

**Die kardiale und hämodynamische Wirkung von zwei
aktiven Domänen des „Parathyroid Hormone-related“
Peptids**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Dr. med. Frank-Hendric Peter Kretschmer
aus Kassel

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer
2. Gutachter: PD Dr. med. Georg Baumgarten

Tag der Mündlichen Prüfung: 28. September 2009

Aus dem Physiologischen Institut II der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Swandulla

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG UND ALLGEMEINE PROBLEMATIK.....	6
	1.1 Definition und Grundlagen des Peptidhormons PTHrP	6
	1.2 Bildungsorte von Parathormon (PTH) und PTHrP.....	9
	1.3 Wirkungsweise von PTHrP und PTH.....	10
	1.4 Druckinduzierte kardiale Veränderungen.....	14
	1.5 Zwei unterschiedliche Domänen - PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111).....	15
	1.6 Fragestellung.....	17
II.	MATERIAL UND METHODE.....	19
	2.1 Versuchstiere und deren Haltung.....	19
	2.2 Gruppeneinteilung und <i>in vivo</i> -Versuche.....	19
	2.3 PTHrP-Agentien.....	20
	2.4 Handhabung und Implantation der osmotischen Pumpen.....	20
	2.5 Wirkungsweise der osmotischen Pumpen.....	22
	2.6 Injektion versus Infusion.....	23
	2.7 Narkose.....	25
	2.8 Messung der Hämodynamik und der EKG-Daten.....	26
	2.9 Blutentnahme.....	28
	2.10 Organentnahme.....	28
	2.11 Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien.....	28
	2.12 Geräte für die <i>in vivo</i> -Eingriffe.....	29
	2.13 Phosphate buffered saline (PBS).....	29
	2.14 Auswertung der Daten der Hämodynamik-Messung.....	29
	2.15 Auswertung der EKG-Ergebnisse.....	30
	2.16 Statistik.....	33
	2.17 Molekularbiologische Auswertung.....	34

III.	ERGEBNISTEIL.....	35
3.1	Mortalität.....	35
3.2	Morphologische Befunde.....	36
3.2.1	Körpergewicht der Versuchstiere am Tag der Implantation und am Tag der Herzkathetermessung.....	36
3.2.2	Lungengewicht nach Entnahme.....	37
3.2.3	Herzgewicht nach Entnahme.....	38
3.2.4	Länge der Tibia nach Entnahme.....	39
3.2.5	Heartweight-Bodyweight-Ratio (HW/BW).....	39
3.2.6	Heartweight-Tibiallänge-Ratio (HW/TL).....	40
3.3	Ergebnisse der peripheren hämodynamischen Untersuchung.....	41
3.3.1	Untersuchung der Herzfrequenz bei der peripheren hämodynamischen Blutdruckuntersuchung.....	41
3.3.2	Untersuchung des peripheren systolischen Blutdrucks.....	42
3.3.3	Untersuchung des peripheren diastolischen Blutdrucks.....	43
3.4	Ergebnisse der intrakardialen hämodynamischen Untersuchung.....	44
3.4.1	Herzfrequenz während der intrakardialen hämodynamischen Blutdruckuntersuchung.....	44
3.4.2	Untersuchung des intrakardialen systolischen Blutdrucks.....	45
3.4.3	Untersuchung des intrakardialen diastolischen Blutdrucks.....	46
3.4.4	Untersuchung der maximalen intrakardialen Druckanstiegs- geschwindigkeit (Kontraktionsgeschwindigkeit; $+dP/dt_{max}$).....	47
3.4.5	Untersuchung der maximalen intrakardialen Druckabfallsge- schwindigkeit (Relaxationsgeschwindigkeit; $-dP/dt_{min}$).....	48
3.5	Ergebnisse der elektrokardiologischen Untersuchung.....	49
3.5.1	Untersuchung der Dauer der p-Welle.....	49
3.5.2	Untersuchung der Amplitude der p-Welle.....	50
3.5.3	Untersuchung der Dauer der PR-Strecke.....	51
3.5.4	Untersuchung des Wertes der Q-Zacke.....	52
3.5.5	Untersuchung der Dauer des QRS-Komplexes.....	53
3.5.6	Untersuchung der korrigierten QT-Zeit.....	54
3.5.7	Untersuchung der JT-Strecke.....	55

IV.	DISKUSSION.....	56
4.1	Inhaltliche Diskussion.....	56
4.2	Methodische Diskussion.....	57
4.2.1	Sham vs. Placebo.....	58
4.3	Diskussion der EKG-Ergebnisse.....	59
4.4	Diskussion der hämodynamischen Ergebnisse.....	60
4.5	PTHrP-Wirkung unter Druckbelastung.....	62
4.6	Schlussfolgerung.....	63
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
	DANKSAGUNG.....	76

Teile dieser Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Meyer R, Schreckenberg R.; Kretschmer FH, Bittig A, Conzelmann C, Grohe C, Schlüter KD. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) signal cascade modulates myocardial dysfunction in the pressure overloaded heart. European Journal of Heart Failure 2007; 9: 1156–1162

I. Einleitung und allgemeine Problematik

1.1 Definition und Grundlagen des Peptidhormons PTHrP

Das Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP) ist ein calciotropes Peptidhormon. Der Name leitet sich von der strukturellen Ähnlichkeit zu dem bekannten und für die renale und knöcherne Regulation des Kalziumhaushaltes wichtigen Parathormon (PTH) ab. PTHrP wurde erstmals als maßgeblich beteiligter Faktor an der Pathogenese von malignen humoralen Tumorerhyperkalziämien – besonders bei Mamma- und Bronchial-Carcinomen – beschrieben (Burtis et al., 1987; Mangin et al., 1988; Moseley et al., 1987; Stewart et al., 1980; Strewler et al., 1987; Suva et al., 1987). PTHrP ist zudem auch ein lebensnotwendiges Protein. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse die kein PTHrP produzieren, kurz nach der Geburt aufgrund eines schweren Defekts der Knorpelentwicklung versterben (Karaplis et al., 1994).

Obwohl Parathormon und PTHrP eine Homologie in ihrem N-terminalen Abschnitt aufweisen, werden die beiden Peptidhormone auf verschiedenen Genen, die auf separaten Chromosomen liegen, gebildet. Das Gen, welches für PTHrP kodiert, ist größer und komplexer als das Gen, welches für Parathormon kodiert. Das menschliche Translationsprodukt des PTHrP-Gens besteht aus drei Isoformen des Polypeptids mit 139, 141 und 173 Aminosäuren. Bei der Maus besteht PTHrP aus insgesamt 139 Aminosäuren (Clemens et al., 2001). Dieses native PTHrP wird durch Prohormon-Convertasen im Plasma in mindestens drei Fragmente gespalten (Orloff et al., 1994; Wysolmerski und Stewart, 1998). Das deutet darauf hin, dass es sich bei dem nativen PTHrP um ein Polyhormon handelt, welches Vorläufer für eine Reihe unterschiedlich aktiver Peptide ist (Fiaschi-Taesch und Stewart, 2003; Strewler, 2000). Bei den drei bekanntesten Polypeptiden handelt es sich um (s. Abbildung 1):

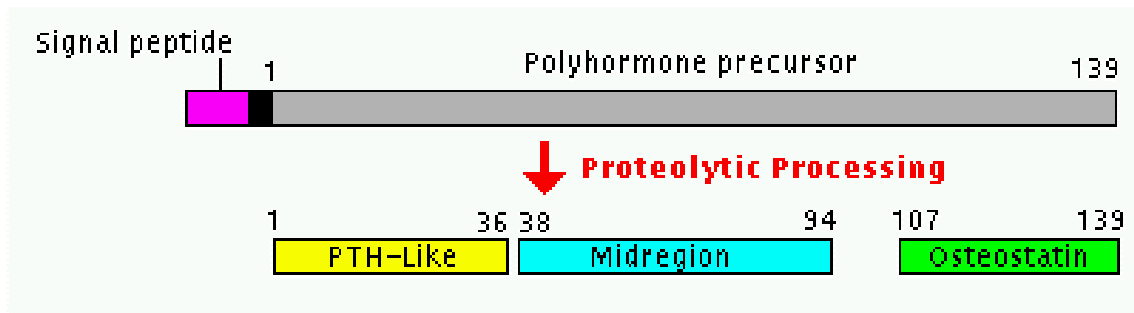


Abbildung 1:

Schematische Darstellung des Polypeptidhormons PTHrP mit seinen 3 bioaktiven Teilpeptiden [entnommen aus (Strewler, 2000)].

- 1) Ein N-terminales Fragment (PTHrP 1-36) mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu Parathormon (PTH),
- 2) ein midregionales Teilpeptid (PTHrP 38-94) (Midregion) und
- 3) ein C-terminales Fragment (PTHrP 107-139), welches aufgrund seiner Inhibition der Osteoklasten-abhängigen Knochenresorption auch als Osteotatin bezeichnet wird (Fenton et al., 1991; Martin et al., 1992; Orloff et al., 1994; Soifer et al., 1992; Strewler 2000)

PTHrP kann zusätzlich nach seiner Freisetzung im Rahmen eines proteolytischen Prozesses in verschieden lange Aminosäuresequenzen gespalten werden (Burtis et al., 1992). Jedes Teilpeptid besitzt eigene biologische Eigenschaften und wirkt wahrscheinlich über unterschiedliche Rezeptoren (Kovacs et al., 1996; Potts et al., 1997; Wu et al., 1996). Bisher konnte jedoch nur der PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH1-Rezeptor) bei Säugern isoliert werden (Mannstadt et al., 1999). Die Existenz weiterer Rezeptoren ist aber aufgrund der unterschiedlichen biologischen Wirkung der Teilpeptide sehr wahrscheinlich und Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen (Mannstadt et al., 1999; Strewler, 2000). Der PTH1-Rezeptor bindet generell nur bestimmte Aminosäuresequenzen des PTH und der N-terminalen Region des PTHrP; beim Parathormon die ersten 34 Aminosäuren. Zur Bindung des PTHrP an diesen Rezeptor müssen mindestens die Aminosäuren 1-36 vorhanden sein (Caulfield und Rosenblatt, 1990; Everhart-Caye et al., 1996; Horiuchi und Rosenblatt, 1987; Yates et al., 1988). Die C-terminale Region und die Midregion des Polyhormons PTHrP hingegen scheinen den PTH1-Rezeptor nicht aktivieren zu können (Inomata et al., 1995; Pines et al., 1994; Takasu et al., 1996).

Die Aminosäuresequenz 15-34 beider Peptidhormone fungiert als Bindungsdomäne für den PTH1-Rezeptor (Abou-Samra et al., 1989; Caulfield und Rosenblatt, 1990). Der PTH1-Rezeptor gehört zu einer Gruppe von heptahelikalen Rezeptoren, zu der auch die Rezeptoren für Sekretin, Calcitonin, Glukagon und anderer Peptidhormone gehören (Ji et al., 1998; Juppner, 1999; Kolakowski, 1994; Segre und Goldring, 1993). Er ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und besitzt sieben transmembranäre Domänen und wird nicht nur in den Zellen der klassischen Zielorgane von Parathormon - Niere und Knochen – , sondern auch in anderen Zellen des Körpers, u.a. den Kardiomyozyten, exprimiert (Clemens et al., 2001; Juppner, 1999).

Nach der Aktivierung des PTH1-Rezeptors durch die Liganden PTH (1-34) und PTHrP (1-36) kann die Reizweiterleitung - nach der Konformationsänderung des G-Proteins - prinzipiell auf zwei unterschiedlichen intrazellulären „second-Messenger“ Signalwegen stattfinden (Potts et al., 1997; Schluter, 1999; Segre und Goldring, 1993):

1. durch den Adenylatzyklase/Proteinkinase A-(AC/PKA)-Signalweg
2. durch den Phospholipase C/Proteinkinase C-(PLC-PKC)-Signalweg

Die Aktivierung der Proteinkinase A kann entweder cAMP-abhängig oder cAMP-unabhängig erfolgen, wobei der klassische PTH1-Rezeptor-vermittelte Signalweg cAMP-abhängig verläuft (Clemens et al., 2001). Volz et al. konnten 1991 berichten, dass eine Erhöhung der cAMP-Konzentration eine Zunahme der spontanen Kontraktionsaktivität von Kardiomyozyten bewirkt (Volz et al., 1991).

Neben den drei genannten Teilpeptiden und ihren festgelegten Aminosäuresequenzen können verkürzte Polypeptide für Versuchszwecke synthetisiert werden, um die Wirkung bestimmter Bereiche der Teilpeptide zu studieren. Derartige Aminosäuresequenzen werden, wenn sie eine spezielle Wirkung auslösen, als aktive Domänen bezeichnet. Die für unsere Studie wichtigen Aminosäuresequenzen 7-34 und 107-111 – auch als Osteostatin bezeichnet - sind solche synthetisierten aktiven Domänen (Fenton et al., 1991; Martin et al., 1992). Die aktive Domäne PTHrP (7-34) wird in der Literatur als selektivster und potentester Antagonist des PTH1-Rezeptors in *in vitro* Untersuchungen angegeben (Clemens et al., 2001). Der PTH1-Rezeptor Antagonist ist in der Lage, durch eine Blockierung des PTH1-Rezeptors die Wirkung des Parathormons aufzuheben. PTHrP (7-34) wirkt aber nicht nur als reiner Antagonist, sondern löst auch funktionelle zelluläre Effekte aus. Sowohl PTHrP (1-34), als auch PTHrP (7-34) lösen bei

Kardiomyozyten cAMP-abhängige Effekte aus. So führt eine durch PTHrP (7-34) induzierte Erhöhung der cAMP-Konzentration in Kardiomyozyten zu einer positiven Beeinflussung der Kontraktion dieser Zellen, gemessen als Zellverkürzung (Schluter et al., 1997). PTHrP (107-111) hat hingegen keinen Einfluss auf den intrazellulären cAMP-Gehalt der Zellen und führt somit auch nicht zu einer Beeinflussung der Kontraktionsaktivität der Kardiomyozyten (Schluter et al., 1997).

Da in der Literatur lediglich der Aktivierungsmechanismus des PTH1-Rezeptors beschrieben wird, ist auch nur die Bindung der ersten 36 Aminosäuren des Polypeptids PTHrP an diesen Rezeptor wissenschaftlich belegt. Die nachgewiesene Existenz der Midregion und der C-terminalen Region des Polyhormons PTHrP lassen darauf schließen, dass hier spezielle Rezeptoren aktiviert werden oder weitere Signaltransduktionswege zur Reizweiterleitung bestehen, da diese Teilpeptide biologisch nicht inert sind. Diese Teilpeptide binden nämlich – wie bereits oben erwähnt - nicht an den PTH1-Rezeptor und haben dadurch auch keinen Parathormon ähnlichen Effekt (Clemens et al., 2001; Inomata et al., 1995; Pines et al., 1994; Takasu et al., 1996).

1.2 Bildungsorte von PTH und PTHrP

Im Gegensatz zu Parathormon - welches nur in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse produziert wird - wird PTHrP in nahezu allen Geweben des fetalen und adulten Körpers gebildet und sezerniert (Philbrick et al., 1996; Strewler, 2000). Es ist wissenschaftlich belegt, dass PTHrP auch konstant in multiplen nicht-malignen Zellen gebildet wird (Rian et al., 1994). PTHrP wird u.a. in Epithelgeweben, in mesenchymalem Gewebe, endokrinen Drüsen, im Zentralnervensystem und im Herzen von Feten und Erwachsenen gebildet. Auch in glatten Muskelzellen verschiedener Gewebe einschließlich des Gefäßsystems und in den Endothelzellen der Koronararterien wird PTHrP exprimiert und in glykosylierter Form freigesetzt (Burton et al., 1994; Deftos et al., 1993; Hongo et al., 1991; Rian et al., 1994). PTHrP wird von den glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von ihrem mechanischen Dehnungszustand sezerniert (Thiede et al., 1990; Yamamoto et al., 1992).

