Differenzen von $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluß von Phenylephrin auf die Expression von PTHrP in koronaren Endothelzellen

4.1.1 Abhängigkeit vom Alter der Kulturen

In der ersten Untersuchungsreihe wurde untersucht, ob eine Stimulation der α -Adrenorezeptoren durch Phenylephrin die PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen induziert. Die koronaren Endothelzellen wurden aus Ventrikeln von Rattenherzen isoliert und bis zum Konfluenzstadium heranwachsen gelassen. Danach wurden sie in der ersten Passage erneut auf Kulturschalen herangezogen und mit Phenylephrin in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert. Diese Behandlung erfolgte entweder für 24 h (subkonfluent, Tag 1) oder 48 h (konfluent, Tag 2) nach Ausplattieren. Abbildung 1 zeigt eine repräsentative Phasenkontrastphotographie von koronaren Endothelzellen am Tag 1 und 2. Die Zellen wurden jeweils am darauffolgenden Tag geerntet und auf PTHrP-Expression hin untersucht. Phenylephrin induzierte an nicht-konfluenten Kulturen die Expression von PTHrP aber nicht an konfluenten Zellen (Abb.2 und 3).

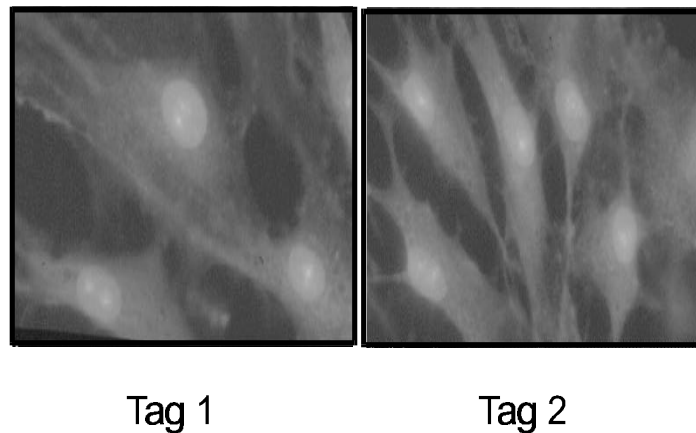


Abb. 1 : Repräsentative mikroskopische Aufnahme (400-fache Vergrößerung) von koronaren Endothelzellen am Tag 1 und Tag 2 nach Ausplattieren auf Kulturschalen.

Phenylephrin erzeugte einen Anstieg in der Expression um 36 ± 16 % bei Stimulation am Tag 1 (Abb.2+3). Bei Stimulation der Endothelzellen am Tag 2 nahm die Expression um 19 ± 8 % (Abb. 2+3) ab.

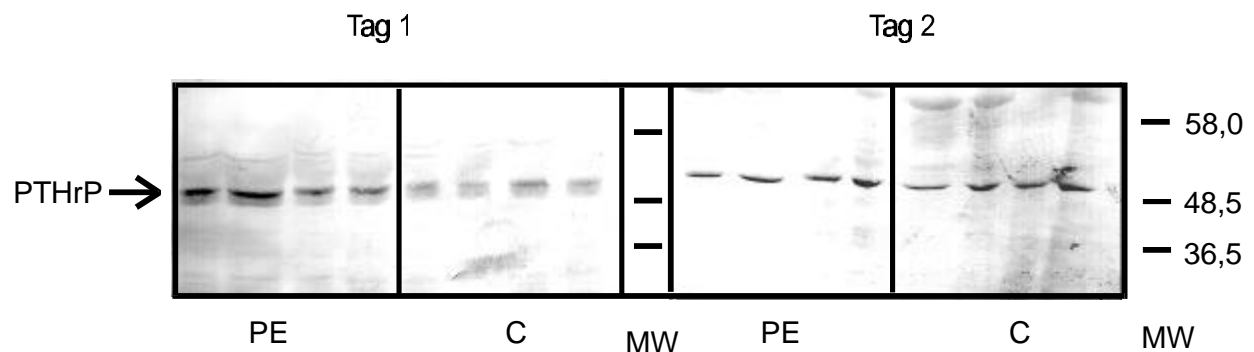


Abb. 2 : Einfluß von Phenylephrin auf die PTHrP-Expression in isolierten koronaren Endothelzellen unter subkonfluenten (Tag 1) oder konfluenten (Tag 2) Bedingungen stimuliert.

Das Bild zeigt einen repräsentativen Western Blot. Die Zellen wurden jeweils für 24 h mit 1 μ M Phenylephrin (PE) stimuliert oder unter Kontrollbedingungen (C) inkubiert. Der Pfeil zeigt das PTHrP an, welches vom Antikörper erkannt wurde und MW zeigt die Position des Molekulargewichtsmarkers an.

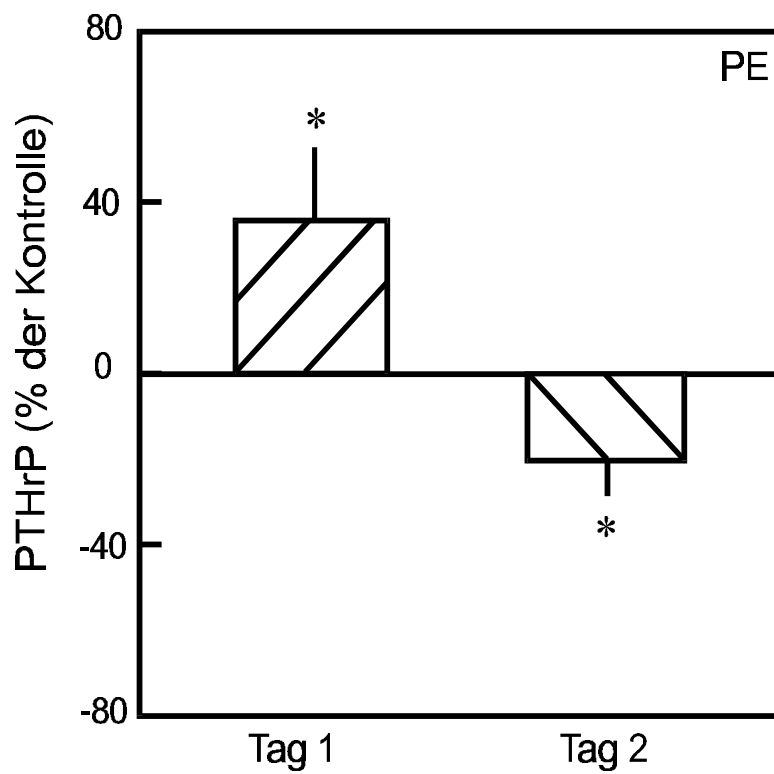


Abb. 3 : Quantifizierung der PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen , welche wie unter 2 beschrieben induziert wurden.

Die Daten zeigen Mittelwerte \pm der S.E.M. aus n=4 ermittelt.

*** = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.**

4.1.2 Einfluß von Actinomycin D auf die Wirkung von Phenylephrin

In den folgenden Experimenten wurden die Zellen im Wachstumsstadium (Tag 1-Kultur) induziert, um die Expression von PTHrP zu steigern. Trotz Actinomycin D (5 μ M), einer Substanz, welche die Induktion der Expression von Genen auf Tanskriptionsebene hemmt, war die PTHrP-Expression durch Phenylephrin induzierbar (Abb. 4).

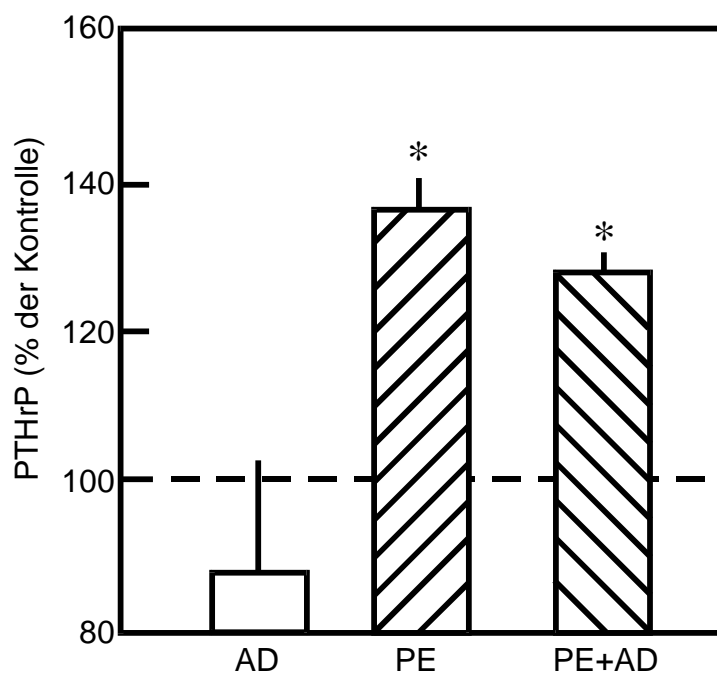


Abb. 4 : Einfluß von Actinomycin D (AD, 5 μ M) auf die durch Phenylephrin (PE, 1 μ M) induzierte Expressionssteigerung des PTHrP in isolierten koronaren Endothelzellen. Die Zellen wurden am Tag 1 stimuliert.