Im Herzen wird PTHrP von den atrialen Kardiomyozyten gebildet und freigesetzt (Burton et al., 1994). Schlüter et al. (2000) konnten zeigen, dass PTHrP zwar auch im intakten Ventrikelgewebe

gebildet wird, jedoch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten PTHrP nicht exprimieren können (Schluter et al., 2000).

Alle diese Zellen sind nicht nur in der Lage PTHrP zu bilden, sondern besitzen auf ihrer Oberfläche auch den klassischen PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1 (PTH1-Rezeptor) (Mok et al., 1989).

PTHrP wird physiologischerweise auch während der Schwangerschaft im Uterus und in der Plazenta gebildet sowie während der Laktation in den Mammæ exprimiert (Curtis et al., 2000; Curtis et al., 1998). Holt et al. (1994) und Cros et al. (1998) konnten in ihren Studien zeigen, dass Östrogen die Expression von PTHrP-mRNA *in vivo* in Uterus und Nieren von Ratten erhöht (Cros et al., 1998; Holt et al., 1994). Weiterhin kann eine Wirkung auf die Mineralisation des fetalen Skeletts angenommen werden (Karaplis et al., 1994; Lanske et al., 1996). Die weite Verbreitung von PTHrP deutet auf ein vielfältiges Wirkungsspektrum des Peptidhormons hin.

1.3 Wirkungsweise von PTHrP und PTH

Der Name Parathyroid Hormone-related Protein induziert eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem bekannten Parathormon. Auch ein ähnliches Wirkungsspektrum des Polypeptides kann durch seine biologische Wirkung auf den Calciumhaushalt angenommen werden. Jedoch besteht nur innerhalb des NH₂-terminalen Anteils des Teilpeptides 1-36 eine geringe strukturelle Homologie mit PTH. Hier sind neun der ersten dreizehn Aminosäuren für beide Polypeptide identisch (Goltzmann et al., 1975; Horiuchi et al., 1983; Horiuchi und Rosenblatt, 1987; Kemp et al., 1987; Tregear et al., 1973). Auch wenn sich die Aminosäuresequenz von PTH und PTHrP in ihrem C-terminalen Anteil unterscheiden, so weisen beide Peptide doch die gleiche morphologische Struktur in Form einer α -Helix im C-terminalen Anteil des Moleküls auf (Schluter et al., 1997).

Durch diese Homologie in der für die Bindung an den PTH1-Rezeptor wichtigen N-terminalen Region können PTH und PTHrP durch dessen Aktivierung in vielen Zellen den gleichen biologischen Effekt auslösen (Juppner et al., 1991; Strewler 2000; Wysolmerski und Stewart, 1998). So führen beide Peptidhormone zu einer Calciumresorption im Knochengewebe und zu einer renalen Calciumreabsorption (Clemens et al., 2001; Horiuchi und Rosenblatt, 1987; Juppner et al., 1991; Strewler, 2000).

Hingegen besteht zwischen der Wirkungsweise beider Polypeptide ein wichtiger Unterschied. Während PTH seine systemische Wirkung durch Zirkulation im Kreislauf vermittelt, wirkt

PTHrP lokal in der Nähe des jeweiligen Bildungsortes als parakriner und autokriner Regulator vieler physiologischer Prozesse (Clemens et al., 2001).

Aufgrund seiner biologischen Rolle als Polyhormon ist das Wirkungsspektrum von PTHrP komplexer und teilweise von dem des Parathormons verschieden. Die biologische Wirkungsvielfalt des PTHrP wird durch einen sogenannten intrakrinen Effekt des PTHrP vergrößert. Dieser intrakrine Effekt wird im folgenden genauer beschrieben. Da der Plasmaspiegel von PTHrP normalerweise gering ist, wird angenommen, dass PTHrP seine Wirkung nicht allein durch Bindung an einen PTH1-Rezeptor auslöst. Eine parakrine, autokrine und auch eine intrakrine Wirkungsweise des Peptides wird angenommen (Fiaschi-Taesch und Stewart, 2003; Strewler, 2000; Watson et al., 2000). Diese intrakrine Wirkungsweise beinhaltet eine direkte Interaktion mit dem Zellkern durch eine Translokation des Proteins in den Nukleolus (Fiaschi-Taesch und Stewart, 2003; Strewler, 2000). PTHrP gelangt hier durch eine *Nuclear Localization Sequence* (NLS) zwischen den Aminosäuren 88-106 des Peptids in den Zellkern (Fiaschi-Taesch und Stewart, 2003). Die NLS des PTHrP ist der NLS in Transkriptionsfaktoren von Viren und Säugetieren ähnlich (Goomer et al., 2000). PTHrP reguliert durch die Lokalisation im Zellkern den apoptotischen Zelltod und die Zellproliferation (Watson et al., 2000). Sehr wichtig ist weiterhin die Tatsache, dass für eine intrakrin induzierte Zellproliferation neben der *Nuclear Localization Sequence* (NLS) auch die C-terminale Region von PTHrP unbedingt notwendig ist (de Miguel et al., 2001).

Diese Beobachtungen zeigen, dass das zunächst nur als Faktor im Rahmen der Pathogenese maligner humoraler Tumorhyperkalziämien entdeckte PTHrP vielfältige physiologische Aufgaben besitzt. PTHrP ist nicht nur ein calciotropes Hormon, sondern PTHrP ist auch ein lebensnotwendiger Wachstumsfaktor und an der Entwicklung verschiedener Gewebe beteiligt (Knochen- und Hautgewebe, Mammae, Niere) (Clemens et al., 2001).

Schon früh konnte auch eine kardiovaskuläre Wirkung von Parathormon durch eine systemische Injektion von PTH bei Hunden nachgewiesen werden (Collip, 1925). Hier führt PTH zu einer Verringerung des Blutdrucks. Die physiologische Wichtigkeit von Parathormon in bezug auf das kardiovaskuläre System wurde jedoch oft diskutiert, weil die systemisch erforderliche Konzentration von PTH zur Auslösung vasorelaxierender Effekte weit über der physiologisch zirkulierenden Konzentration liegt. Einige kontroverse Wirkungen von PTH konnte man sich jedoch lange nicht erklären. Auffällig war, dass Patienten mit einem nachgewiesenen primären

Hyperparathyreodismus meist an einer Hypertonie anstatt an einem zu niedrigen Blutdruck litten und dieser wieder normale Werte nach Entfernung der Nebenschilddrüse annahm (Clemens et al., 2001). Auch der Wirkmechanismus des PTHrP kann diesen Widerspruch nicht erklären. PTHrP wird nahezu in allen Blutgefäßen exprimiert und imitiert dort die vasorelaxierende Wirkung von Parathormon, wie z.B. die Vasorelaxation in der Aorta (Crass und Scarpace, 1993), in der Portalvene (Shan et al., 1994), den Nierenarterien (Musso et al., 1989; Winqvist et al., 1987) und den Koronararterien (Nickols et al., 1989). Die Vasokonstriktoren Angiotensin II, Serotonin, Endothelin, Noradrenalin und Bradykinin erhöhen die Konzentration von PTHrP mRNA (Maeda et al., 1999; Pirola et al., 1993). Diese Tatsache deutet daraufhin, dass die Expression des vasorelaxierenden PTHrP als Antwort auf eine pathophysiologische Elevation des Gefäßtonus heraufreguliert wird. PTHrP scheint hier seinen vasodilatatorischen Effekt durch eine Aktivierung des PTH1-Rezeptors auszulösen (Clemens et al., 2001).

Neben einer vaskulären besitzt PTHrP auch eine kardiale Komponente. PTHrP löst im Herz von Säugetieren einen positiv inotropen, chronotropen und hypertrophen Effekt auf die ventrikulären Kardiomyozyten aus und führt weiterhin zu einer Dilatation der Koronargefäße (Crass und Pang, 1980; Jansen et al., 2003; Mok et al., 1989; Nickols et al., 1989; Winqvist et al., 1987). Somit hat PTHrP die Fähigkeit, die Herzleistung positiv zu beeinflussen und die Durchblutung der Koronargefäße entscheidend zu verbessern. Ein weiterer Hinweis für eine bedeutende Rolle von PTHrP in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems ergibt sich aus der seltenen Blomstrand-Chondrodysplasie, die durch eine inaktivierende PTH1-Rezeptor-Mutation ausgelöst wird (Karaplis et al., 1998). Die Feten entwickeln einen Hydrops fetalis, wobei zusätzlich sehr häufig Herzinsuffizienzen und Aortenmissbildungen auftreten.

Pirola et al. (1993) konnten zeigen, dass Angiotensin II die Expression von PTHrP in glatten Muskelzellen induziert (Pirola et al., 1993). Angiotensin II ist nicht nur ein potenter Vasokonstriktor, sondern Angiotensin II ist auch einer der Hauptfaktoren im Rahmen der Entwicklung und Progression einer kardialen Hypertrophie (Clemens et al., 2001). Da Angiotensin II durch seine vasokonstriktorische Wirkung eine Expression von PTHrP an den glatten Muskelzellen der Blutgefäße induziert, liegt die Induktion einer ventrikulären PTHrP-Expression nahe. Ob PTHrP als ein Hypertrophie-induzierender Co-Faktor auf die ventrikulären Kardiomyozyten angesehen werden kann oder ob PTHrP, wie in den glatten Muskelzellen, als Gegenspieler von Angiotensin II gebildet wird, bleibt unklar.

In vitro Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass PTHrP durch eine Aktivierung der Proteinkinase C eine Progression der Hypertrophie auslöst, weil die Proteinkinase C bei Kardiomyozyten zu einer vermehrten Proteinsynthese und Re-Expression fetaler Proteine führt (Schluter et al., 1997). Dieser hypertrophe Effekt wird durch die C-terminale aktive Domäne 107-111 des Polypeptides PTHrP ausgelöst. Ein weiterer kardialer Effekt des PTHrP, der schon in Kapitel 1.1 besprochen wurde, besteht in der positiv inotropen Wirkung des PTHrP (7-34) durch eine Aktivierung der Proteinkinase A in Kardiomyozyten (Nickols et al., 1989; Schluter et al., 1997).

Zusätzlich zu den aufgeführten Wirkungen wird PTHrP in einer ischämischen Situation freigesetzt und wirkt als ein positiver inotroper Agonist speziell in dem von der Ischämie betroffenen Myokard (Jansen et al., 2003). Dieses lokal gebildete PTHrP wirkt hier als protektiver Agonist und sorgt für die Aufrechterhaltung der kardialen Funktion im Myokard (Grohe et al., 2004). Diese kardialen Wirkungen von PTHrP konnten bisher jedoch nicht unter *in vivo* Versuchsbedingungen bestätigt werden (Clemens et al., 2001; Ogino et al., 1995).

Die Wirkungsweise der beiden Polypeptide, PTH und PTHrP, ist nicht einheitlich. So haben Parathormon und PTHrP teilweise unterschiedliche biologische Wirkungen. Dies liegt an der unterschiedlichen Struktur der Peptide, der unterschiedlichen Länge der Aminosäuresequenz aufgrund der proteolytischen Spaltung von PTHrP und an der unterschiedlichen Wirkungsweise (systemisch vs. lokal bzw. intrakrin).

Dennoch können einige Wirkungen durch die gemeinsame Bindung an den PTH1-Rezeptor über eine gewisse strukturelle Homologie innerhalb der Rezeptor bindenden N-terminalen Region - neben der gemeinsamen calciotropen Wirkung - initiiert werden. So kann Parathormon die hypertrophe Wirkung von PTHrP bei Kardiomyozyten imitieren. Verantwortlich für die Induktion einer Kardiomyozytenhypertrophie ist die Aktivierung der Proteinkinase C. Diese wird durch die Aminosäuresequenz 1-34 des Parathormons ausgelöst. Die dem Parathormon ähnliche N-terminale Region PTHrP (1-36) kann trotz der gemeinsamen Bindungsmöglichkeit des PTH1-Rezeptors die Proteinkinase C nicht aktivieren. Hierfür ist die strukturelle Differenz der Aminosäure 29 verantwortlich. Bei Parathormon ist hier Glutamin lokalisiert, im Gegensatz zu Alanin bei PTHrP (Mannstadt et al., 1999). Dadurch kann PTHrP (1-36) die Proteinkinase C ventrikulärer Kardiomyozyten nicht aktivieren (Mannstadt et al., 1999; Schluter et al., 1996).

Im Gegensatz zu Parathormon ist bei PTHrP die Aminosäuresequenz 107-111 für die Aktivierung der Proteinkinase C verantwortlich (Gagnon et al., 1993). Dieser Unterschied spricht für die Existenz eines weiteren speziellen Rezeptors (Clemens et al., 2001).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Parathormon im Gegensatz zu PTHrP die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten nicht verbessert und somit auch nicht zu einer positiven Inotropie führt (Nickols et al., 1989; Ogino et al., 1995). Auch scheint PTHrP im Hinblick auf die Effizienz der Verbesserung der Durchblutung der Koronargefäße potenter zu sein als PTH (Nickols et al., 1989). Jedoch wirken sowohl PTH, als auch PTHrP positiv chronotrop (Clemens et al., 2001).

1.4 Druckinduzierte kardiale Veränderungen

Wenzel et al. untersuchten 2001 die ventrikuläre Expression von PTHrP in Relation zu einer durch Hypertension bedingten Hypertrophie des Herzens. Es zeigte sich, dass die Induktion der ventrikulären PTHrP-Expression eine sehr frühe Erscheinung der ventrikulären Adaptation an eine Drucküberlastung des Herzens darstellt, die schon früh vor einer Induktion von Hypertrophie assoziierten Genen, wie z.B. dem Atrialen Natriuretischen Peptid (ANP), zu beobachten ist (Wenzel et al., 2001).

Nachgewiesen ist, dass eine anhaltende Drucküberlastung des Herzens zu einer Heraufregulierung von TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor beta*) führt (Wenzel et al., 2001). TGF- β 1 stellt in diesem Zusammenhang einen der entscheidenden Faktoren beim Übergang einer druckinduzierten Herzhypertrophie in eine Herzinsuffizienz dar. Wenzel et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass TGF- β 1 zu einem Absinken der Expression von PTHrP führt (Wenzel et al., 2001).

Einen weiteren Hinweis für eine druckabhängige Regulation der PTHrP-Expression geben van Eickels et al. (2005) in ihrer Untersuchung, bei der hypertensiven Ratten Angiotensin Converting Enzym-Inhibitoren (ACE-Inhibitoren) verabreicht wurde. ACE-Inhibitoren führten nach ihrer Applikation zu einer Reduktion der PTHrP-Expression (van Eickels et al., 2005).

1.5 Zwei unterschiedliche Domänen - PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111)

Neben den drei physiologisch vorkommenden Teilpeptiden des Polyhormons PTHrP können auch bestimmte Aminosäuresequenzen (aktive Domänen) mit einer speziellen Wirkung synthetisch hergestellt werden. Für unsere Untersuchung fanden die aktiven Domänen PTHrP (7-34) – als spezieller PTH1-Rezeptor Antagonist – und PTHrP (107-111) Verwendung. Die verkürzte aktive Domäne PTHrP (107-111) entsteht durch proteolytische Spaltung des Polypeptids PTHrP, nachdem PTHrP aus den Zellen freigesetzt wird (Burtis et al., 1992). PTHrP (107-111) wird in der Literatur als Osteostatin bezeichnet, weil es die PTH/PTHrP-abhängige Knochenresorption antagonisiert (Fenton et al., 1991). Als Zielzellen dieser beiden aktiven Domänen wurden unter anderem Kardiomyozyten identifiziert (Schluter et al., 1997). Wichtig ist in diesem Zusammenhang die unterschiedliche kardiale Wirkung dieser beiden aktiven Domänen. Diese ergibt sich durch die unterschiedlichen „second-Messenger“ Signalwege der beiden aktiven Domänen und der dadurch bedingten differenten zellulären Wirkung. Die Aminosäuresequenz 107-111 der C-terminalen Region des Peptides führt zu einer Proteinkinase C-abhängigen intrazellulären Antwort. Dies stimmt mit der Erkenntnis überein, dass PTHrP (107-111) die Proteinkinase C von Osteoblasten aktiviert (Gagnon et al., 1993). Die genauen Bindungsregionen bzw. Signaltransduktionswege, die für die Stimulation der Proteinkinase C verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden (Juppner, 1999; Mannstadt et al., 1999; Orloff et al., 1994). Die Aminosäuresequenz 7-34 der N-terminalen Region aktiviert hingegen eine Proteinkinase A.

Die Aminosäuresequenz 107-111 des Peptidhormons PTHrP löst über die Aktivierung der Proteinkinase C *in vitro* eine Hypertrophie der Kardiomyozyten aus. Es ist bekannt, dass die aktive Domäne PTHrP (107-111) die Aktivität der Kreatinkinase BB (CK-BB) erhöht. CK-BB ist eine Isoform der Kreatinkinase (CK), die während der kardialen Hypertrophie vermehrt exprimiert wird. Weiterhin führt PTHrP (107-111) zu einer Erhöhung der Proteinsynthese und der totalen Proteinmasse. PTHrP (107-111) vergrößert außerdem das Zellvolumen sowie die Querschnittsfläche der Kardiomyozyten und aktiviert die p42-MAP-Kinase. Somit besitzt diese C-terminale Aminosäuresequenz des PTHrP-Moleküls *in vitro* die Charakteristika eines Wachstumsfaktors für erwachsene Kardiomyozyten. Diese hypertrophe Wirkung von PTHrP (107-111) konnte durch den Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor Bisindolylmaleimide aufgehoben und dadurch bewiesen werden (Schluter und Piper, 1992; Schluter et al., 1997; Schluter et al., 1996).

Bei der genauen Untersuchung der aktiven Domänen konnten Orloff et al. 1993 das C-terminale Fragment PTHrP (107-111) im Blut von dialysepflichtigen Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz vermehrt nachweisen. Eine der wesentlichen kardialen Störungen, die bei Patienten im Rahmen der Langzeitdialyse auftreten, ist die ventrikuläre Linksherzinsuffizienz. Hierbei scheint einer der Hypertrophie-vermittelnden Faktoren dieser klinischen Situation PTHrP (107-111) zu sein (Orloff et al., 1993).

Hingegen hat die aktive Domäne 107-111 keinen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten. Die für die Beeinflussung der kardialen Kontraktionsaktivität entscheidende intrazelluläre cAMP-Konzentration wird durch PTHrP (107-111) nicht beeinflusst. Die Kopräsenz von PTHrP (107-111) führt sogar zu einer abgeschwächten kontraktile Aktivität der Kardiomyozyten durch den β -Adrenorezeptor Agonisten Isoprenalin (Schluter et al., 1997). Whitfield et al. konnten 1996 zeigen, dass niedrige Konzentrationen des C-terminalen Fragments PTHrP (107-111) und PTHrP (107-139) nur die membranständigen Proteinkinasen C (PKCs) stimulieren können, nicht jedoch die Adenylatzyklase (Whitfield et al., 1996).

Durch das Fehlen der ersten 6 Aminosäuren ist die aktive Domäne PTHrP (7-34) ein spezifischer PTH1-Rezeptor-Antagonist (Clemens et al., 2001). Der PTH1-Rezeptor Antagonist blockiert die Wirkung von PTHrP (1-36) am PTH1-Rezeptor und hebt somit dessen Wirkung auf. Zusätzlich kann PTHrP (7-34), wie PTHrP (1-36), durch eine strukturelle Differenz der Aminosäure 29 die Proteinkinase C nicht aktivieren. Somit führt PTHrP (7-34) im Gegensatz zu PTHrP (107-111) nicht zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. PTHrP (7-34) beeinflusst jedoch nachgewiesenermaßen das Kontraktilitätsverhalten der Kardiomyozyten durch eine Aktivierung der Proteinkinase A positiv (Schluter, 1999; Schluter et al., 1997). Die Aktivierung der Proteinkinase A erfolgt cAMP-abhängig, wobei PTHrP (7-34) zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration in Kardiomyozyten führt. Schlüter et al. konnten 1997 zeigen, dass PTHrP (7-34) zu einer Zunahme der kontraktile Aktivität von Kardiomyozyten durch die Induktion der spontanen Kontraktilität in 3-Tage-alten Kulturen erwachsener Kardiomyozyten führt und dadurch das maximale *cell shortening* von elektrisch stimulierten isolierten Kardiomyozyten steigert. Diese Induktion konnte durch die Anwesenheit des Proteinkinase A-Inhibitor *Rp-cAMPS* aufgehoben werden, was eine Beteiligung von cAMP bei dieser Antwort zeigt (Schluter et al., 1997).

Diese kardialen Wirkungen der aktiven Domänen 7-34 und 107-111 müssen grundsätzlich von denen des Parathormons unterschieden werden, weil die Aminosäuresequenzen entweder keine

Homologie (PTHrP 107-111) oder nur eine geringe strukturelle Ähnlichkeit mit Parathormon aufweisen und sogar dessen Wirkung blockiert (PTHrP 7-34) (Fenton et al., 1991; Martin et al., 1992; Schluter et al., 1997).

PTHrP (107-111) und PTHrP (7-34) zeigen, dass PTHrP Proteinkinase C- und Proteinkinase A-abhängige Effekte durch seine aktiven Domänen auf das Wachstum und die Kontraktion erwachsener Kardiomyozyten *in vitro* ausüben kann.

1.6 Fragestellung

PTHrP-Peptide haben eine direkte positive inotrope, chronotrope und hypertrophe Wirkung auf Kardiomyozyten. Diese Wirkungen wurden in mehreren *in vitro* Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten dokumentiert (Nickols et al., 1989; Schluter et al., 1997). Uneinigkeit besteht aber in der aktuellen Literatur über die kardiale Wirkung von PTHrP unter *in vivo* Versuchsbedingungen. So konnte zum Beispiel der positiv inotrope Effekt von PTHrP unter Laborbedingungen an schlagenden Herzen, bei denen die Koronargefäße durch NO maximal dilatiert waren, nicht ausgelöst werden (Ogino et al., 1995).

Auf der einen Seite wurde bei Patienten mit einem bestehenden Hyperparathyreodismus eine verminderte kardiale Leistungsfähigkeit und eine Herzhypertrophie nachgewiesen. Dafür sind möglicherweise die entstehenden erhöhten PTH-Spiegel verantwortlich (Marx, 2000; Symons et al., 1985). Da PTHrP (1-36) - wie PTH - über den PTH1-Rezeptor wirkt, könnte PTHrP (1-36) einen vergleichbaren Einfluss haben. Dazu passt, dass die Serum-PTHrP-Konzentration bei Patienten mit einem chronischen Herzfehler mit der Schwere der kardialen Dysfunktion korreliert (Ogino et al., 2002). PTHrP scheint also durch die Aktivierung des PTH1-Rezeptors zu der Entwicklung eines Herzfehlers beizutragen. Auf der anderen Seite ist die ventrikuläre Expression von PTHrP ein sehr frühes, schnelles und instationäres Merkmal der ventrikulären Adaptationsvorgänge an eine kardiale Druckbelastung. Im weiteren Verlauf konnte eine vermehrte Bildung von TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor beta*) beobachtet werden. TGF- β 1 spielt nachgewiesenermaßen eine wichtige pathophysiologische Rolle beim Übergang von einer druckinduzierten Herzhypertrophie in eine Herzinsuffizienz. TGF- β 1 unterdrückt in diesem Zusammenhang die Expression von PTHrP, was eine Beteiligung an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz nicht unterstützt (Wenzel et al., 2001).

Obwohl sehr viele *in vitro* Studien die Rolle von PTHrP und seiner aktiven Domänen untersucht haben, ist die Rolle der aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) *in vivo* noch nicht klar. Daher sollte in der vorliegenden Studie geklärt werden, welche Funktion die beiden Domänen PTHrP (7-34) und (107-111) bei gesunden adulten Versuchstieren auf das kardiovaskuläre System ausüben.

Erstes Forschungsziel dieser Studie ist: welche Wirkung der PTH-Rezeptor Antagonist PTHrP (7-34) unter physiologischen Bedingungen *in vivo* hat.

Zweites Forschungsziel dieser Studie ist: kann die aktive Domäne PTHrP (107-111) allein unter *in vivo* Bedingungen eine kardiale Hypertrophie induzieren und somit zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Herzfunktion im Sinne einer Herzinsuffizienz führen?

Zur Charakterisierung der kardiovaskulären Funktion wurden die folgenden Parameter gemessen:

- 1) Die kardiale Hypertrophie, durch das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht bzw. Tibialänge sowie der Bestimmung des reinen Herz- und Lungengewichts
- 2) die kardiale Hämodynamik mittels einer Linksherzkatheteruntersuchung (Beurteilung des peripheren und zentralen Blutdrucks, der maximalen kardialen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, der peripheren und zentralen Herzfrequenz)
- 3) sowie die Auswertung und Beurteilung von EKG-Ergebnissen.

II. Material und Methodik

2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Für die Versuche standen männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6 zur Verfügung. Ein Großteil der Versuchstiere wurde direkt von der Firma Charles River (Deutschland GmbH, D-Sulzfeld) bezogen, die übrigen Versuchstiere wurden der institutseigenen Zucht entnommen, wobei deren Stammeltern ebenfalls von der Firma Charles River stammten.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter sorgfältiger Beachtung aller tierschutzrechtlichen und hygienischen Forderungen und Rahmenbedingungen und den versuchsseitig notwendigen qualitativen Bedingungen in transparenten großen Polycarbonatkäfigen der Abmaße 365 x 207 x 140 mm, mit eingestreutem Altromin Tiereinstreu Granulat der Firma Altromin GmbH und Co. KG (D-Lage-Lippe), unter Sicherstellung gleichmäßiger Umweltbedingungen, 20-22°C Raumtemperatur, 50% relative Luftfeuchtigkeit und ein 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die Käfige, in denen die Tiere gehalten wurden, waren Systemteile eines funktionalen Regalsystems, in dem jeder einzelne Käfig einzeln mit Zu- und Abluft versorgt wurde. Die Nahrung (Altromin Standard Diät Maus und Ratte) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Jungtiere aus institutseigener Zucht wurden im Alter von 4 Wochen von den Elterntieren getrennt und nach Geschlechtern unterteilt.

2.2 Gruppeneinteilung und *in vivo*-Versuche

Für den *in vivo*-Versuchsaufbau wurden ausschließlich männliche Tiere eingesetzt. Insgesamt wurden 28 Mäuse des Stammes C57BL/6 – eingeteilt in vier verschiedene Gruppen - untersucht.

Gruppe 1:	PTHrP 7-34
Gruppe 2:	PTHrP 107-111
Gruppe 3:	Placebo-Gruppe
Gruppe 4:	Sham-Gruppe

Getestet wurden die zwei aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111). Beide werden in Kapitel 2.3 näher beschrieben. Die Testsubstanzen wurden mit Hilfe von osmotischen Minipumpen appliziert. Die Operation der Versuchstiere erfolgte im Alter von 6-8 Wochen. Die Arbeitsweise und Handhabung der Pumpen ist in Kapitel 2.4 erläutert.

Den Gruppen 1 + 2 wurden Pumpen - gefüllt mit der jeweiligen Testsubstanz - implantiert (vgl. Kapitel 2.4), während die Gruppe 3 (Placebo-Gruppe) Pumpen gefüllt mit 100 µl steriler NaCl-Lösung erhielt. Jedes einzelne Tier wurde vor der Implantation der osmotischen Minipumpe und vor dem Abschluss des Experimentes gewogen.

2.3 PTHrP-Agentien

Für unsere Versuchsreihen kamen Untergruppen des Parathormone Related Peptide (PTHrP) zum Einsatz. Hierbei handelte es sich um die synthetisch hergestellten Substanzen PTHrP 7-34 und PTHrP 107-111 der Firma *Bachem, Schweiz*. Das Peptid PTHrP 7-34 hatte die Lot No. 0555893 und 0567724 (human, rat). Das Peptid PTHrP 107-111 hatte die Lot No. 509554 (human, bovine, dog, rat, rabbit, horse).

2.4 Handhabung und Implantation der osmotischen Pumpen

Die osmotischen Pumpen der Firma *alzet*[®] (Model 1002) haben ein Fassungsvermögen von 90 µl +/- 10 µl und geben 0,25 µl/Std. des Wirkstoffes gleichmäßig über einen Zeitraum von 14 Tagen ab.

Vor dem Einbringen des Wirkstoffes in die Pumpen wurden 0,5 mg des jeweiligen PTHrP-Agens in 138 µl NaCl gelöst, um davon 10 µl in die Pumpen zu geben. Zu diesen 10 µl des PTHrP-Agens wurden dann noch 90 µl NaCl zusätzlich in die Pumpen gefüllt. Somit bestand insgesamt eine Konzentration von 100 µl/Liter des Agens in den Pumpen.

Den für die Versuchsreihe bestimmten Mäusen wurden *Osmotic Pumps* der Firma *alzet*[®], mit einer Füllmenge von 100 µl implantiert (s. Abbildung 2).

In die Pumpen wurde das zu untersuchende Agens mit Hilfe eines speziellen Applikationssets der Firma *alzet*[®] steril eingebracht. Zielsetzung der Implantation der osmotischen Pumpen war, durch

Diffusion den Wirkstoff kontinuierlich über einen Zeitraum von insgesamt 14 Tagen an den Organismus der Maus abzugeben.



Abbildung 2:

Die zur Implantation des Test-Agens verwendeten *Osmotic Pumps* der Firma *alzet*[®] (Darstellung im Maßstab 1:0,22; die Pumpe hat im Original eine Länge von 1,5 cm).

Vor der Implantation der Pumpen mussten den Versuchstieren zunächst die Haare im Bereich des geplanten Hautschnittes mit einem elektrischen Rasierer und einer Enthaarungscreme entfernt werden. Danach erfolgte - nach gründlicher Desinfektion dieses Bereiches - mit einer Polyvidon-Jod-Lösung (*Betaisodona*[®], Mundipharma GmbH, D-Limburg) eine Querinzision im kaudalen Bereich des Rückens über eine Länge von ca. 1-1,5 cm. Das subkutane Fettgewebe wurde nach kranial stumpf mit einer Schere präpariert und so ein Kanal zur Implantation der Pumpe geschaffen und die Pumpe anschließend mit einer Pinzette bis in den Bereich des Nackens in diesem Kanal vorgeschoben und dort subkutan implantiert. Die Inzision wurde nach erneuter Desinfektion mit der Polyvidon-Jod-Lösung, mit einem nicht- resorbierbaren Faden der Stärke 3-0 (*Seralon*[®] 3/0, 75cm der Firma *Serag Wiessner*, D-Naila) in Einzelknopfnahntechnik verschlossen.

Jedem Tier wurde jeweils nur eine *alzet*[®] *Osmotic Pump* implantiert. Nach der Operation erfolgte die Unterbringung der Versuchstiere jeweils in einem separaten Käfig, um eine Manipulation der OP-Wunde durch andere Mäuse zu verhindern.