Daten wurden aus n=4 als Mittelwert \pm der S.E.M. ermittelt.

*** = p < 0,05 vs. Kontrolle**

4.1.3 Bestimmung der Halbwertszeit von PTHrP in koronaren Endothelzellen

In Anwesenheit von Cycloheximid (Chx), welches auf der Ebene der Translation inhibiert, konnte man eine sukzessive Abnahme erkennen. Die daraus berechnete Halbwertszeit für PTHrP betrug $t_{1/2} = 16,40 \pm 3,22$ h (bei $n=4$), d.h. daß im Mittel nach 16 h und 24 min nur noch die Hälfte an intrazellulärem PTHrP vorhanden ist, wenn eine Neubildung verhindert wird.

Aus den unter 4.1.2 und 4.1.3 beschriebenen Versuchen läßt sich schlußfolgern, daß eine Stimulation der α -Adrenorezeptoren zu einer gesteigerten PTHrP-Expression in wachsenden koronaren Endothelzellen führt, die unabhängig von einer de novo-Transkription ist.

4.2 Einfluß von Angiotensin II auf die Expression von PTHrP in koronaren Endothelzellen

Im Gegensatz zu dem expressionssteigernden Effekt des Phenylephrin konnte Angiotensin II in einer Konzentration von 10 μM die Expression von PTHrP zu keinem Zeitpunkt beeinflussen (104 ± 26 % bzw. 94 ± 29 % gegenüber Kontrolle an Tag 1 bzw. Tag 2). Abbildung 5 zeigt einen repräsentativen Immunoblot, der die expressionssteigernde Wirkung von Phenylephrin in Tag1-Kulturen noch einmal bestätigt, aber keine Veränderungen durch Angiotensin II erkennen läßt.

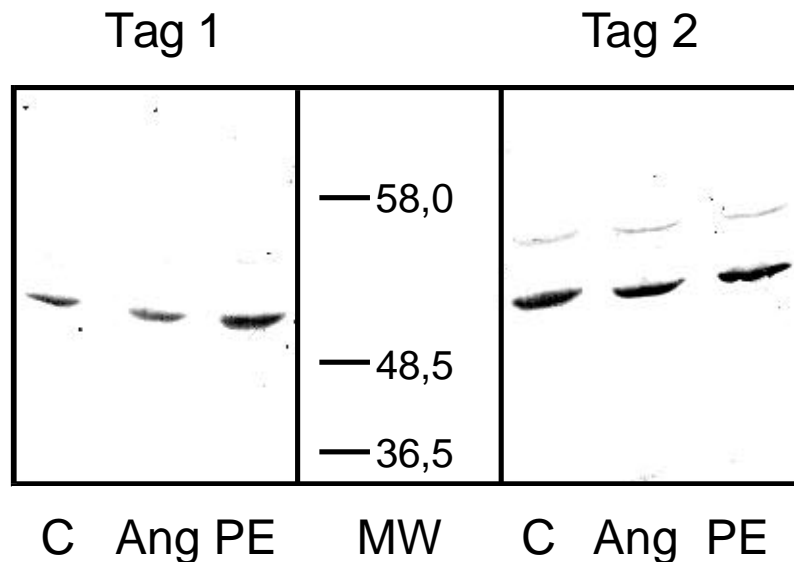


Abb. 5 : Einfluß von Angiotensin II (Ang, 10 μM) auf die PTHrP-Expression in isolierten koronaren Endothelzellen unter subkonfluenten (Tag 1) oder konfluenten (Tag 2) Wachstumsbedingungen stimuliert. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen auch mit Phenylephrin (PE, 1 μM) stimuliert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen.

MW zeigt hierbei die Position des Molekulargewichtsmarkers an.

4.3 Charakterisierung des beteiligten alpha-adrenergen Rezeptor-Subtyps

4.3.1 Rezeptorcharakterisierung an koronaren Endothelzellen

In der zweiten Untersuchungsreihe wurde der an der Phenylephrin-induzierten Steigerung der PTHrP-Expression beteiligte α -Adrenorezeptorsubtyp charakterisiert. Aus diesem Grund wurden Versuche in An- bzw. Abwesenheit von Yohimbin (1 μ M), einem α_2 -Rezeptorantagonisten, oder von Prazosin (1 μ M), einem α_1 -Rezeptorantagonisten, durchgeführt. Die Zellen wurden wie vorher beschrieben nach Tag 1 mit Phenylephrin (1 μ M) stimuliert.

Beide Antagonisten nahmen keinen Einfluß auf die basale Expression des PTHrP in koronaren Endothelzellen; jedoch antagonisierte Prazosin, im Gegensatz zum Yohimbin, die durch Phenylephrin induzierte Expressionsteigerung (Abb. 6).

Zur Charakterisierung der α_1 -Rezeptorsubtypen in koronaren Endothelzellen wurden [³H]-Prazosin-Bindungsstudien durchgeführt. Die Bindungskapazität für [³H]-Prazosin wurde mit 23,8 \pm 4,8 fmol/mg Protein (n=4) ermittelt. Die Bindungsaffinität betrug 210 pM (K_{DB}).

Nach Vorinkubation der koronaren Endothelzellen mit Chlorethylclonidin (CEC) in einer Konzentration von 30 μ M für 30 min sank die Prazosinbindungskapazität auf 11,2 \pm 1,8 fmol/mg Protein (n=4). Die Bindungsaffinität blieb unverändert (K_D =191 pM). Chlorethylclonidin verursacht eine irreversible Alkylierung der α_{1B} - und α_{1D} -Rezeptoren. Das bedeutet, daß ungefähr 53 % der α_1 -Rezeptoren in den koronaren Endothelzellen der Ratte vom α_{1A} -Subtyp sind.

Diese Ergebnisse ließen sich in Versuchen, in denen der α_{1A} -Rezeptorantagonisten 5-Methylurapidil (5-MU) [³H]-Prazosin konzentrationsabhängig verdrängte, bestätigen. 5-MU zeigte ein biphasisches Muster, mit einer hochaffinen und einer niedrigaffinen Bindungsstelle (pK_B 8,64 bzw. 6,47). Konzentrationen über 100 nM waren nötig, um das spezifisch gebundene [³H]-Prazosin komplett zu verdrängen, während eine Konzentration des 5-MU bis zu 30 nM nur ca. 45 % des [³H]-Prazosin verdrängte.

Der α_{1D} -Rezeptorantagonist BMY 7378 verdrängte das [3 H]-Prazosin mit einem monophasischen Muster und einer pK von 7,55.

4.3.2 Einfluß von 5-Methylurapidil, Chlorethylclonidin und BMY 7378 auf die PTHrP-Expression

Basierend auf den [3 H]-Bindungsstudien wurden 5-MU, CEC und BMY 7378 zur Charakterisierung der bei der Phenylephrin-vermittelten Steigerung der PTHrP-Expression beteiligten α_1 -Rezeptor-Subtyps herangezogen. In Gegenwart von 30 nM 5-MU, was eine 10-fach höhere Konzentration des pK_B -Wertes für die α_{1A} -spezifische hochaffine Bindungsstelle darstellt, konnte Phenylephrin keine gesteigerte Expression von PTHrP in heranwachsenden koronaren Endothelzellen hervorrufen (Abb. 6).

Im Gegensatz dazu beeinflussten 100 nM BMY 7378, d.h. 5-fach höher konzentriert als sein pK_B -Wert, nicht die PTHrP-Expression (Abb. 6). Weder 5-MU noch BMY 7378 verursachten eine Änderung in der basalen Expression.

Demgegenüber wurde die Basalexpression des PTHrP in Endothelzellen durch Vorinkubation mit 30 μ M CEC für 30 min geringfügig erhöht. Trotzdem gelang es Phenylephrin, die PTHrP-Expression in diesen Zellen noch zu steigern (Abb.6).