2.5 Wirkungsweise der osmotischen Pumpen

Die Wirkungsweise der osmotischen Pumpe der Firma alzet[®] basiert auf dem Prinzip, dass zwischen dem inneren Kompartiment der Pumpe, dem sogenannten *Salt Sleeve*, und dem umliegenden Gewebe, in welches die Pumpe implantiert wird, eine osmotische Druckdifferenz besteht. Durch die hohe Osmolarität des *Salt Sleeves* wird Wasser durch eine semipermeable Membran in die Pumpe gesaugt. Die Membran bildet die äußere Oberfläche der Pumpen. Sobald das Wasser das *Salt Sleeve* erreicht, wird ein flexibles Reservoir komprimiert, so dass das Testagens über den sog. *Flow Moderator* aufgrund seines Durchmessers in kontrollierten und vorher festgesetzten Raten aus der Pumpe abgegeben wird. Weil das komprimierte Reservoir nicht mehr nachgefüllt werden kann, ist nur eine einmalige Verwendung der osmotischen Pumpen möglich (s. Abbildung 3).

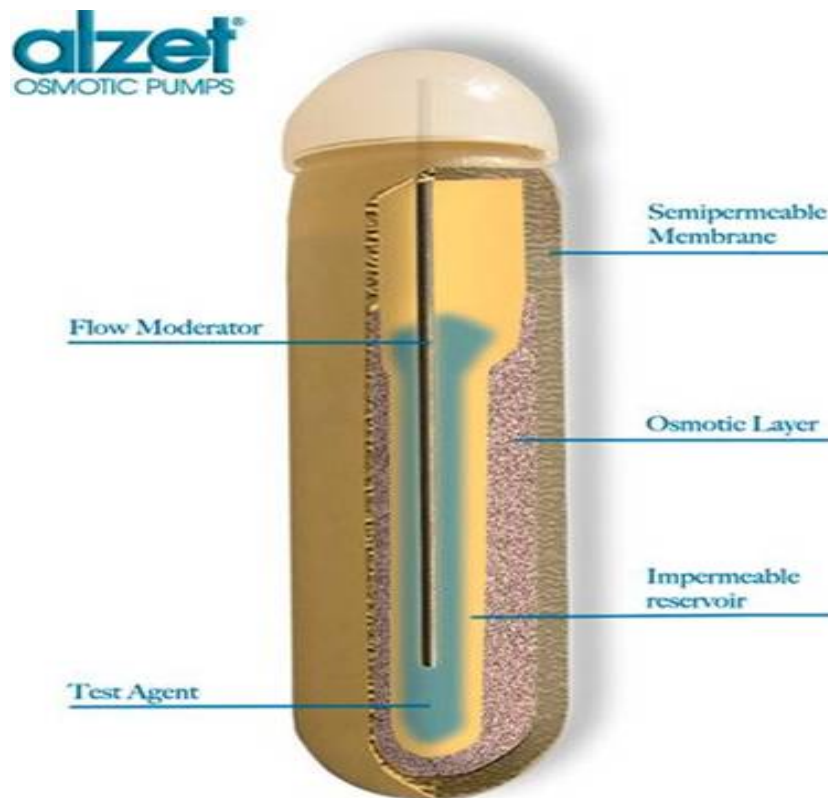


Abbildung 3:

Feinstrukturelle Darstellung und innerer Aufbau der osmotischen Pumpen und Bezeichnung der einzelnen Kompartimente (Längsschnitt).

2.6 Injektion versus Infusion

Die Implantation von osmotischen Pumpen hat gegenüber der herkömmlichen Injektionstechnik eine Anzahl von entscheidenden Vorteilen:

- (1) Die Applikation einer osmotischen Pumpe gewährleistet eine gleichmäßige und kontinuierliche Abgabe des zu untersuchenden Wirkstoffes an den Organismus der Maus. Im Gegensatz zu einer möglichen Applikation per injectionem kommt es im Organismus des Tieres nicht zu Konzentrationsspitzen im Plasma und anschließendem schnellen Abfall der Plasmakonzentration des Wirkstoffes [sog. Drop-Offs post injectionem] (s. Abbildung 4 und 5).

- (2) Testagenzien werden nach einer Injektion relativ schnell aus dem Plasma und den Geweben eliminiert, wobei Ratten und Mäuse aus Laboratorien Testagenzien wesentlich schneller eliminieren als Menschen.
- (3) Ein weiterer wesentlicher Vorteil besteht darin, dass der Stress des Versuchstieres gegenüber Injektionen reduziert wird und das Wachstum des Tieres unbeeinflusst bleibt.
- (4) Weiterhin produziert eine Injektion im Plasma ein effektives Konzentrationsniveau, welches die Toxizitätsgrenze schnell überschreiten und Nebenwirkungen verursachen kann. Dies ist bei der Infusionstechnik mittels einer osmotischen Minipumpe nicht gegeben.
- (5) Die Dauer der Serumaktivität ist nach einer Injektion auf wenige Stunden limitiert, wobei sich oft lediglich ein unzureichender biologischer Effekt entwickeln kann, im Gegensatz zu einer über 14 Tage dauernden kontinuierlichen Abgabe des Wirkstoffes über 24 Stunden.

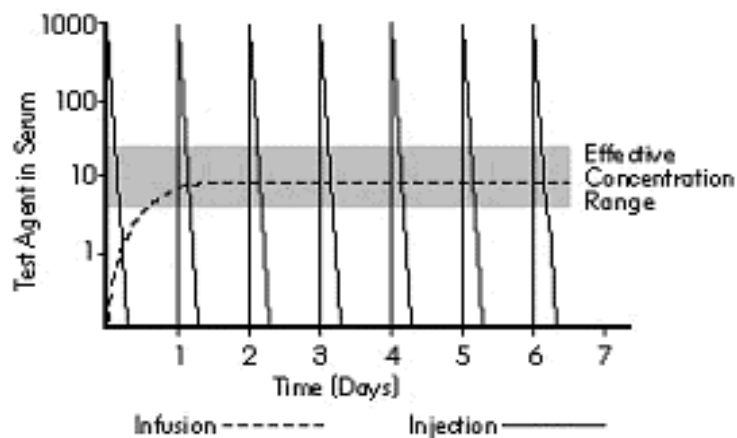


Abbildung 4:

Diese Graphik verdeutlicht das Plasma-Level eines Testagens, welches einmal per injectionem und einmal per infusionem durch eine osmotische Pumpe verabreicht wurde. Durch die logarithmische Skalierung der Ordinate werden die effektiven Konzentrationsschwankungen optisch verringert.

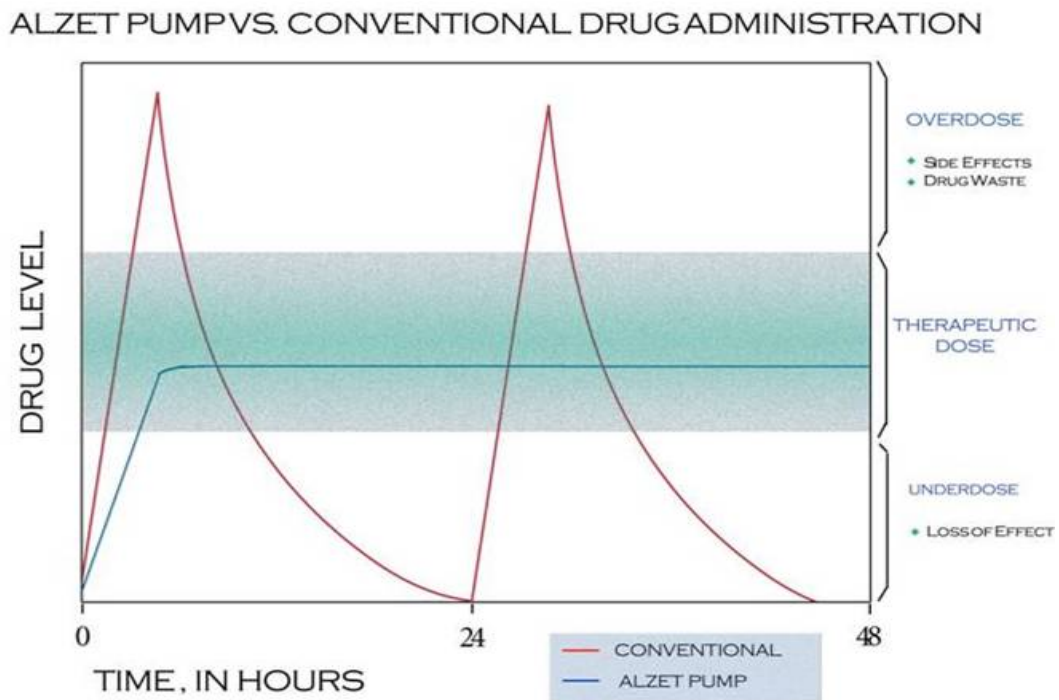


Abbildung 5:

Darstellung des durch die verwendeten osmotischen Pumpen erreichten kontinuierlichen effektiven Plasma-Levels des Agens in einem Organismus.

2.7 Narkose

In einem ersten Schritt erfolgte die Messung des Körpergewichts der Tiere prä operationem. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Inhalationsbox mit 2% Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden) und einem Sauerstoff-Flow von 2 l/min. Bei einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Tiere auf dem Bauch liegend auf einem durch ein Wasserbad (42°C) beheizten Operationstisch fixiert, wobei die weitere Versorgung mit Narkosegas über einen Nasenkonus gewährleistet war. Für die hämodynamische Messung erfolgte die Narkoseeinleitung auch nach der oben beschriebenen Weise, die Tiere wurden jedoch für die Kathetermessung auf dem Rücken gelagert.

2.8 Messung der Hämodynamik und der EKG-Daten

14 Tage nach der Implantation der Pumpen erfolgte die Aufzeichnung des Elektrokardiogramms (EKG) sowie die invasive Messung sowohl des peripheren Blutdrucks in der A. carotis communis rechts, also prästenotisch, als auch des linksventrikulären Blutdrucks mit Hilfe eines 1,4 French Millar-Katheters. Diese durchgeführte Messmethode bei geschlossenem Thorax ist bereits mehrfach in der Literatur als gebräuchlich und erfolgreich beschrieben (Baumgarten et al., 2006; Doevendans et al., 1998; Lorenz und Robbins, 1997).

Dazu wurden die Mäuse wie in Kapitel 2.5 beschrieben narkotisiert und auf dem Operationstisch fixiert. Zunächst wurde für zehn Minuten ein EKG mittels einer Extremitätenableitung geschrieben. Danach wurde das Versuchstier zur Präparation der A. carotis communis dexter median von submental bis zum Thorax eröffnet. Die rechte Speicheldrüse und der rechte Anteil der Schilddrüse wurden stumpf freipräpariert und mit einer Arterienklemme zur Seite gehalten. Daraufhin erschien das Gefäß als pulsierende Struktur zwischen zwei Muskelbäuchen.

Nach Trennung der Arterie von der parallel laufenden Vena jugularis und dem Nervus vagus wurden drei Seidenfäden von ca. 5-7 cm Länge unter dem Gefäß durchgezogen. Mit dem kranial gelegenen Faden wurde die Arterie ligiert und nach kranial gespannt. Der zweite, kaudal gelegene Faden wurde mit einem Nadelhalter gefasst und nach kaudal gezogen, so dass die Blutzufuhr unterbunden war. Der dritte Faden diente dazu, einen Knoten vorzubereiten, der nicht zugezogen an das kaudale Ende des Gefäßabschnittes gelegt wurde (s. Abbildung 6). Mit Hilfe einer Augenschere wurde bei 16-facher Vergrößerung möglichst weit kranial ein Schnitt quer zum Gefäß gesetzt, der etwa ein Drittel des Umfanges umfasste. Durch das entstandene Loch wurde der Millar-Katheter eingeführt und mit dem dritten Faden fixiert (s. Abbildung 6). Der kaudale Faden wurde nun wieder gelöst, um den Blutzufluss wiederherzustellen.

Der Katheter wurde danach intravasal bis vor die Aortenklappen vorgeschoben. Dies war erkennbar durch ein Zittern des Katheters. Nun wurde der Katheter direkt wieder zwei bis drei Millimeter zurückgezogen, um sicherzustellen, dass die Messung des peripheren Blutdrucks bei jedem Tier an der gleichen Stelle stattfand.

Der Millar-Katheter war über ein Power lab data acquisition system (ADInstruments, D-Spechbach) an einen Computer angeschlossen. Mit Hilfe der Software Chart 5 for Windows[®] erfolgte während des Vorgangs die Aufzeichnung der Blutdruckkurve. Nach Beendigung der Aufzeichnung des peripheren Blutdrucks nach zehn Minuten wurde der Katheter weiter in den

linken Ventrikel vorgeschoben. Dass die Katheterspitze an der richtigen Stelle lag, war durch den plötzlich abfallenden diastolischen Druck zu erkennen.

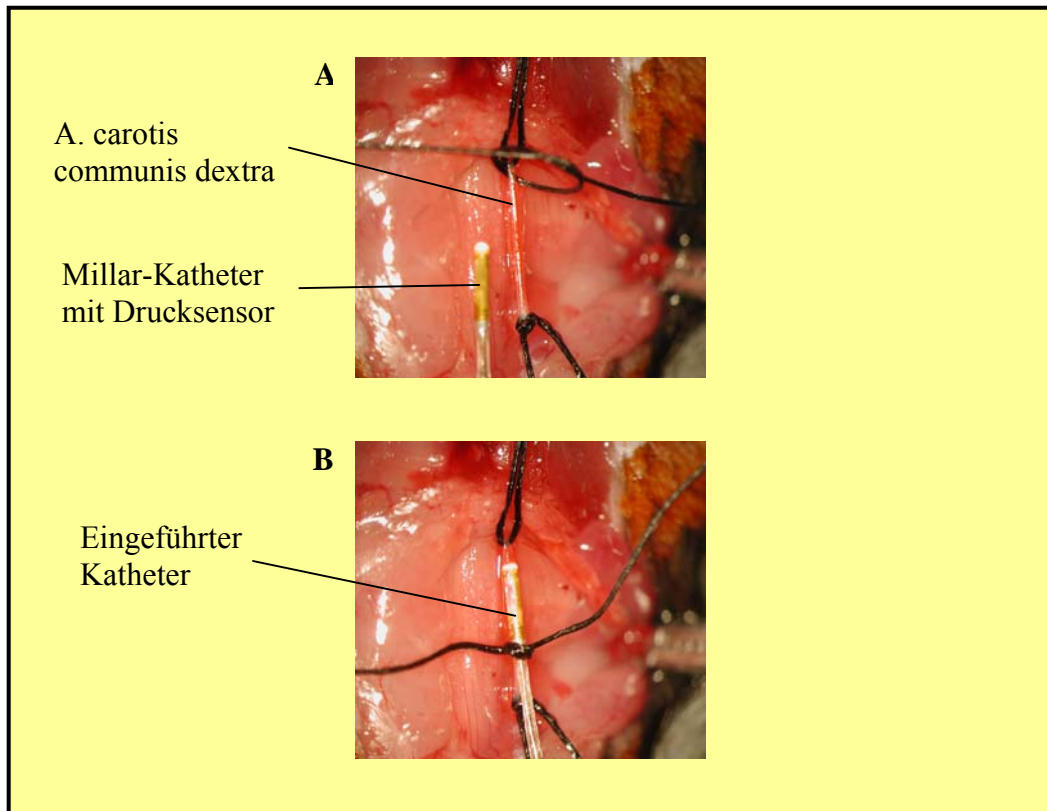


Abbildung 6: Hämodynamische Messung mithilfe eines Mikrotip-Druckkatheters (Darstellung im Maßstab 1:0,35; die Katheterspitze hat eine Originallänge von 3 mm)

A Freipräparierte A. carotis communis dextra, mit Nahtmaterial fixiert

B Eingeführter Druckkatheter der Firma Millar

Der linksventrikuläre Druck wurde für weitere 10 Minuten gemessen. Nach Beendigung dieser Aufzeichnung erfolgte die Entfernung des Katheters aus dem Gefäß.

Die Präparation des Gefäßes und das Einführen des Katheters erfolgten bei 2 %Vol. Isofluran und 2 l/min O₂-Fluss, die Aufnahme des EKG und der Hämodynamik bei 1 %Vol. Isofluran und 1 l/min O₂-Fluss.

2.9 Blutentnahme

Nach erfolgreicher Messung erfolgte die Entfernung des Katheters und die Maus wurde durch Entbluten getötet. Das aus der A. carotis communis dextra entweichende Blut wurde mit einer 1 ml fassenden Spritze aufgefangen und anschließend in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Serum-Überstand wurde entnommen und für weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.10 Organentnahme

Der Thorax der Maus wurde nun eröffnet und sowohl die Lunge als auch das Herz entnommen und in einer Petrischale mit PBS (Pufferlösung) von umliegendem Bindegewebe und eventuell verbleibendem Perikard befreit. Vom Herzen wurden die Vorhöfe und anhängende Gefäßreste entfernt und der rechte vom linken Ventrikel getrennt. Nach vorsichtigem Ausdrücken auf saugfähigem Zellstoff wurde die Trockenmasse der Organe auf einer Feinwaage (Fa. Ohaus, Pinebrook, NJ, USA) ermittelt. Anschließend wurden sie in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben und ebenfalls für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Tibia wurde herauspräpariert und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers (Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich) erfasst.

2.11 Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien

- Operationsbesteck: unterschiedliche Pinzetten, Scheren, Klemmen, Wund-Retraktoren und ein Nadelhalter (Fine Science Tools Inc., San Francisco, CA, USA)
- Betaisodona[®] Lösung (Mundipharma GmbH)
- Alkohol vergällt
- Isofluran: Forene (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Nahtmaterial: 3-0 Prolene[®] (Polypropylen; Ethicon, Norderstedt) für die Thoraxhefte und 3-0 Pronova[®] (Ethicon, Norderstedt) für die Hautnähte, beide monophil und nicht resorbierbar

2.12 Geräte für die *in vivo*-Eingriffe

- Millar-Katheter: Mikro-Tip Pressure Katheter aus Nylon mit 1,4 French Drucksensor (Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA)
Datenverarbeitung durch Power Lab data acquisition System (ADInstruments, Castle Hill, Australien) dazu gehörige Software: Chart 5 for Windows[®], zur Auswertung der EKG-Daten: Chart 5 for Macintosh[®] (ADInstruments)
- Beatmungsgerät: MiniVent, Typ 845, (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten)
- Operationsmikroskop: OpMi-191294 (ZEISS, Oberkochen)
- OP-Tisch: Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts 2 mit angeschlossenem Wärmebad (Rhema-Labortechnik, Hofheim)

2.13 Phosphate buffered saline (PBS)

Bei PBS handelt es sich um eine Pufferlösung aus NaCl, KCl, Na₂HPO₄·xH₂O, KH₂PO₄ und Aqua bidest., der pH-Wert liegt bei 7.5. Zur Injektion wurde das PBS steril abgefüllt und bei 4°C gelagert.

2.14 Auswertung der Daten der Hämodynamik-Messung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms Software Chart 5 for Windows[®]. In der aufgezeichneten Blutdruckkurve wurde eine Minute markiert. Das Programm errechnete verschiedene Parameter, von denen einige zur weiteren Auswertung verwendet wurden. Für den peripheren Blutdruck waren das die Herzfrequenz, der systolische (SAP), enddiastolische (DAP) und mittlere (MAP) arterielle Blutdruck.

- *Herzfrequenz*: Die Herzfrequenz errechnete sich aus dem Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Amplituden in der Blutdruckkurve.
- *Systolischer arterieller Blutdruck*: Dieser wurde errechnet als die gemittelten Maxima der Blutdruckkurve.
- *Diastolischer arterieller Blutdruck*: Dieser wurde errechnet als die gemittelten

Minima der Blutdruckkurve.

- *Mittlerer arterieller Blutdruck*: Dieser wurde aus der Blutdruckkurve errechnet, indem die gemittelten Maxima zu 1/3 und die gemittelten Minima zu 2/3 zählten.

Aus der im linken Ventrikel gemessenen Blutdruckkurve errechnete sich die Herzfrequenz, der systolische (SHP) und enddiastolische (DHP) Blutdruck sowie die Kontraktions- (dP/dt_{\max}) und Relaxationsgeschwindigkeit ($-dP/dt_{\min}$).

2.15 Auswertung der EKG-Ergebnisse

Die Auswertung der EKG-Daten erfolgte mit dem Programm *Chart 5 for Windows*[®].

Pro Versuchstier wurden 50 aufeinanderfolgende Komplexe des aufgezeichneten EKG's gemittelt, wobei das Programm die R-Zacke zur Synchronisation verwendete. In den gemittelten Komplexen wurde manuell der Beginn der P-Welle, die Q-Zacke und das Ende der T-Welle markiert. Anschließend errechnete das Programm selbständig verschiedene Parameter, Längen und Amplituden, aus den EKG-Komplexen, wie sie in Abbildung 7 dargestellt sind. Die Definitionen der verschiedenen Parameter entsprechen denen, wie sie Korte et al. (2005) vorschlugen (Korte et al., 2005). Neben den in Abbildung 7 gezeigten zeitlichen Intervallen wurden noch zwei weitere Amplituden ausgewertet, die der P-Welle und die des QRS-Komplexes. Die Amplitude der P-Welle ist daher die Differenz zwischen dem Spannungswert, der am Maximum der P-Welle ermittelt wird, und der isoelektrischen Linie. Die Differenz der Spannungen von der R- und der S-Zacke wird als Amplitude des QRS-Komplexes wiedergegeben.

Vor jeder hämodynamischen Messung wurde bei den Versuchstieren ein EKG über einen Zeitraum von 10 Minuten geschrieben. Dabei kam eine bipolare Standard-Extremitätenableitung nach *Einthoven* zur Anwendung, wobei lediglich die Ableitung II aufgezeichnet wurde.

Während der letzten Minute dieser EKG-Aufzeichnung wurden 50 aufeinanderfolgende EKG-Komplexe gemittelt. Die Auswertung der gemittelten EKG's erfolgte mit Hilfe des EDV Programms *Chart5 for Windows*[®]. Die Ergebnisse wurden dann in eine Excel-Tabelle übertragen. Mit diesem Programm wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Gruppen

bestimmt. Die statistische Darstellung der ermittelten Ergebnisse erfolgte mit Programm GraphPad Prism 3.0®.

Es wurden die folgenden Parameter der EKG's gemessen und ausgewertet:

- **p-Welle:** Die p-Welle entspricht der Vorhofdepolarisation und registriert die Erregung der Vorhöfe. Es wurde die Amplitude der p-Welle in mV und die Dauer der p-Welle in ms gemessen.
- **PR-Intervall:** Die PR-Strecke, die in humanen EKG üblicherweise als PQ-Strecke angegeben wird, ist ein Maß für die Überleitungszeit der Vorhoferregung auf die Kammererregung. Das PR-Intervall wird in ms angegeben.
- **Amplitude der Q-Zacke:** Die Amplitude der Q-Zacke wird in mV angegeben.
- **QRS-Komplex:** Der QRS-Komplex ist der elektrokardiographische Ausdruck der Erregungsausbreitung in der Herzkammer und entspricht daher der elektrischen Erregung der Ventrikel. Beim Menschen beginnt der Komplex mit der negativen Q-Zacke und konnte bei den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Auf die Q-Zacke folgt die positiv gerichtete R-Zacke. Das Ende des QRS-Komplexes wird durch die S-Zacke gebildet.
Es wurde sowohl die Dauer (in ms) als auch die Amplitude (in mV) des QRS-Komplexes verglichen.
- **QT-Intervall:** Die QT-Zeit zeigt die gesamte elektrische Herzkammeraktion. Sie beginnt mit der Q-Zacke und endet mit dem Wiedererreichen der isoelektrischen Linie der T-Welle. Die Erregungsausbreitung beginnt mit dem QRS-Komplex über die totale Kammererregung (ST-Strecke) bis zum Ende der Erregungsrückbildung (T-Welle.) Das QT-Intervall wird in ms angegeben. Die QT-Zeit ist abhängig von der Herzfrequenz, sie nimmt bei Tachykardie ab und bei Bradykardie zu. Durch die elektrokardiologische Darstellung der gesamten elektrischen Kammeraktion stellt die QT-Zeit einen wichtigen Teil für die Erkennung von Herzrhythmusstörungen dar.

Mirvis et al. (1985) und Sylvén et al. (1984) entdeckten eine Variation von QT-Intervallen in Brustwandableitungen (Mirvis, 1985; Sylven et al., 1984). Die Differenz zwischen dem längsten und dem kürzesten QT-Intervall eines 12-Kanal-EKG's wird QT-Dispersion genannt (Day et al., 1990). Da von einer Stabilität der Dauer des QRS-Komplexes ausgegangen wird, repräsentiert diese Differenz der QT-Intervalle eine Unregelmäßigkeit der Erregungsrückbildung, die als klinisches Maß einer ventrikulären Repolarisationsstörung angesehen werden kann. Das QT-Intervall ist bei Patienten mit angeborenem langem QT-Syndrom, bei hypertropher und dilatativer Kardiomyopathie, bei denen bereits ventrikuläre Tachyarrhythmien aufgetreten waren, unter Antiarrhythmikatherapie und bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung und tachyarrhythmischen Komplikationen verlängert. Diese Variation in der ventrikulären Erholungszeit stellt aufgrund des Geschwindigkeitsunterschiedes die Gefahr eines Reentry-Mechanismus ein erhöhtes Risiko dar, eine ventrikuläre Tachyarrhythmie zu erleiden (Hohnloser et al., 1993).

- **JT-Intervall:** Das EKG der Maus unterscheidet sich gravierend von dem EKG eines Menschen. Im Maus-EKG geht die S-Zacke ohne eine isoelektrische ST-Strecke in die T-Welle über. Die JT-Strecke wird als Ausdruck für die Erregungsrückbildung der Kammern verwendet. Das JT-Intervall wird in ms angegeben.

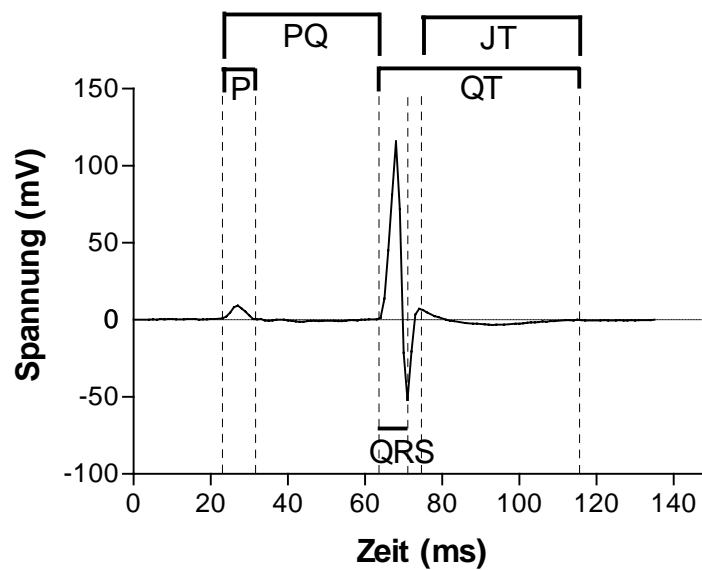


Abbildung 7:

Darstellung der Definitionen der Dauer einzelner Strukturen aus den EKG-Komplexen, die in die statistische Auswertung eingingen.

2.16 Statistik

Mit dem Computerprogramm EXCEL (Microsoft Office 2000[®]) wurden die statistischen Standardwerte (arithmetisches Mittel, Standardabweichung) berechnet und mit dem Programm GraphPad Prism 3.0[®] statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

Zusätzlich erfolgte mit EXCEL die graphische Aufbereitung und Darstellung der eingefügten Tabellen. Zur Testung der Gruppenunterschiede bezüglich der einzelnen Parameter wurde mit dem Programm GraphPad Prism 3.0[®] eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit nachfolgendem *Bonferroni's Multiple Comparison Test* gerechnet. Zum Teil wurde zusätzlich der *Newman-Keuls Post Test* durchgeführt. Die Signifikanzgrenze betrug 95%.

Die Daten wurden graphisch in X-Y-Plots oder Balkendiagrammen als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

2.17 Molekularbiologische Auswertung

Die bei -80° eingefrorenen Organe und das Serum wurden ohne eine Unterbrechung der Kühlkette an die Universität Gießen überbracht. In Gießen wurden die isolierten Kardiomyozyten aus dem ventrikulären Myokard von den dortigen Mitarbeitern molekularbiologisch untersucht und ausgewertet.

III. Ergebnisteil

Für die Gewinnung der Datensätze wurden in der Versuchsreihe insgesamt 28 Versuchstiere in vier verschiedenen Gruppen untersucht. In jeder Gruppe wurden 7 Tiere untersucht.

- | | | |
|-------------|---|-----------------|
| 1) Gruppe 1 | = | Sham |
| 2) Gruppe 2 | = | Placebo |
| 3) Gruppe 3 | = | PTHrP (7-34) |
| 4) Gruppe 4 | = | PTHrP (107-111) |

Der nachfolgende Ergebnisteil gliedert sich in drei Abschnitte.

Im ersten Teil werden die Körper- und Organgewichte der Versuchstiere in tabellarischer Form dargestellt.

Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der linksventrikulären und peripheren hämodynamischen Untersuchung der Versuchstiere beschrieben.

Im dritten und letzten Teil der Ergebnisdarstellung werden die EKG-Auswertungen aufgezeigt.

3.1 Mortalität

Nur zwei Versuchstiere starben innerhalb von 14 Tagen nach Implantation der osmotischen Pumpen, so dass keine weitergehende Untersuchung erfolgen konnte. Das bedeutet eine Mortalitätsrate von 7,1 %. Die genaue Todesursache konnte nicht ermittelt werden. Beide Tiere stammten aus der Gruppe PTHrP 7-34 und starben 5 bzw. 8 Tage nach der Implantation der osmotischen Minipumpe ohne klinische Prodromina.

In der Sham-Gruppe – ohne eine Implantation der osmotischen Minipumpen - starb nach Durchführung der Operation kein Versuchstier.

3.2 Morphologische Befunde

Alle Versuchstiere wurden zum Zeitpunkt der Implantation der osmotischen Minipumpen bzw. der Sham-Operation und 14 Tage später, zum Zeitpunkt der Herzkathetermessung, gewogen.

Nach der durchgeführten hämodynamischen Messung der Versuchstiere wurden diese noch in Narkose durch Ausbluten getötet. Das nach der Entfernung des Herzkatheters aus der A. carotis interna dextra austretende Blut wurde mit einer Spritze sofort aserviert und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Das Blut wurde - wie in Kapitel 2.5 bereits beschrieben - zentrifugiert und eingefroren.

Weiterhin wurde den Tieren das Herz, die Lunge und die Tibia entnommen und gewogen bzw. gemessen. Die unten aufgeführten Tabellen geben die Ergebnisse dieser Messungen wieder.

3.2.1 Körpergewicht der Versuchstiere am Tag der Implantation und am Tag der Herzkathetermessung

Der Mittelwert des Körpergewichtes der Tiere vor der Implantation der osmotischen Minipumpen bzw. der Sham-Operation war mit Werten zwischen 20,93 und 21,06 Gramm in allen Gruppen nahezu gleich. Die Standardabweichung war in den Gruppen PTHrP 7-34 und der Sham-Gruppe am größten, aber mit einem Wert von 1,36 bzw. 1,56 Gramm relativ gering.