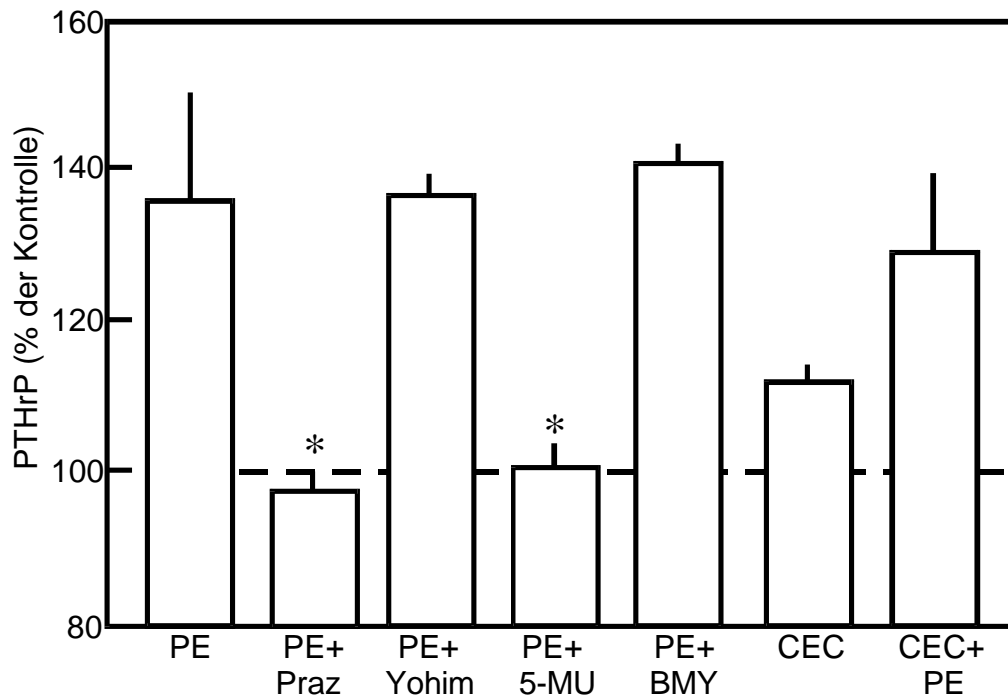


Abb. 6 : Einfluß von α -Rezeptor-Antagonisten auf die Phenylephrin-induzierte Expressionssteigerung des PTHrP in koronaren Endothelzellen. Die Stimulation mit 1 μ M PE erfolgte am Tag 1 in Gegenwart von 1 μ M Prazosin (Praz), 1 μ M Yohimbin (Yohim), 30 nM 5-MU oder 100 nM BMY 7378.

Im Fall des CEC wurden die koronaren Endothelzellen für 30 min mit der Substanz vorinkubiert, die Zellen gewaschen und danach mit 1 μ M PE für 24h inkubiert. Die Antagonisten - mit Ausnahme des CEC - führten zu keiner Veränderung der Basalexpression.

Daten wurden aus 4-6 Zellpräparationen als Mittelwerte \pm der S.E.M. ermittelt.

* = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4 Einfluß einer gesteigerten Expression auf die Freisetzung von PTHrP

Da in den verschiedenen PTHrP-exprimierenden Zelltypen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der basalen Freisetzung von PTHrP in den Überstand nachgewiesen wurde, richteten wir unser Augenmerk auf das Verhalten der koronaren Endothelzellen. Deshalb untersuchte ich Zellen, welche einerseits durch Phenylephrininkubation eine gesteigerte Expression an PTHrP aufwiesen als auch die entsprechenden Kontrollzellen, sowie die jeweils dazugehörigen Kulturüberstände.

Eine gesteigerte Expression von PTHrP in den koronaren Endothelzellen führte jedoch nicht zu einer Freisetzung des Peptidhormones (Abb. 7).

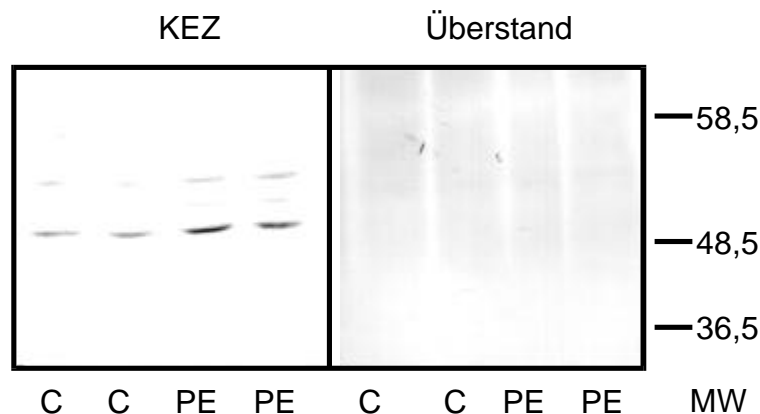


Abb. 7: Einfluß der Phenylephrin-induzierten Expressionssteigerung von PTHrP auf die basale PTHrP-Freisetzung in isolierten koronaren Endothelzellen.

Gezeigt wird ein repräsentativer Western Blot der PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen (KEZ) (links) am Tag 1 mit 1 μ M PE stimuliert oder unter Kontrollbedingungen, sowie der Überstand (rechts) dieser Zellkulturen. MW zeigt die Position des Molekulargewichtsmarkers an.

4.5 Immunohistochemische Charakterisierung von PTHrP in koronaren Endothelzellen

4.5.1 Abhängigkeit vom Alter der Kulturen

Als nächstes wurde mit Hilfe der Immunhistochemie der Frage der intrazellulären Lokalisation des PTHrP in koronaren Endothelzellen nachgegangen. Im Stadium mit geringer Zelldichte fand sich das Peptidhormon diffus im Zytoplasma oder in der Nähe der Plasmamembran (Abb.8). Wohingegen im Stadium mit einer hohen Zelldichte ein signifikanter Anteil des PTHrP in den Kern transloziert wurde (Abb.8).

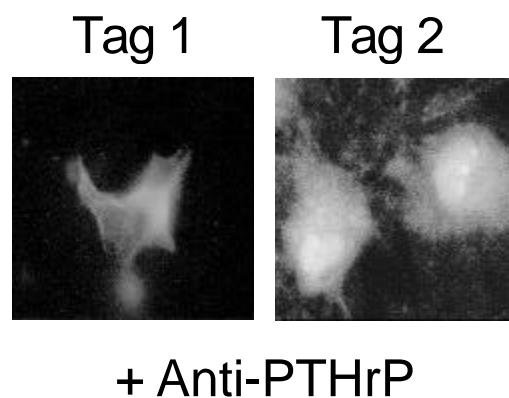


Abb.8 : Nukleäre Lokalisation des PTHrP in koronaren Endothelzellen.
Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Endothelzellen, welche am Tag 1 bzw. 2 mit einem Erstantikörper und einem Zweitantikörper (Anti-PTHrP) (TRITC-markiert) inkubiert wurden.

4.5.2 Nukleäre Lokalisation von PTHrP in konfluenten Kulturen

Dieses Färbemuster wurde durch eine Doppelfärbung der Zellen sowohl mit Anti-PTHrP als auch mit dem Kernfarbstoff HOE 33258 bestätigt (Abb. 9).

Koronare Endothelzellen wurden schließlich am Tag 1, 2 und 3 geerntet, die Gesamt- oder Kernproteine im SDS-Gel aufgetrennt und durch das Immunoblot-Verfahren analysiert. Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurde PTHrP konstant im Gesamtproteinextrakt - jedoch erst ab dem 2. Tag im Kernextrakt - gefunden.

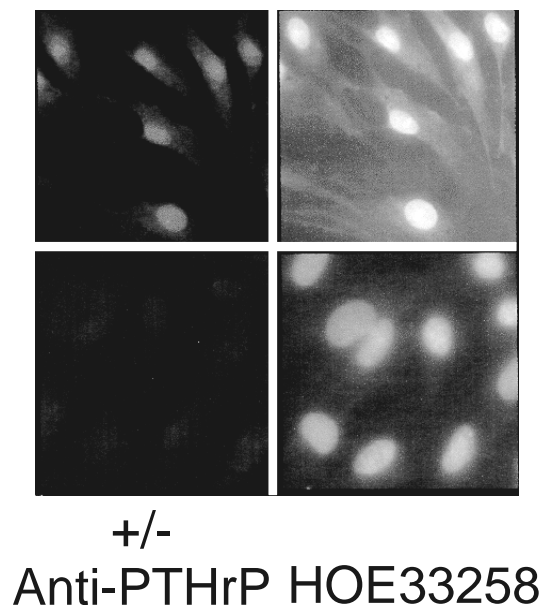


Abb. 9 : Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellkulturen am Tag 2. Links: Inkubation mit anti-PTHrP und anschließend IgG-TRITC (links oben) oder nur mit IgG-TRITC (links unten). Rechts: Die gleichen Zellen mit HOE 33258 angefärbt.

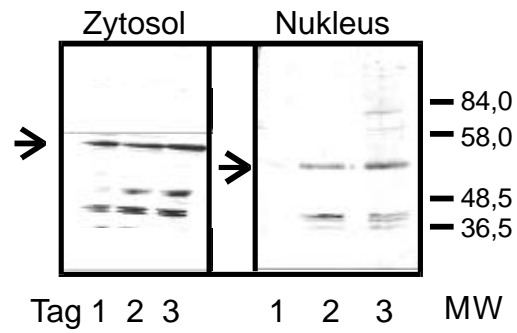


Abb. 10 : Repräsentativer Western Blot zellulärer PTHrP-Expression in kultivierten Endothelzellen am Tag 1, 2 und 3 geerntet.

Links: Gesamtproteinextrakt Rechts: Kernproteinextrakt

Der Pfeil zeigt das detektierte PTHrP an.

4.6 Biochemische Charakterisierung des nukleären PTHrP

Wie in Abb. 10 ersichtlich, besitzt das PTHrP im Kern ein geringeres Molekulargewicht als das PTHrP im Gesamtproteinextrakt. Da zytosolisches PTHrP posttranslational glykosiliert wird, wurde untersucht, ob das nukleär lokalisierte PTHrP ähnlich modifiziert ist. Bestätigt wurde diese Hypothese durch den DIG Glycan-Detection-Assay, welcher den Zucker in Glycokonjugaten nachweist (Abb. 11).

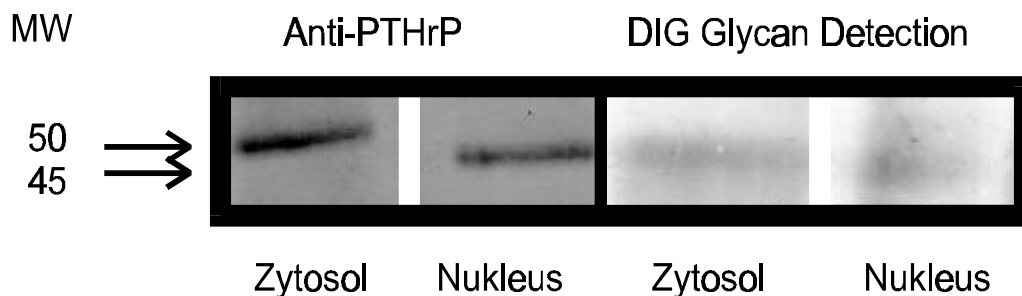


Abb. 11 : Repräsentative Western Blots des PTHrP (links) und der Glucokonjugate (rechts) in Extrakten aus koronaren Endothelzellen am Tag 2, jeweils für Gesamtprotein- und Kernextrakt.

MW zeigt die Position des Molekulargewichtsmarkers an.

4.7 Einfluß einer Herabregulierung von PTHrP auf koronare Endothelzellen

4.7.1 Einfluß von Antisense-Transfektion auf die PTHrP-Expression

Um die Rolle des PTHrP für die Proliferation oder Apoptose in koronaren Endothelzellen zu untersuchen, transfizierte ich diese entweder mit Sense oder mit Antisense Oligonucleotiden direkt gegen PTHrP.

Innerhalb von 24 h verursachte eine Transfektion mit Antisense Oligonucleotiden gegen PTHrP eine signifikante Verminderung der endogenen PTHrP-Expression, verglichen mit den mit Sense Oligonucleotiden transfizierten Endothelzellen (Abb. 12).

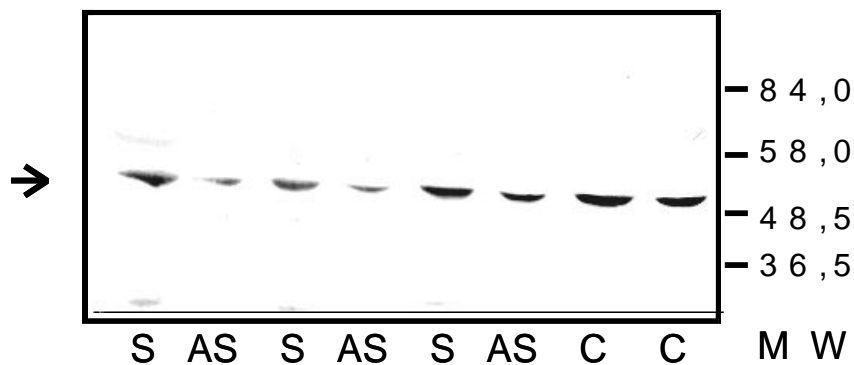


Abb. 12 : Einfluß der Transfektion mit Antisense Oligonucleotiden auf die endotheliale PTHrP-Expression. Repräsentativer Western Blot, welcher die PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen 24 h nach Ausplattieren und Transfizieren mit Sense (S) oder Antisense (AS) Oligonucleotiden verglichen mit nicht transfizierten Zellen darstellt.

C = Kontrolle

MW zeigt die Position des Molekulargewichtsmarkers an.

4.7.2 Einfluß auf die Zellproliferation

Die basale Proliferation der koronaren Endothelzellen änderte sich nicht durch eine hohe oder niedrige PTHrP-Expression (Abb. 12). Zellen, welche mit Phenylephrin inkubiert wurden, wiesen eine gesteigerte Proliferation auf, die jedoch von der Transfektion mit Sense bzw. Antisense Oligonucleotiden und somit einer Änderung der endogenen PTHrP-Expression unbeeinflusst blieb (Abb. 13).

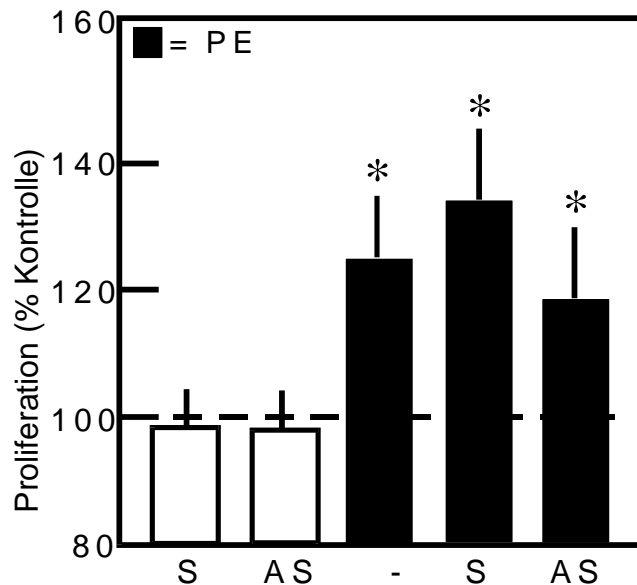


Abb. 12 : Einfluß einer Transfektion mit Antisense Oligonucleotiden (AS, 10µg/ml) auf die basale Zellproliferation (weiße Balken) oder nach Induktion mit 1 µM Phenylephrin (PE, schwarze Balken).

Phenylephrin stimuliert die Proliferation von Endothelzellen, läßt sich aber durch PTHrP-Sense bzw. -Antisense Oligonucleotiden nicht beeinflussen.

Daten wurden aus n=10-15 Kulturschalen als Mittelwerte \pm der S.E.M. ermittelt.

*** = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.**

4.7.3 Einfluß auf den programmierten Zelltod (Apoptose)

Schlußendlich untersuchte ich den Einfluß der PTHrP-Expression im Hinblick auf die Protektion der Zelle vor Apoptose. Die Zellen wurden dafür am Tag 1 (keine Kernlokalisierung des PTHrP) UV-Licht ausgesetzt und erwiesen sich als sensitiv für Apoptoseinduktion. Unter diesen Bedingungen stieg die Zahl der Apoptoserate von basal $4,95 \pm 1,65\%$ auf induziert $8,90 \pm 1,65\%$ ($n=3$, $p < 0,05$). Eine Vorbehandlung dieser Zellen mit Sense oder Antisense Oligonucleotiden führte zu keiner Änderung in der UV-bedingten Apoptoserate (Abb. 13). Wenn es durch Phenylephrin-Inkubation zu einer gesteigerten PTHrP-Expression kam, sank die basale Apoptoserate auf $1,32 \pm 1,65\%$. Sogar unter der Bedingung einer UV-Bestrahlung stieg die Apoptoserate nur auf $4,62 \pm 2,31\%$.

Diejenigen Zellen, die am Tag 2 (mit Kerntranslokation des PTHrP) UV-Licht ausgesetzt wurden, hatten signifikant niedrigere Apoptoseraten ($2,23 \pm 0,19\%$). Nach Herunterregulierung der PTHrP-Expression durch Transfektion mit Antisense-Oligonucleotiden stieg die Zahl der apoptotischen Zellen nach UV-Bestrahlung um $42 \pm 8\%$ (Abb. 13). Demgegenüber hatte die Transfektion mit Antisense Oligonucleotiden keinen Einfluß auf die Basalrate der Apoptose ohne UV-Bestrahlung.