Auch 14 Tage nach der Implantation der osmotischen Minipumpen bzw. der Sham-Operation war das Körpergewicht der Tiere mit Werten zwischen 21,17 und 21,87 Gramm im Mittel nahezu gleich. Die Standardabweichung ist relativ gering und liegt in dem prognostizierten Bereich.

Bei den Messungen der Körpergewichte der Versuchstiere wurde das Leergewicht der osmotischen Minipumpe entsprechend berücksichtigt (s. Tabelle 1).

Tabelle 1:

Mittleres Körpergewicht der Versuchstiere (Anzahl n) zum Zeitpunkt der Implantation der osmotischen Minipumpen bzw. der Sham-Operation (BW-1) und zum Zeitpunkt der hämodynamischen Herzkathetermessung (BW-2) 2 Wochen später in Gramm (g).

Insgesamt wurden 28 Mäuse (Gesamt-n 28) des Stammes C57BL/6 – eingeteilt in vier verschiedene Gruppen – untersucht. Die aktiven Domänen PTHrP 7-34 und PTHrP 107-111 sowie die Placebo- und die Sham-Gruppe beinhalten jeweils 7 Tiere (n = 7).

BW-1 (g)	PTHrP 7-34	PTHrP 107-111	Placebo	Sham
arithmetisches Mittel	20,93	20,19	21,06	20,89
Standardabweichung	± 1,36	± 0,4	± 1,01	± 1,56
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7
BW-2 (g)				
arithmetisches Mittel	21,17	21,51	21,87	21,79
Standardabweichung	± 1,14	± 0,8	± 0,49	± 1,45
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

3.2.2 Lungengewicht nach Entnahme

Die Lungengewichte der einzelnen Gruppen lagen mit ihrem Mittelwert zwischen 138,29 und 152,46 mg, wobei das Lungengewicht in der Gruppe PTHrP 107-111 am niedrigsten und in der Sham-Gruppe am höchsten war. Die Gewichte der Lungen der Placebo- und der PTHrP 7-34-Gruppe lagen mit 143,44 und 146,79 mg im mittleren Bereich. Die Standardabweichung war in der Sham-Gruppe auffallend groß. Bei der statistischen Auswertung mit einem One-way ANOVA *Bonferroni* Multiple Comparison Test ergab sich keine Signifikanz in bezug auf die Ergebnisse (s. Tabelle 2).

Tabelle 2:

Darstellung der Lungengewichte der Versuchstiere zum Zeitpunkt der hämodynamischen Herzkathetermessung in mg. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

Lungengewicht (mg)	PTHrP 7-34	PTHrP 107-111	Placebo	Sham
arithmetisches Mittel	143,44	138,29	146,79	152,46
Standardabweichung	± 8,54	± 10,98	± 3,95	± 27,3
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

3.2.3 Herzgewicht nach Entnahme

Die Ergebnisse der Messungen der Herzgewichte der untersuchten Tiere zeigten homogene Werte. Die Herzgewichte lagen im Mittel zwischen 106,81 mg in der PTHrP 107-111-Gruppe und 114,36 mg in der Placebo-Gruppe. Die Standardabweichung war in allen Gruppen gering und dabei am größten in der PTHrP 107-111-Gruppe mit 7,4 mg (s. Tabelle 3).

Tabelle 3:

Die Tabelle stellt das Herzgewicht nach der hämodynamischen Herzkathetermessung in mg dar. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

Herzgewicht (mg)	PTHrP 7-34	PTHrP 107-111	Placebo	Sham
arithmetisches Mittel	112,7	106,81	114,36	111,07
Standardabweichung	± 5,33	± 7,4	± 1,69	± 5,77
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

3.2.4 Länge der Tibia nach Entnahme

Die Länge der Tibia war zwischen den Gruppen der Versuchsreihe kaum unterschiedlich. Die Standardabweichungen waren in allen Gruppen gering (s. Tabelle 4).

Tabelle 4:

Die Tabelle zeigt die Länge der Tibia der einzelnen Gruppen in mm. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

Tibialänge (mm)	PTHrP 7-34	PTHrP 107-111	Placebo	Sham
arithmetisches Mittel	17,81	17,66	17,9	17,74
Standardabweichung	± 0,16	± 0,33	± 0,08	± 0,37
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

3.2.5 Heartweight-Bodyweight-Ratio (HW/BW)

Der Herzparameter als Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (HW/BW) wird standardmäßig errechnet und zeigt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (s. Tabelle 5).

Tabelle 5:

Die Tabelle zeigt den Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht (HW/BW) zum Zeitpunkt der hämodynamischen Messung in mg/g. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

HW/BW (mg/g)	PTHrP 7-34	PTHrP 107-111	Placebo	Sham
arithmetisches Mittel	5,33	4,97	5,23	5,11
Standardabweichung	± 0,15	± 0,38	± 0,18	± 0,31
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

3.2.6 Heartweight-Tibiallänge-Ratio (HW/TL)

Der Quotient aus Herzgewicht und Tibiallänge (HW/TL) wird standardmäßig errechnet und zeigt zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (s. Tabelle 6). Der Parameter HW/TL erscheint zuverlässiger als die Berechnung des Quotienten HW/BW, da bei den Versuchstieren ein geschlechtsunterschiedliches Wachstum besteht und das Körpergewicht durch den allgemeinen klinischen Status des Tieres beeinflusst wird.

Tabelle 6:

Die Tabelle zeigt den Quotienten aus Herzgewicht und Tibiallänge (HW/TL) zum Zeitpunkt der hämodynamischen Messung in mg/mm. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

HW/TL (mg/mm)	PTHrP 7-34	PTHrP 107-111	Placebo	Sham
arithmetisches Mittel	6,32	6,05	6,39	6,26
Standardabweichung	± 0,15	± 0,35	± 0,096	± 0,31
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 7

3.3 Ergebnisse der peripheren hämodynamischen Untersuchung

3.3.1 Untersuchung der Herzfrequenz bei der peripheren hämodynamischen Blutdruckuntersuchung

Die Herzfrequenz ergab während der peripheren Blutdruckaufzeichnung in der A. carotis interna dextra in allen untersuchten Gruppen annähernd gleiche Werte, die im Mittel zwischen 472 bis 528 Schlägen/min lagen und somit vergleichbare Werte mit der während der intrakardialen Blutdruckaufzeichnung gemessenen Herzfrequenz lieferten. Lediglich die Herzfrequenzen der Gruppe PTHrP 107-111 lagen mit einem Mittelwert von 472 Schlägen/min. im Vergleich zu den anderen Gruppen - wie bei der intrakardialen Aufzeichnung - etwas niedriger als in den Vergleichsgruppen (s. Abbildung 8). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

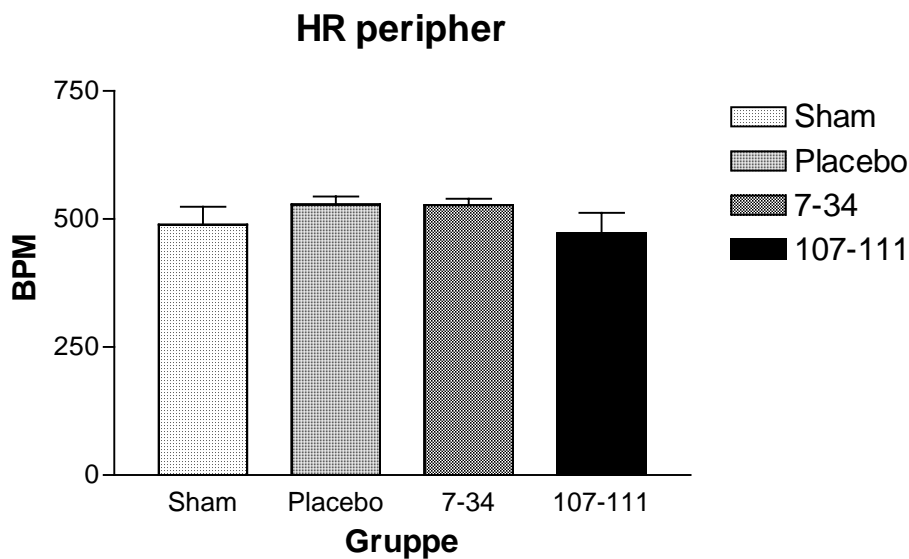


Abbildung 8:

Darstellung der peripheren Herzfrequenz (HR peripher) der untersuchten Gruppen in Schlägen pro Minute (BPM). Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.3.2 Untersuchung des peripheren systolischen Blutdrucks

Die in der A. carotis interna dextra gemessenen peripheren Blutdruckkurven lagen mit ihren systolischen Werten zwischen 97 und 107 mmHg. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abbildung 9).

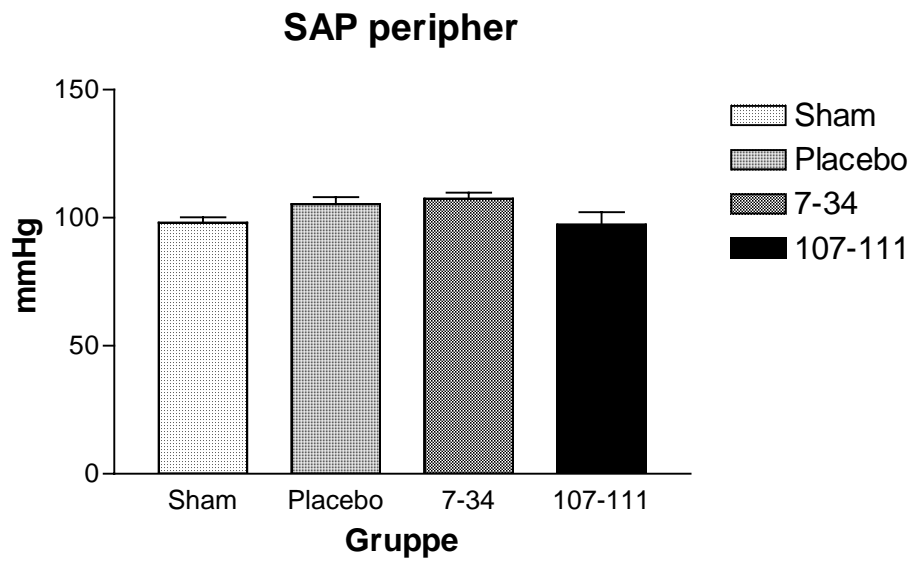


Abbildung 9:

Darstellung des peripheren systolischen arteriellen Blutdrucks (SAP peripher) der untersuchten Gruppen in mmHg. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.3.3 Untersuchung des peripheren diastolischen Blutdrucks

Die in der A. carotis interna dextra gemessenen peripheren Blutdrücke lagen mit ihren diastolischen Werten zwischen 68 und 79 mmHg. Zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich bei der statistischen Auswertung mit dem *Bonferroni* Multiple Comparison Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (s. Abbildung 10).

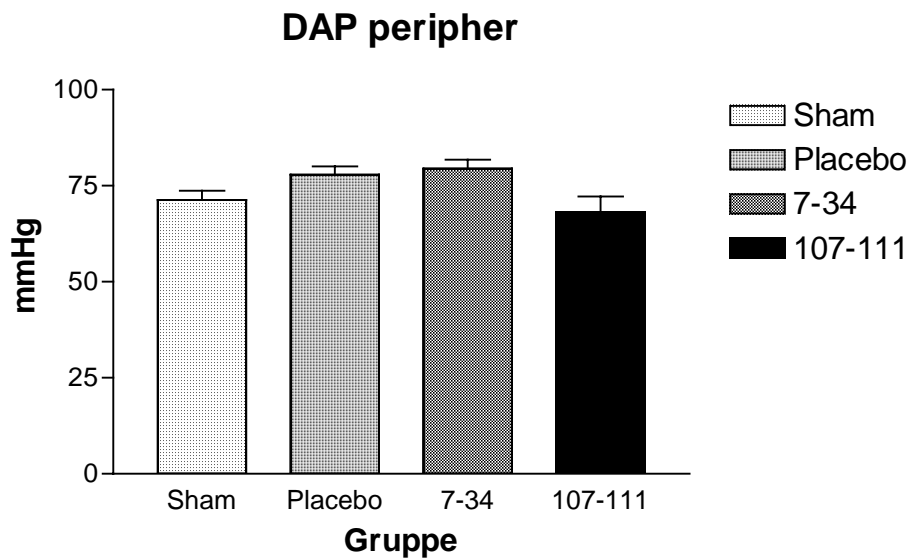


Abbildung 10:

Darstellung des peripheren diastolischen arteriellen Blutdrucks (DAP peripher) der untersuchten Gruppen in mmHg. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.4 Ergebnisse der intrakardialen hämodynamischen Untersuchung

3.4.1 Herzfrequenz während der intrakardialen hämodynamischen Blutdruckuntersuchung

Die Herzfrequenz zeigte während der intrakardialen Blutdruckaufzeichnung in allen untersuchten Gruppen annähernd gleiche Werte; im Mittel zwischen 463 bis 539 Schlägen/min. Lediglich die Herzfrequenzen der Gruppe PTHrP 107-111 lagen mit einem Mittelwert von 463 Schlägen/min etwas niedriger als in den Vergleichsgruppen (s. Abbildung 11). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

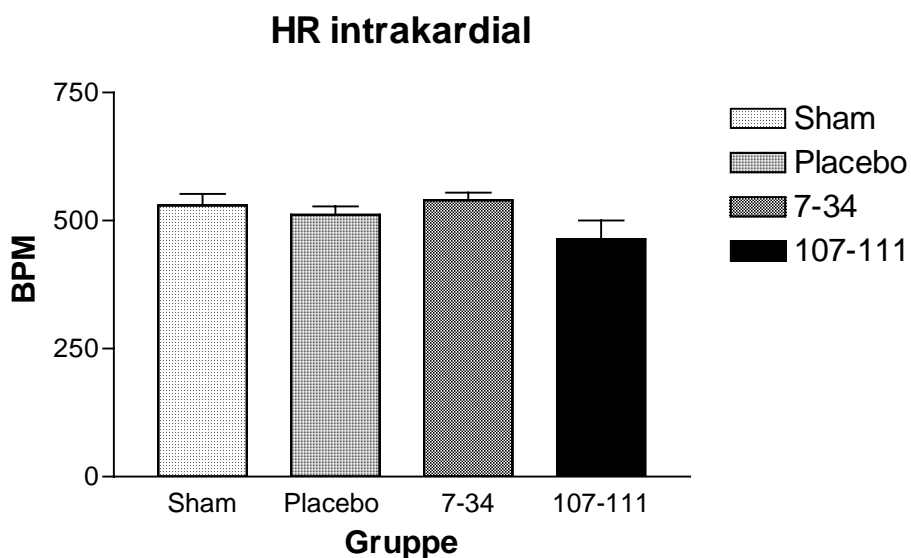


Abbildung 11:

Darstellung der Messwerte der intrakardialen Herzfrequenz (HR intrakardial) der untersuchten Gruppen in Schlägen pro Minute (BPM). Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.4.2 Untersuchung des intrakardialen systolischen Blutdrucks

Bei dem Vergleich des systolischen intrakardialen arteriellen Druckes zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen unterschiedliche Ergebnisse. Die höchsten systolischen Werte fanden sich hier in der Gruppe PTHrP 7-34. Die niedrigsten systolischen Blutdruckkurven in der Sham-Gruppe. Die systolischen Blutdrücke waren in der PTHrP 107-111-Gruppe signifikant geringer als in der PTHrP 7-34-Gruppe. Der SAP der Sham-Gruppe war sowohl gegenüber der Placebo-Gruppe als auch gegenüber der Gruppe PTHrP 7-34 signifikant erniedrigt, d.h. dass bereits die Implantation der osmotischen Minipumpe einen Einfluss auf den Blutdruck hatte. Deshalb ist die Placebogruppe als Kontrolle für die beiden behandelten Gruppen anzusehen. Die Gruppen PTHrP 7-34 und die Placebo-Gruppe zeigten keine signifikanten Abweichungen (s. Abbildung 12).

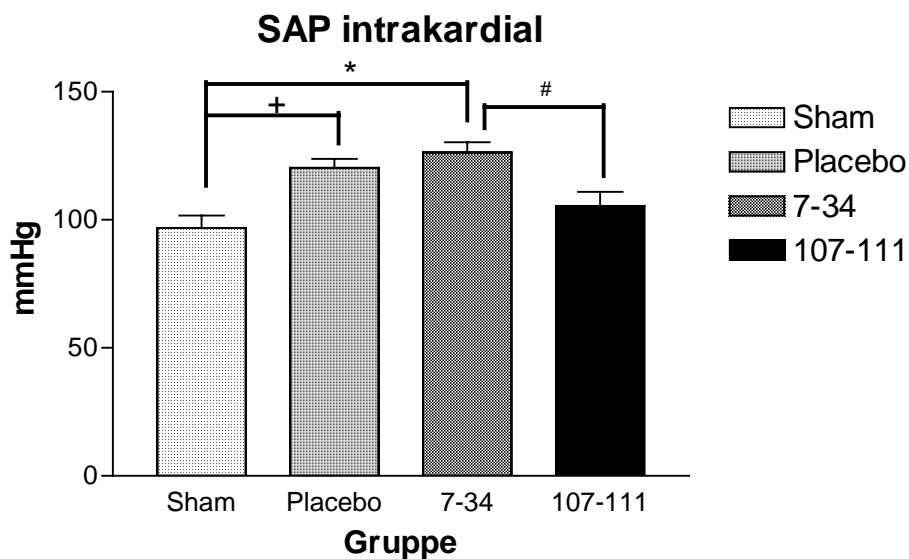


Abbildung 12:

Darstellung des intrakardialen systolischen arteriellen Blutdrucks (SAP intrakardial) der untersuchten Gruppen in mmHg. Die graphische Verknüpfung einzelner Balken des Diagramms mit den Kennzeichnungen #, * und + beschreibt die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde dem One-way ANOVA *Bonferroni* Multiple Comparison Test durchgeführt. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.4.3 Untersuchung des intrakardialen diastolischen Blutdrucks

Der Vergleich der intrakardialen diastolischen Blutdruckkurven zeigte in zwei Gruppen deutlich niedrigere Werte (PTHrP 107-111 und Sham-Gruppe).

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde zunächst mit einem *Bonferroni* Multiple Comparison Test durchgeführt. Hier war der intrakardiale DAP der Sham-Gruppe signifikant gegenüber den Gruppen PTHrP 7-34 und Placebo erniedrigt. Auch hier zeigt die Implantation der osmotischen Minipumpe den Einfluss auf die Blutdruckkurve. Aufgrund der optisch auffälligen Unterschiede zwischen der Gruppen PTHrP 107-111 und 7-34 sowie PTHrP 107-111 und der Placebo-Gruppe, die durch den konservativen *Bonferroni* Post Hoc Test nicht bestätigt werden konnten, führten wir auch hier noch eine Testung der Signifikanz mit dem *Newman-Keuls* Post Test durch. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen PTHrP 107-111 und 7-34 sowie der Placebo-Gruppe (s. Abbildung 13).

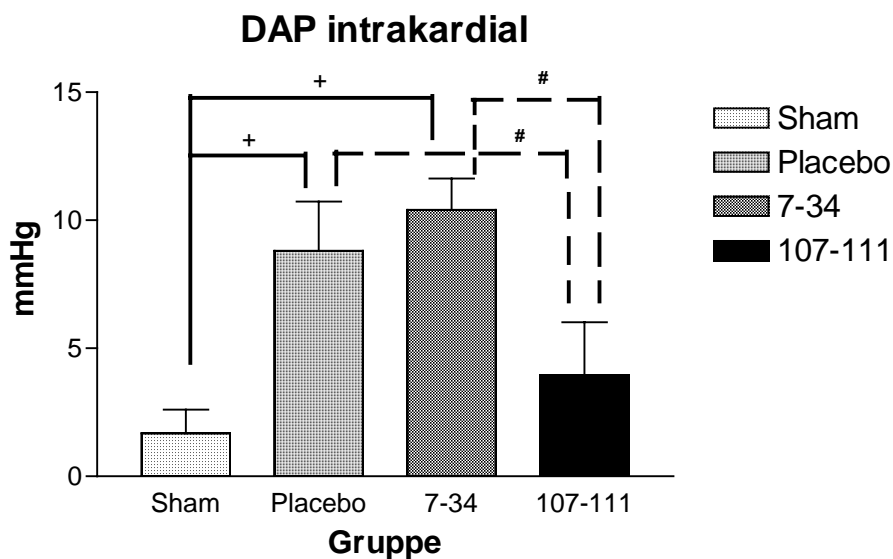


Abbildung 13:

Darstellung des intrakardialen diastolischen arteriellen Blutdrucks (DAP intrakardial) der untersuchten Gruppen in mmHg. Die graphische Verknüpfung einzelner Balken des Diagramms mit den Zeichen * und # gibt die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen an ($p < 0,05$). Die durchgängigen Linien und die Kennzeichnung + zeigen die mit dem *Bonferroni* Post Hoc Test ermittelten signifikanten Unterschiede, wohingegen die gestrichelten Linien und

die Kennzeichnung # die mit dem *Newman-Keuls* Post Test errechneten Signifikanzen darstellt. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.4.4 Untersuchung der maximalen intrakardialen Druckanstiegsgeschwindigkeit (Kontraktionsgeschwindigkeit; $+dP/dt_{max}$)

Bei dem Vergleich der maximalen intrakardialen Druckanstiegsgeschwindigkeiten (Kontraktionsgeschwindigkeit) bei den einzelnen Gruppen fielen annähernd gleiche Werte auf. Die Mittelwerte der verglichenen Gruppen lagen zwischen 7688 und 8191 mmHg/s und es ergaben sich im *Bonferroni* Multiple Comparison Test keine signifikanten Unterschiede. Die Vergleichsgruppen PTHrP (7-34) und die Placebo-Gruppe zeigen jedoch beim direkten statistischen Vergleich mittels eines *Newman-Keuls* Post Test einen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (s. Abbildung 14).

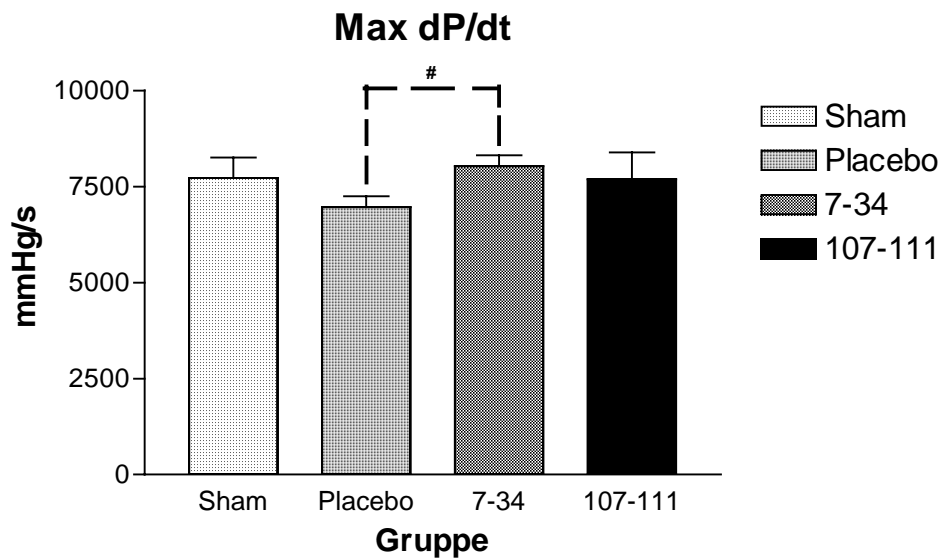


Abbildung 14:

Darstellung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (Kontraktionsgeschwindigkeit, Max dP/dt) der untersuchten Gruppen in mmHg/s. Die graphische Verknüpfung der Balken des Diagramms mit einer gestrichelten Linie und dem Zeichen # zeigt den signifikanten Unterschied

dieser beiden Gruppen ($p < 0,05$) im *Newman-Keuls* Post Test. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.4.5 Untersuchung der maximalen intrakardialen Druckabfallsgeschwindigkeit (Relaxationsgeschwindigkeit; $-dP/dt_{\min}$)

Bei der vergleichenden Betrachtung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit (Relaxationsgeschwindigkeit) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (s. Abbildung 15).

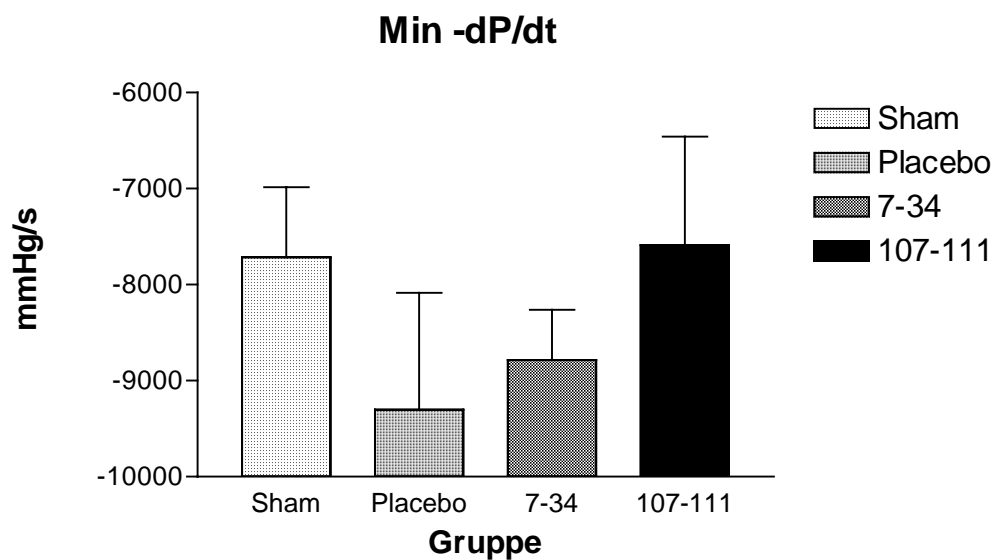


Abbildung 15:

Darstellung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit (Relaxationsgeschwindigkeit, Min dP/dt) der untersuchten Gruppen in mmHg/s. Die Versuchsergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede an. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5 Ergebnisse der elektrokardiologischen Untersuchung

3.5.1 Untersuchung der Dauer der p-Welle

Bei der Untersuchung der Dauer der p-Welle wurde zunächst ein One-way ANOVA *Bonferroni* Multiple Comparison Test durchgeführt, der zwischen den p-Wellen der einzelnen Gruppen keinen signifikanten Unterschied zeigen konnte. Das Ergebnis der Placebo-Gruppe erscheint graphisch auffällig und liegt mit einem p-Wert von 0.0774 nur unwesentlich über der Signifikanzgrenze von 0,05, so dass zusätzlich ein *Newman-Keuls* Post Test durchgeführt wurde. Hier wurde die Sham-Gruppe nicht beachtet, da hier keine kardiale Belastung durch die Implantation einer Minipumpe vorliegt. Der *Newman-Keuls* Post Test konnte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Placebo-Gruppe und den Gruppen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) nachweisen (s. Abbildung 16).

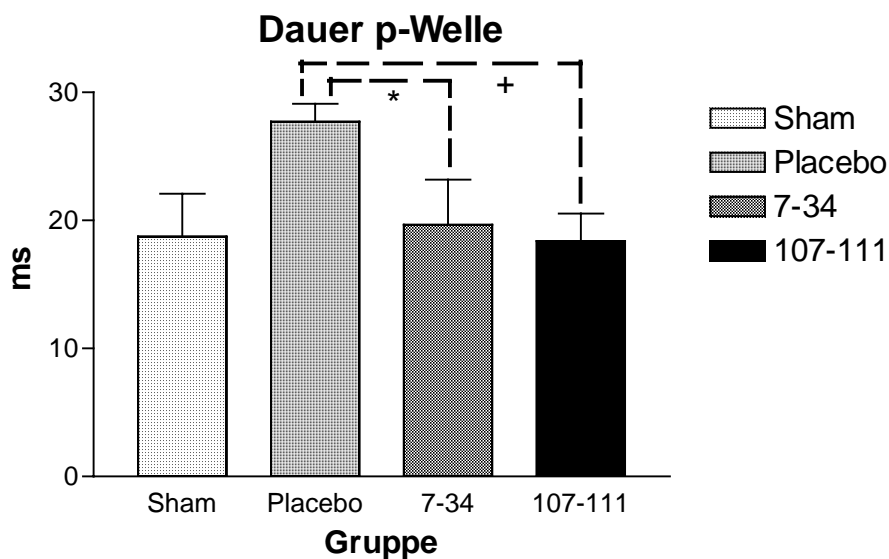


Abbildung 16:

Die Darstellung zeigt die statistische Auswertung der Dauer der p-Welle in ms. Die Ergebnisse weisen im *Bonferroni* Post Test keine Signifikanz auf ($p > 0.05$). Jedoch liegt die Signifikanz mit einem p-Wert von 0.0774 nur sehr knapp über der Signifikanzgrenze. Bei dem Vergleich der Gruppen Placebo, PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) mit einem *Newman-Keuls* Post Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Placebo-

Kontrollgruppe. Die signifikanten Zusammenhänge sind mit * und + gekennzeichnet. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5.2 Untersuchung der Amplitude der p-Welle

Die Auswertung der Amplituden der einzelnen p-Wellen ergab für alle Gruppen keine signifikanten Unterschiede (s. Abbildung 17).

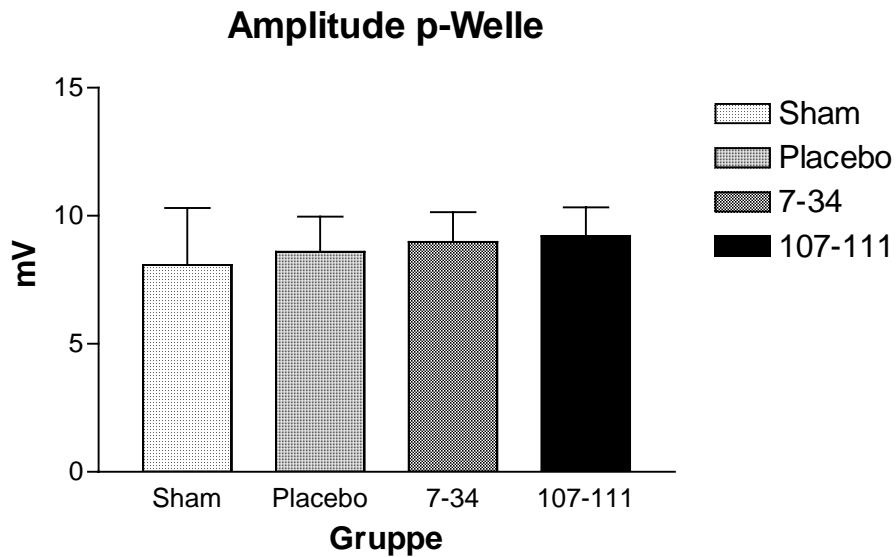


Abbildung 17:

Die Abbildung zeigt die Amplitude der p-Welle in mV. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5.3 Untersuchung der Dauer der PR-Strecke

Die Dauer der PR-Strecke ergab in allen Gruppen annähernd gleiche Werte. Die Werte lagen in allen Gruppen zwischen 35 und 39 ms (s. Abbildung 18).