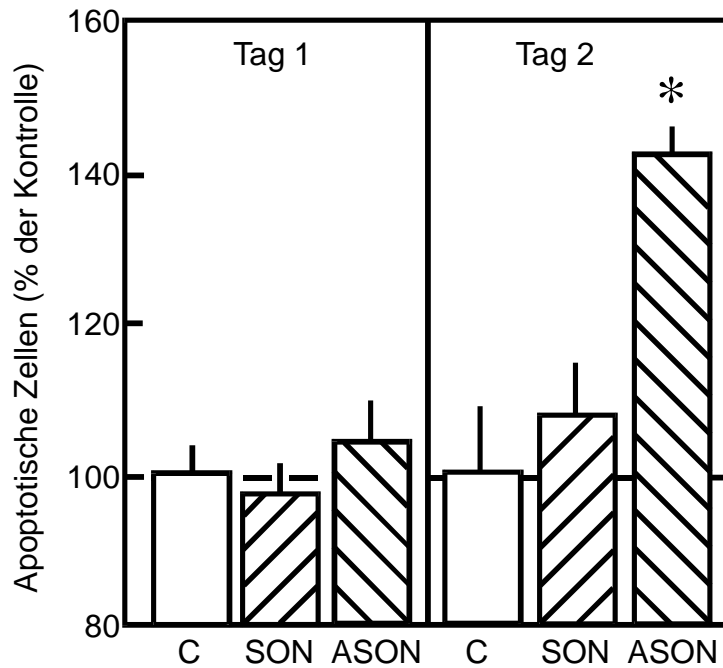


Abb. 13 : Einfluß von Transfektion mit Antisense Oligonucleotiden auf UV-induzierte Apoptose in Endothelzellen. Zellen wurden mit Sense (SON) oder Antisense (ASON) Oligonucleotiden transfiziert und anschließend am Tag 1 bzw. Tag 2 UV-Licht ausgesetzt (254 nm, 80 J/m²). Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurden durch Auszählen der Zellen mit deutlicher Chromatinkondensation gegenüber der Gesamtzellzahl ermittelt. Der 100%-Wert (UV-induzierte Apoptose) korrespondiert zu $8,90 \pm 1,65\%$ (Tag 1) und $2,23 \pm 0,19\%$ (Tag 2).

Die Daten wurden aus n=3 Präparationen als Mittelwerte \pm der S.E.M. ermittelt.

* = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.8 Herabregulierung von PTHrP in koronaren Endothelzellen durch TGF- β_1

Von der Tatsache ausgehend, daß der Transforming growth-factor β_1 (TGF- β_1) in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Effekte auf die mRNA des PTHrP ausübt (z. B. erfolgt eine Stimulation der mRNA-Expression in sich entwickelnden Chondrozyten oder eine Inhibierung der mRNA-Level in immortalisierten enchondralen Chondrozyten der Maus), untersuchte ich seinen Effekt auf koronare Endothelzellen. Deshalb inkubierte ich die Zellen mit TGF- β_1 in ansteigenden Konzentrationen am Tag 1 und analysierte die dadurch bedingte PTHrP-Expression (Abb. 14A+B). Die Stimulation mit TGF- β_1 führte zu einem konzentrationsabhängigen Abfall des Proteingehaltes innerhalb von 24 h. Bei einer Konzentration von 30 ng/ml TGF- β_1 liegt nur noch ungefähr 50 % des PTHrP in den Endothelzellen vor.

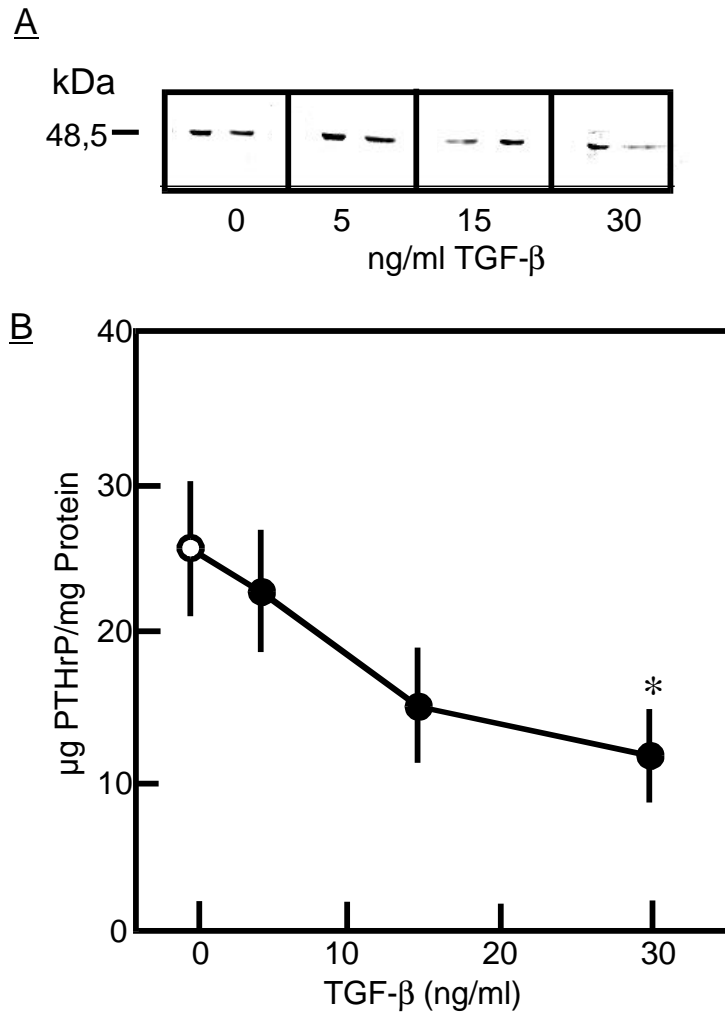


Abb. 14 : A) Repräsentativer Immunoblot der PTHrP-Expression koronarer Endothelzellen nach Inkubation mit TGF- β_1 am Tag 1 für 24 h in den angegebenen Konzentrationen.

B) Quantifizierung des PTHrP-Gehaltes pro Proteingehalt aus den Ergebnissen von A).

Die Daten wurden als Mittelwerte \pm der S.E.M. aus n=4 ermittelt.

*** = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.**

4.9 Einfluß von Angiotensin II und Phenylephrin auf die Expression von PTHrP in denudierten Aortenringpräparaten

Zum Schluß wurden vergleichende Untersuchungen zum Expressionsverhalten von PTHrP nach Stimulation der α -Rezeptoren bzw. der Angiotensin-II-Rezeptoren an vaskulären Glattmuskelzellen durchgeführt. Um diese Zellen unter Beibehaltung ihrer Zell-Zell-Kontakte zu untersuchen, zerstörte ich die Endothelschicht von Aortenringen der Ratte und inkubierte diese anschließend für 24 h mit 1 μ M Phenylephrin bzw. 10 μ M Angiotensin II. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die man aus den Endothelzellen erhalten hat, erfolgte hier durch Inkubation der denudierten Aortenringpräparaten mit Phenylephrin keine Expressionssteigerung ($113 \pm 37\%$), wohingegen Angiotensin II signifikant die PTHrP-Expression ($161 \pm 4\%$) in den Präparaten steigerte (Abb. 15).

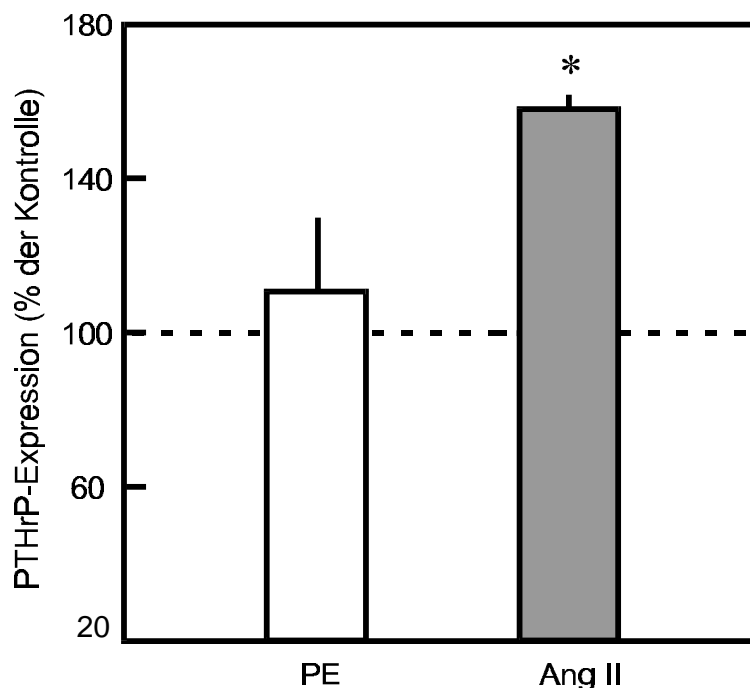


Abb. 15 : Einfluß von Phenylephrin (PE, 1 μ M) bzw. Angiotensin II (Ang II, 10 μ M) auf die PTHrP-Expression in denudierten Aortenring-Präparaten.

Die Daten wurden aus $n = 4$ als Mittelwerte \pm der S.E.M. ermittelt.

* = $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

5. Diskussion

5.1 Hauptbefunde

Die Studie untersuchte die Rolle einer α -Adrenozeptor-Stimulation auf die Expression von PTHrP in den koronaren Endothelzellen.

Die Hauptbefunde der Ergebnisse sind zum einen die Phenylephrin-induzierte Expressionssteigerung des Peptidhormones über eine Stimulation der α_{1A} -Adrenozeptoren in proliferierenden koronaren Endothelzellen und zum anderen, daß eine erhöhte Expression des PTHrP in diesem Zelltyp einen erhöhten Apoptoseschutz hervorbringt (s. Abschnitt 4.3.2 bzw. 4.7.3).

Daraus lassen sich als neue Erkenntnisse gewinnen, daß die PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen nicht nur eine Quelle für das ventrikuläre PTHrP - welches möglicherweise auf parakrinem Weg mit den Nachbarzellen agiert - darstellt, sondern ebenfalls einen wichtigen intrakrinen Effekt auf diese Zellen ausübt.

5.2 Expression von PTHrP im Gefäßbett

Weder die Regulation seiner Expression durch Adrenozeptor-Stimulation noch seine Rolle für die koronaren Endothelzellen wurden bisher untersucht. Ich konnte zeigen, daß eine α_{1A} -Adrenozeptor-Stimulation in einer erhöhten PTHrP-Expression resultiert. Diese Beobachtung stimmt mit einer bereits bestehenden allgemeinen Annahme überein, daß eine Induktion von PTHrP durch konstringierende Substanzen einen kurzen Rückkopplungsmechanismus darstellt. Hierbei würde die

lokale vasorelaxierende Wirkung des Peptidhormones der drucksteigernden Aktivität des Angiotensin II und anderer konstringierender Substanzen entgegentreten.

Solch eine allgemeine Schlußfolgerung erscheint aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse nicht gerechtfertigt. Zum einen fand sich kein deutlicher Effekt durch andere Vasokonstriktoren wie Angiotensin II bezüglich der Expression des PTHrP in den koronaren Endothelzellen (Abb.5). Zum anderen ließ sich nicht immer mit Phenylephrin eine Expressionssteigerung hervorrufen, da sie sich nur auf proliferierende Endothelzellen beschränkte (Abb.2).

Im Gegensatz dazu wurde mit Hilfe des Angiotensin II eine Steigerung in der PTHrP-Expression in glatten Muskelzellen erzielt (22,32). Folglich erfolgt die Regulation der Expression dieses Peptidhormones in Endothel- und glatten Muskelzellen zelltypspezifisch.

5.3 Intrakrine Wirkungen von PTHrP

Es wurde angenommen, daß die endotheliale PTHrP-Expression eine Rolle bei der Angiogenese spielen könnte, da Phorbol ester die Differenzierung und Tubenformation von Endothelzellkulturen stimuliert und deren Expression von PTHrP steigert (34). Untersuchungen in PTHrP-defizienten Mäusen zeigten das Fehlen einer normalen Vaskularisierungszone in sich entwickelndem Knorpel (14). Ich konnte zeigen, daß TGF- β_1 die PTHrP-Expression in koronaren Endothelzellen herunterreguliert und daß TGF- β_1 die endotheliale Zellproliferation inhibiert (43,49). Demgegenüber erhöht Phenylephrin die Proliferation koronarer Endothelzellen und ihre PTHrP-Expression (Abschnitte 4.1.1 bzw. 4.7.2).

All diese Beispiele lassen eine bedeutende Rolle des endogenen PTHrP im Bezug auf Proliferation von Endothelzellen vermuten. Jedoch stellte sich heraus, daß in den Fällen, in denen die Expression in koronaren Endothelzellen durch Transfektion mit Antisense-Oligonucleotiden gegen PTHrP gesenkt wurde, kein Hinweis auf eine

Abhängigkeit der endothelialen Proliferation von der zellulären PTHrP-Expression vorlag (Abb.12).

Anhand dieser Daten scheint sich die vorher gestellte Annahme nicht zu bestätigen, daß die PTHrP-Expression in Endothelzellen die Angiogenese direkt fördert.

Ein weiteres wichtiges Gebiet der endothelialen Zellbiologie ist die niedrige Anfälligkeit der Endothelzellen gegen Apoptose. Die endotheliale Zellschicht ist dem Blutfluß ausgesetzt und steht somit im direkten Kontakt mit mechanischen und biochemischen Faktoren, welche zu Apoptose führen können. Es konnte gezeigt werden, daß Zerstörung der Endothelzellen durch Apoptose zur Induktion von Atherosklerose beitragen kann und zwar zuerst durch Initiierung des Prozesses und später durch Begünstigung von Plaquerupturen (35).

Wie im Vorfeld gezeigt werden konnte, trägt eine nukleäre Lokalisation von PTHrP in anderen Zelltypen zum Apoptoseschutz bei (7). In Endothelzellen zeigte es sich, daß der Wachstumshemmer TGF- β die endotheliale Apoptose induziert (45) und wir konnten demonstrieren, daß er eine verminderte endotheliale PTHrP-Expression erzeugt (49). Diese Korrelation zwischen dem Verlust der Expression und der Anfälligkeit gegenüber Apoptose läßt einen Zusammenhang vermuten.

Tatsächlich untermauert eine Transfektion koronarer Endothelzellen mit Antisense-Oligonucleotiden gegen PTHrP diesen Zusammenhang, da eine Reduzierung endogener PTHrP-Expression von einer höheren Anfälligkeit gegenüber Apoptose begleitet wurde. Phenylephrin hingegen erhöhte die Expression des Peptidhormones, reduzierte jedoch sowohl die basale als auch die UV-induzierte Apoptose der Endothelzellen (Abschnitt 4.7.3).

Der genaue Mechanismus, über welchen endogenes PTHrP die koronaren Endothelzellen gegenüber Apoptose schützt, muß noch aufgeklärt werden. In meiner Studie zeigte sich, daß die koronaren Endothelzellen im Besonderen gegen UV-induzierte Apoptose in den Zellen geschützt waren, in denen das PTHrP-Protein im Kern vorgefunden wurde (Tag 2-Kulturen). Diese Daten lassen eine wichtige Rolle des PTHrP für die endotheliale Differenzierung vermuten. Des weiteren spielt eine

Stimulation der α -Adrenozeptoren eine wichtige Rolle bei der Vermittlung dieses Effektes.

Beides, Expression und nukleäre Translokation des Peptidhormones, werden in anderen Zelltypen ebenfalls zellzyklusabhängig reguliert (17,30).

Im Bezug auf die beobachteten intrakrinen Effekte des PTHrP in koronaren Endothelzellen und seine Modifikation durch α -Adrenozeptor-Stimulation analysierte ich den beteiligten Rezeptorsubtyp, über den Phenylephrin diese Expressionssteigerung induziert, genauer.

Aufgrund der unterschiedlichen Antwort auf Phenylephrin in Gegenwart von Yohimbin und Prazosin, folgt, daß Phenylephrin die PTHrP-Expression durch Stimulation der α_1 -Adrenozeptoren steigert (Abb.6).

Prazosin-Bindungsstudien ergaben eine Bindungsdichte von 23,8 fmol/mg Protein, welche sich mit den Größenordnungen anderer Endothelpräparationen deckt. Von diesen gehören ca. 53% zum α_{1A} -Subtyp, da diese nicht durch Chlorethylclonidin alkyliert und somit inaktiviert werden konnten (Abschnitt 4.3.1).

Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, in denen 5-MU in niedrigen Konzentrationen (in 10-fachem Überschuß verglichen mit dem pK_B seiner high affinity site) ungefähr 45% der Prazosinbindung verdrängt. Vergleichbare Konzentrationen waren nötig, um den durch Phenylephrin induzierten Effekt auf die PTHrP-Expression vollständig zu inhibieren. BMY7378, ein selektiver α_{1D} -Adrenozeptor-Antagonist, beeinflusste die Phenylephrin-Effekte bei einer Konzentration von 100 nmol/l nicht (5-facher Überschuß gegenüber seinem pK_B -Wert). Inaktivierung von α_{1B} - und α_{1D} -Adrenozeptoren mit Chlorethylclonidin verursachte eine geringe Expressionssteigerung, konnte aber die durch Phenylephrin induzierte Expressionssteigerung nicht hemmen. Nimmt man all diese Ergebnisse zusammen, so läßt sich feststellen, daß eine α_{1A} -Adrenozeptor-Stimulation die Expression von PTHrP in proliferierenden koronaren Endothelzellen induziert.

Die Tatsache, daß Phenylephrin den zellulären PTHrP-Gehalt in Gegenwart von Actinomycin D steigert, läßt vermuten, daß dieser Effekt zumindest zum Teil auf post-transkriptioneller Ebene reguliert wird (Abb.4).

Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen in anderen PTHrP-exprimierenden nicht-malignen Zelltypen, einschließlich den glatten Muskelzellen (32).

5.4 Pathophysiologische Relevanz der Befunde

Die Ergebnisse zeigen eine neue Rolle für PTHrP in der Gefäßbiologie auf, da sie einen intrakrinen Effekt von PTHrP in koronaren Endothelzellen nachweisen. Die in diesem Zellsystem gefundenen Daten unterstützen die Idee, daß die lokale Expression des Peptidhormones das Gefäßbett schützt.

Zusätzlich können die koronaren Endothelzellen PTHrP aufgrund bestimmter Stimuli, z. B. unter Hypoxie, freisetzen und somit mit benachbarten Zellen, wie bspw. Kardiomyozyten oder Glattmuskelzellen, interagieren und dadurch die kardialen Funktionen verbessern bzw. den koronaren Widerstand regulieren (36). Nichtsdestotrotz führte eine erhöhte Expression von PTHrP unter Basalbedingungen zu keiner signifikanten Freisetzung des Peptidhormones. Es bleibt noch zu klären, ob eine erhöhte PTHrP-Expression zu einer beschleunigten Freisetzung unter bestimmten Bedingungen, wie Hypoxie, führt.

In Anbetracht der neuen Ergebnisse aus dieser Studie müssen zukünftige Untersuchungen wichtige Fragen im Hinblick auf die in diesen Prozess involvierten molekularen Mechanismen klären.

Welches sind die post-translationalen Mechanismen unter denen Phenylephrin die endotheliale PTHrP-Expression erhöht, mit welchem Mechanismus wird das Peptidhormon in den Kern transportiert, wie sind diese Mechanismen mit der Zellzykluskontrolle verbunden und wie schützt das PTHrP die Endothelzellen gegen Apoptose?

Dies sind wichtige Fragen im Hinblick auf die spezifische Rolle des PTHrP im Gefäßbett wie auch in anderen PTHrP-exprimierenden Zelltypen.

6. Zusammenfassung

Das Parathormon related peptide (PTHrP) wird im gesamten Gefäßsystem einschließlich der koronaren Endothelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu den benachbarten Glattmuskelzellen, welche bislang hinsichtlich PTHrP eingehend untersucht wurden, hat man die koronaren Endothelzellen nur als Produktionsstätte des Ventrikels angesehen. Aus diesem Grund blieben bisher die PTHrP-Expression und seine biologische Rolle in diesen Zellen ungeklärt.

Deshalb habe ich mich dafür interessiert, ob eine Stimulation α -adrenerger bzw. AT-Rezeptoren die Expression in den koronaren Endothelzellen steigert und ob das endogen exprimierte PTHrP einen sogenannten intrakrinen Effekt in diesem Zelltyp ausübt. Besonders interessant ist diese Fragestellung vor dem Hintergrund, daß diese Zellen keine klassischen Zielzellen des Peptidhormones darstellen, da sie nicht den korrespondierenden PTHrP-Rezeptor besitzen, wie das z. B. bei den Glattmuskelzellen der Fall ist.

Was anhand der Ergebnisse gezeigt werden konnte ist die Tatsache, daß durch Stimulation der Zellen mit der α -adrenergen Substanz Phenylephrin im Vergleich zur Stimulation mit Angiotensin II, eine deutliche Steigerung in der Expression des PTHrP hervorgerufen werden konnte. Dieser Effekt konnte jedoch nicht im Stadium der Konfluenz reproduziert werden. Im Gegensatz dazu erhielten wir in den Glattmuskelzellen ein genau umgekehrtes Bild, da hier nur Angiotensin II eine signifikante Expressionssteigerung hervorrief.

Deshalb wollte ich mehr über die Lokalisation des endogenen PTHrP in den verschiedenen Proliferationsstadien mit Hilfe der Immunfluoreszenz in Erfahrung bringen. Die Ergebnisse zeigten, daß der Anteil an PTHrP, welcher in den Kern transloziert wird, umso größer ist, je mehr sich die Zellen dem Konfluenzstadium nähern. Diese Tatsache war für mich Anlaß zu vermuten, daß das Peptidhormon einen intrakrinen Effekt auf die koronaren Endothelzellen ausübt.

Mit Hilfe der Transfektion der Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen PTHrP und der daraus sich ergebenden Herabregulierung seiner Expression untersuchte ich seinen möglichen Einfluß auf die Proliferation bzw. Apoptose.

Im Bezug auf die Proliferation ergaben sich keine Hinweise auf eine Beeinflussung. Bei der Betrachtung der Endothelzellen in den unterschiedlichen Konfluenzstadien konnte mit Hilfe einer UV-Bestrahlung in Zellen, in denen der Anteil des nukleären PTHrP normalerweise erhöht wäre, eine stärkere Apoptoserate als unter Basalbedingungen hervorgerufen werden. Im Gegensatz dazu wurde durch eine erhöhte Expression des PTHrP – welche durch Phenylephrin vermittelt wurde - , der Anteil der apoptotischen Zellen sowohl gegenüber Basalbedingungen als auch unter UV-Induktion deutlich vermindert.

Zusammenfassend läßt sich anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie sagen, daß in koronaren Endothelzellen die PTHrP-Expression durch eine α -Adrenozeptor-Stimulation in einer Zellzyklus-abhängigen und Zelltyp-spezifischen Art und Weise reguliert wird. Diese Studie zeigt eine neue biologische Rolle des PTHrP im Gefäßbett auf, da über den nachgewiesenen intrakrinen Effekt das Peptidhormon einen Anteil am Schutzmechanismus der Endothelschicht vor Apoptose besitzt.

7. Summary

Parathyroid hormone related peptide (PTHrP) is expressed throughout the vascular system including coronary endothelial cells. The regulation of endothelial PTHrP expression and the role of PTHrP expression in endothelial cells is not clear. The present study investigates the question whether stimulation of α -adrenergic or angiotensin II receptors increases endothelial expression of PTHrP and whether endogenously expressed PTHrP exerts intracrine effects in coronary endothelial cells.

It was found that stimulation of α_{1A} -adrenoceptors, but not that of angiotensin II, increases cellular expression of PTHrP in growing, but not in growth arrested, coronary endothelial cells. Angiotensin II increases the expression of PTHrP in smooth muscle cells, but not in endothelial cells.

PTHrP enters the nucleus of endothelial cells at the stadium of confluence. This suggests an intracrine effect of PTHrP. It was further investigated whether downregulation of endogenous PTHrP expression by transfection with antisense oligonucleotides alters cell proliferation or apoptosis resistance in growing or non-growing endothelial cells. Downregulation of PTHrP did not modify cell proliferation but increased the amount of UV-induced apoptosis. An increased expression of PTHrP in cells pre-treated with an α -adrenoceptor agonist reduced basal rate of apoptosis and improved resistance against UV-induced apoptosis. These results indicate a novel intracrine effect of PTHrP in coronary endothelial cells that improves cell survival.

In endothelial cells, the expression of PTHrP is regulated by α -adrenoceptor stimulation in a cell-cycle dependent and cell-type specific manner.

8. Literaturverzeichnis

1. Akino K, Ohtsuru A, Yano H, Ozeki S-i, Namba H, Nakashima M, Ito M, Matsumoto T, Yamashita S. Antisense inhibition of parathyroid hormone-related peptide gene expression reduces malignant pituitary tumor progression and metastases in the rat. *Cancer Res.* 1996;56:77-86.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-54.
3. Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE & Stewart AF. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:7151-7156
4. Crass MF 3D & Scarpace PJ. Vasoactive properties of parathyroid hormone-related peptide in the rat aorta. *Peptides* 1993; 14:179-83.
5. DiPette DJ, Christenson W, Nickols MA, Nickols GA. Cardiovascular responsiveness to parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in genetic hypertension. *Endocrinology.* 1992;130:2045-2051.
6. Godfrey K: Statistics in practice. Comparing the means of several groups. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313(23):1450-56.
7. Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, Biasotto D, Lanske BMK, Goltzman D, Karaplis AC. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 1995;15:4064-4075.
8. Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Giannella-Neto D, Forrester JS, Singer FR, Goltzman D, Hendy GN, Pirola C, Fagin JA, Clemes T. Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. *J Clin Invest.* 1991; 88:1841-1847.

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 M, Ouchi Y, Han SZ, Akishita M, Kosaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T & Orimo H. Parathyroid hormone-related protein reduces cytosolic free Ca²⁺ level and tension in rat aortic smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1994b; 269:311-317.
11. Jiang B, Morimoto S, Fukuo K, Yasuta O, Chen S & Ogihara T. Role of parathyroid hormone-related protein in the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Miner. Electrolyte Metab.* 1995; 21:157-160.
12. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF, Hock J, Potts JT, Kronenberg HM, and others. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991; 254:1024-1026.
13. Karaplis AC, He B, Nguyen MT, Young ID, Semeraro D, Ozawa H & Amizuka N. Inactivating mutation in the Human Parathyroid Hormone Receptor Type 1 Gene in Blomstrand Chondrodysplasia. *Endocrinology* 1998; 139:5255-5258.
14. Karaplis AC, Kronenberg HM. Physiological roles for parathyroid hormone-related protein: lessons from gene knockout mice. *Vitam Horm.* 1996;52:177-193.
15. Kyhse-Andersen J. Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Eur. J. Pharmacol.* 1984; 386:271-277
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259):680-85.
17. Lam MHC, House CM, Tiganis T, Mitchelhill KI, Sarcevic B, Cures A, Ramsay R, Kemp BE, Martin TJ, Gillespie MT. Phosphorylation at the cyclin-dependent kinases site (Thr⁸⁵) of parathyroid hormone-related protein negatively regulates its nuclear localization. *J Biol Chem* 1999;274:18559-18566.
18. Lam MHC, Thomas RJ, Martin TJ, Gillespie MT, Jans DA. Nuclear and nucleolar localization of parathyroid hormone-related protein. *Immun Cell Biol* 2000; 78:395-402.

19. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LHK, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Juppner H, Segre GV & Kronenberg HM. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273:663-666.
20. Maeda S; Sutliff RL, Qian J, Lorenz JN, Wang J, Tang H, Nakayama T, Weber C, Witte D, Strauch AR, Paul RJ, Fagin JA, Clemens TL. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) to vascular smooth muscle in transgenic mice lowers blood pressure and alters vascular contractility. *Endocrinology*. 1999;140:1815-1825.
21. Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig J-J, Stewart AF. Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: A critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13630-13635.
22. Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a cardiovascular regulatory peptide. *Endocrinology*. 1996;137:3151-3153.
23. Massfelder T, Stewart AF, Endlich K, Soifer N, Judes C & Helwig JJ. Parathyroid hormone-related peptide detection and interaction with NO and cyclic AMP in the renovascular system. *Kidney Int*. 1996b; 50:1591-1603.
24. Mok LL, Ajiwe E, Martin TJ, Thompson JC, Cooper CW. Parathyroid hormone-related protein relaxes rat gastric smooth muscle and shows cross-desensitization with parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*. 1989;4:433-439.
25. Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD, and others. Parathyroid hormone-related peptide purified from a human lung cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:5048-5052
26. Muhs A, Noll T, Piper HM. Vinculin phosphorylation and barrier function of coronary endothelial cells under energy depletion. *Am J Physiol* 1997;273:H608-H617.
27. Musso MJ, Plante M, Judes C, Barthelmebs M & Helwig JJ. Renal vasodilatation microvessel adenylate cyclase stimulation by synthetic parathyroid hormone-like protein fragments. *Eur. J. Pharmacol.* 1989; 174:139-152

28. 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.
29. Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM. Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1995;268:H1462-H1470.
30. Okano K, Pirola CJ, Wang H-M, Forrester JS, Fagin JA, Clemens TL. Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*. 1995;136:1782-1789.
31. 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.
32. Pirola CJ, Wang H-m, Kamyar A, Wu S, Enomoto H, Sharifi B, Forrester JS, Clemens TL, Fagin JA. Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem*. 1993; 268:1987-1994.
33. Qiang J, Lorenz JN, Maeda S, Sutliff RL, Weber C, Nakayama T, Colbert MC, Paul RJ, Fagin JA & Clemens TL. Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to PTHrP in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology* 1999; 140:1826-1833.
34. Rian E, Jemtland R, Olstad OK, Endresen MJ, Grasser WA, Thiede MA, Henriksen T, Bucht E, Gautvik KM. Parathyroid hormone-related protein is produced by cultured endothelial cells: A possible role in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 198:740-747
35. Rössig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:11-22.
36. Schlüter K-D, Katzer C, Frischkopf K, Wenzel S, Taimor G, Piper HM. Expression, release, and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells. *Circ Res*. 2000; 86:946-951.

37. 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.
38. Shan J, Pang PK, Lin HC & Yang MC. Cardiovascular effects of human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994; 23:38-41.
39. Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, & Nissenson RA. Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 1987; 80:1803-1807
40. Sutliff RL, Weber CS, Qian J, Miller MI, Clemens TL & Paul RJ. Vasorelaxant properties of parathyroid hormone-related protein in the mouse: evidence for endothelium involvement independent of nitric oxide formation. *Endocrinology* 1999; 140:2077-2083.
41. Taberner A, Giraldo J, Vivas NM, Badia A, Vila E. Endothelial modulation of α_1 -adrenoceptor contractile responses in the tail artery of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1996;119:765-771.
42. Taimor G, Lorenz H, Hofstaetter B, Schlüter K-D, Piper HM. Induction of necrosis but not apoptosis after anoxia and reoxygenation in isolated adult cardiomyocytes of rat. *Cardiovasc Res.* 1999;41:147-156.
43. Taimor G, Schlüter K-D, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Piper HM. Autocrine regulation of TGF- β expression in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:2127-2136.
44. Thiede MA, Daifotis AG, Weir EC, Brines ML, Burtis WJ, Ikeda K, Dreyer BE, Garfield RE, Broadus AE. Intrauterine occupancy controls expression of the parathyroid hormone-related peptide gene in preterm rat myometrium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:6969-6973.
45. Tsukada T, Eguchi K, Migita K, Kawabe Y, Kawakami A, Matsuoka N, Takashima H, Mizokami A, Nagataki S. TGF- β 1 induces apoptotic cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:1076-1082.

46. Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg HM, Potts JT & Segre GV. PTH/PTHrP receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* 1993; 133:617-623.
47. Watson PH, Fraher LJ, Hendy GN, Chung UI, Kisiel M, Natale BV & Hodsman AB. Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J. Bone Miner. Res.* 2000a; 15:1033-1044
48. Watson PH, Fraher LJ, Natale BV, Kisiel M, Hendy GN, & Hodsman AB. Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone* 2000b; 26:221-225.
49. Wenzel S, Schorr K, Degenhardt H, Frischkopf K, Kojda G, Wiesner RJ, Rosenkranz S, Piper HM, Schlüter K-D. TGF- β downregulates PTHrP in coronary endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1181-1190.
50. Winqvist RJ, Baskin EP & Vlasuk GP. Synthetic tumor-derived human hypercalcemic factor exhibits parathyroid hormone-like vasorelaxation in renal arteries. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 149:227-232.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter am Physiologischen Institut des Humanbereiches der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Bereitstellung des Themas sowie seine Hilfsbereitschaft und Geduld, mit der er mich bei meiner gesamten Arbeit unterstützte. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, daß er für eine finanzielle Unterstützung meiner Promotionsarbeit sorgte, welche leider für Veterinärmediziner nicht selbstverständlich ist.

Herrn Prof. Diener möchte ich für die freundliche Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen danken.

Sehr herzlich möchte ich auch Frau Dr. G. Taimor danken, die mir jederzeit, vor allem in methodischen Fragen, mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die notwendige fachliche Unterstützung und jede Menge Spaß möchte ich mich des weiteren bei den Medizinisch-Technischen-Assistenten Iris Schumacher, Daniela Schreiber und Hermann Holzträger bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Sibylle Wenzel, Heike Degenhardt und Daniela Schreiber für die Korrektur meiner Doktorarbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern, vor allem den Mitdoktoranden, danke ich für die schöne Zeit, welche die Promotionsarbeit in sehr guter Erinnerung bleiben läßt.

Zu guter Letzt einen herzlichen Dank an meine Eltern und meinen Lebensgefährten, die mich in allen Lebenslagen in meinem Handeln unterstützten und mir ein großer Rückhalt sind.