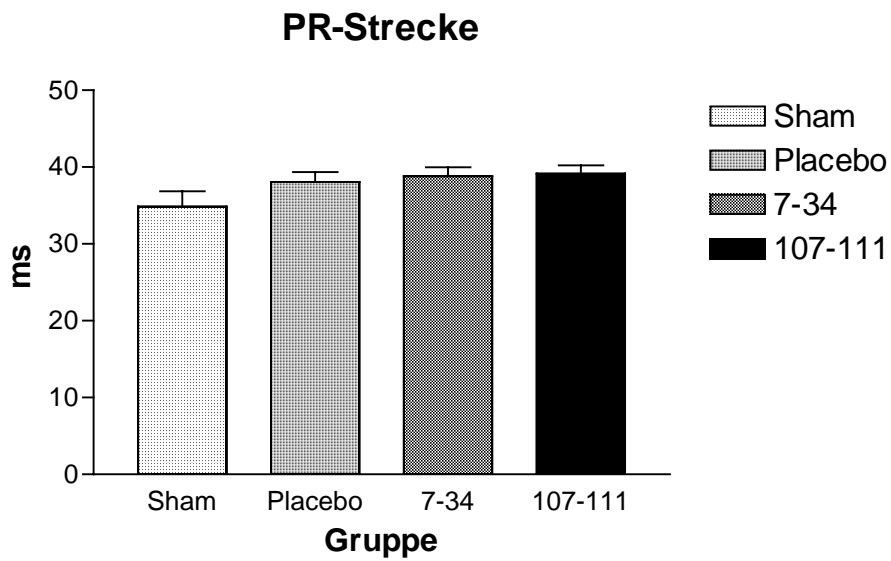


Abbildung 18:

Die Abbildung zeigt die Dauer der PR-Strecke in ms. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5.4 Untersuchung des Wertes der Q-Zacke

Die Auswertung der Ergebnisse der Werte der Q-Zacke ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abbildung 19).

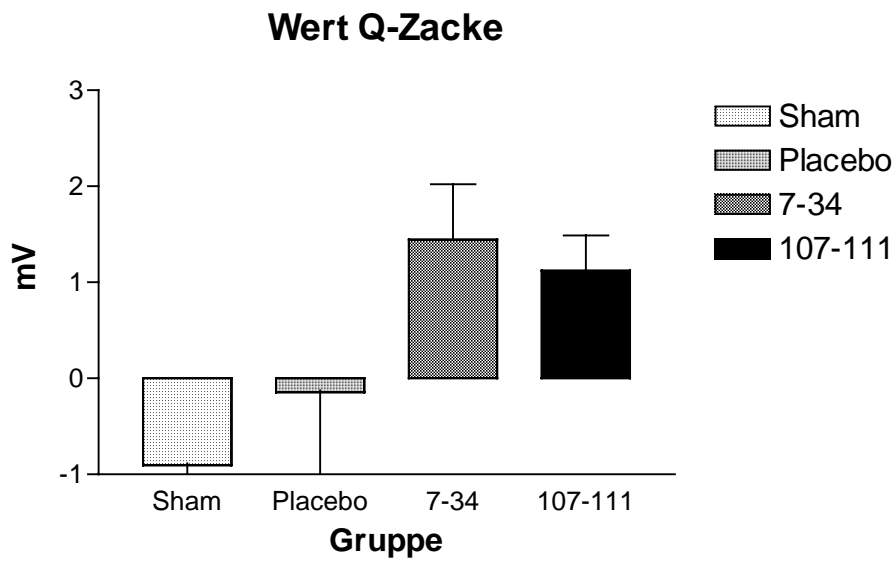


Abbildung 19:

Die Abbildung zeigt den Wert der Q-Zacke in mV. Die Werte der Q-Zacke können sowohl positive als auch negative Werte annehmen. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5.5 Untersuchung der Dauer des QRS-Komplexes

Die Dauer der QRS-Komplexe zeigte in allen Gruppen annähernd gleiche Werte (s. Abbildung 20).

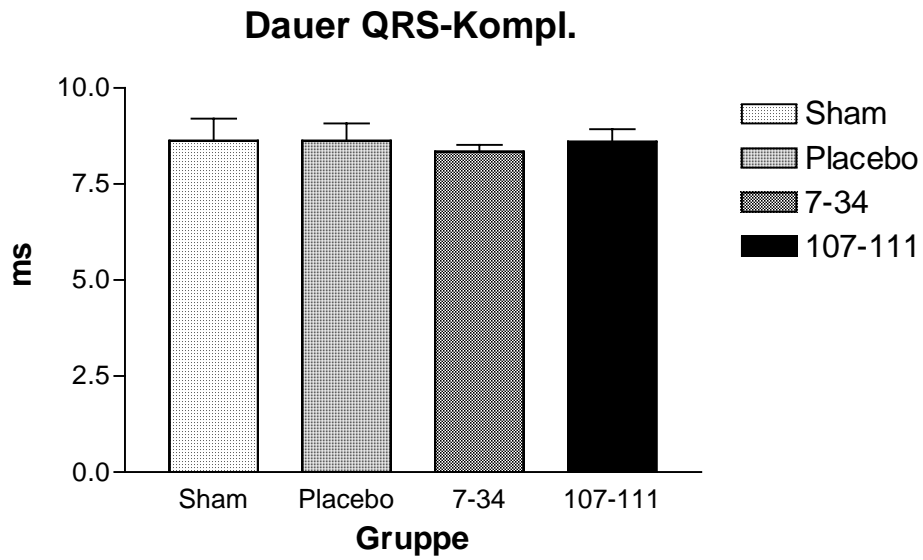


Abbildung 20:

Die Abbildung stellt die Dauer des QRS-Komplexes in ms dar. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5.6 Untersuchung der korrigierten QT-Zeit

Bei der Untersuchung der korrigierten QT-Zeit zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (s. Abbildung 21).

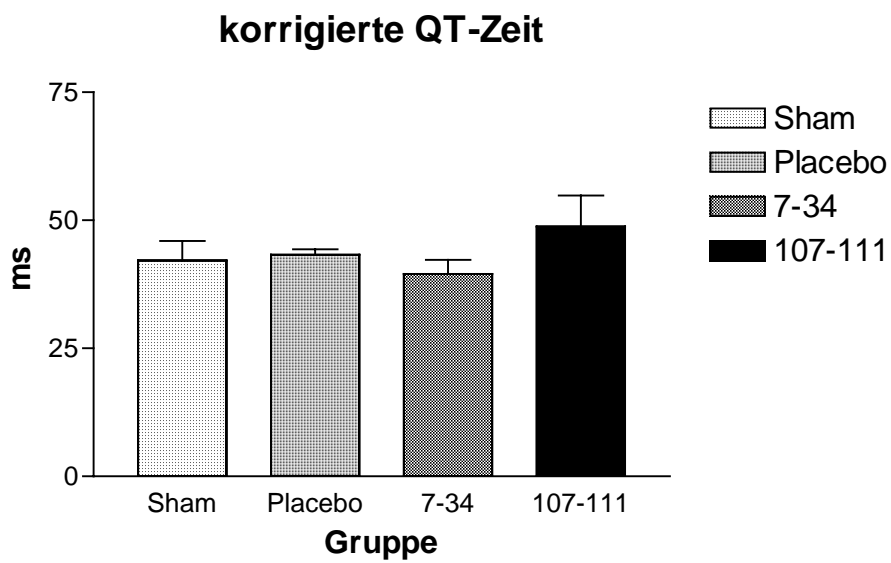


Abbildung 21:

Die Abbildung stellt die Dauer der korrigierten QT-Zeit in ms dar. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

3.5.7 Untersuchung der JT-Strecke

Beim Vergleich der Dauer der JT-Strecke ergab sich in der Gruppe PTHrP 107-111 scheinbar eine Verlängerung. Diese war jedoch gegenüber keiner der Gruppen signifikant (s. Abbildung 22).

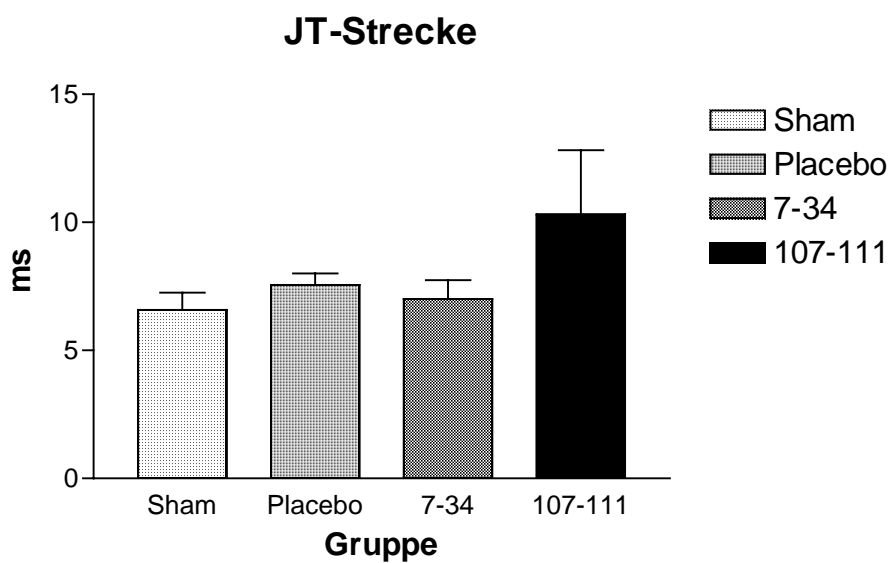


Abbildung 22:

Die Abbildung stellt die Dauer der JT-Strecke in ms dar. Zur Einteilung der Versuchsgruppen siehe Legende Tabelle 1.

IV. Diskussion

4.1 Die Ergebnisse

PTHrP ist ein calciotropes Peptidhormon, welches zuerst im Zusammenhang mit malignen Tumorhyperkalziämien beschrieben wurde. PTHrP besteht prinzipiell aus 3 verschiedenen Teilpeptiden.; einer N-terminalen Region, einer C-terminalen Region und einer Midregion (s. Kapitel 1.1 und Abbildung 1). Die N-terminal Region besitzt innerhalb der ersten 13 Aminosäuren eine strukturelle Ähnlichkeit zu in der Nebenschilddrüse gebildeten Parathormon. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit kann nur die N-terminale Region an den PTH1-Rezeptor binden. Außerdem besitzt PTHrP noch verschiedene Aminosäuresequenzen, welche als aktive Domänen bezeichnet werden und nicht an den PTH1-Rezeptor binden können. Die kardiale Wirkung speziell der aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) wurde bisher noch nicht unter *in vivo* Versuchsbedingungen beschrieben.

Der Versuchsaufbau bestand insgesamt aus 28 männlichen Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6.

Die Applikation der zu untersuchenden aktiven Domänen bzw. eines Placebos erfolgte im Alter von 6-8 Wochen, wobei den Tieren eine mit den Agenzien befüllte osmotische Minipumpe implantiert bzw. in der Sham-Gruppe lediglich eine Scheinoperation durchgeführt wurde. Eine Herzkathetermessung der Tiere und die Bestimmung der statischen Hypertrophieparameter erfolgte 2 Wochen nach der Operation.

Allein die Implantation der osmotischen Minipumpen stellte eine kardiale Mehrbelastung für den Organismus der Tiere ohne Beeinflussung der körperlichen Entwicklung dar, erwies sich aber insgesamt als suffiziente und reproduzierbare Methode zur Applikation von Testagenzien. Die kardiale Mehrbelastung konnte hämodynamisch und elektrophysiologisch belegt werden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die unter *in vitro* Versuchsbedingungen aufgrund einer Aktivierung der Proteinkinase C bei isolierten Kardiomyozyten hypertrophieinduzierend wirkende aktive Domäne PTHrP (107-111) diesen Effekt unter *in vivo* Versuchsbedingungen nicht auslöst. Hingegen zeigte sich für PTHrP (107-111) *in vivo* eine Verbesserung der kardialen Leistungsfähigkeit und eine elektrophysiologische Stabilisierung. Nicht nur die hämodynamischen, sondern auch die statischen Hypertrophieparameter waren für die aktive Domäne PTHrP (107-111) unauffällig.

Der PTH1-Rezeptor Antagonist PTHrP (7-34) besaß im Gegensatz zu PTHrP (107-111) unter *in vivo* Versuchsbedingungen keine positiv inotrope Wirkung. Durch eine Stabilisierung der p-Wellen Dauer führt PTHrP (7-34) jedoch auch zu einer Verringerung der Gefahr von Extrasystolen im Rahmen vermehrter hämodynamischer Belastungen.

4.2 Methodische Diskussion

Die 14-tägige kontinuierliche Applikation von Agenzien über osmotische Minipumpen ist eine wissenschaftlich anerkannte und etablierte Methode. Um die systemischen und kardialen Wirkungen verschiedener PTHrP-Domänen zu untersuchen, erscheint diese Methode geeignet und adäquat.

In unserer Studie sollten die Wirkung und die funktionellen Konsequenzen einer erhöhten PTHrP-Konzentration – speziell der synthetisch hergestellten aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) - auf die kardiale Funktion von gesunden Mäusen nach regelmäßiger Applikation (insgesamt 14 Tage) über osmotische Minipumpen untersucht werden. Eine artifiziell induzierte Druckbelastung des Herzens durch Konstriktion der Aorta (TAC) erfolgte nicht.

Wir stellten fest, dass alleine die Implantation der osmotischen Minipumpe eine Auswirkung auf den Organismus der Versuchstiere zu haben scheint. Die Mäuse waren nach der Implantation in ihrer zu beobachtenden körperlichen Aktivität und ihrem Bewegungsradius nicht eingeschränkt. Jedoch verstarben innerhalb von 14 Tagen nach Implantation der Minipumpen insgesamt zwei von dreißig Versuchstieren. Das ergibt eine Mortalitätsrate von 7,1 %. Alle verstorbenen Versuchstiere stammten aus der Gruppe PTHrP (7-34) und verstarben innerhalb von 8 Tagen post OP. Innerhalb der Sham-Gruppe verstarb kein einziges Tier. Es konnte jedoch nicht eindeutig ermittelt werden, ob der Grund für den letalen postoperativen Verlauf die OP- bzw. Narkosebelastung der Tiere oder die unphysiologische postoperative Belastung des Organismus durch die Implantation der Minipumpen bzw. des Agens PTHrP (7-34) ist. Dennoch scheint das Verfahren der Minipumpenimplantation insgesamt ein operativ relativ einfach durchzuführendes, risikoarmes und suffizientes Verfahren zur kontinuierlichen Applikation von Wirkstoffen über einen definierten Zeitraum zu sein.

Das vor der Primäroperation und zum Zeitpunkt der Herzkathetermessung festgestellte Körpergewicht der Tiere zeigte eine Zunahme des Körpergewichts in allen Gruppen zum

Zeitpunkt der Herzkathetermessung. Dies unterstützt die von Bittig (2005) gemachten Beobachtungen, die eine Zunahme des Körpergewichtes von scheinoperierten Versuchstieren zeigte (Bittig, 2005).

Tiemann et al. (2003) berichten, dass der Quotient aus Herzgewicht zu Tibialänge (*Heartweight-Tibiallength-Ratio*, HW/TL) zuverlässigere Referenzergebnisse zur Beurteilung einer Herzhypertrophie liefert als der Quotient Herzgewicht zu Körpergewicht (*Heartweight-Bodyweight-Ratio*, HW/BW), da sich das Körpergewicht der Mäuse geschlechtsspezifisch und durch den klinischen Status der Tiere beeinflusst, unterschiedlich entwickelt. Das Tibialängenwachstum hingegen entwickelt sich bei beiden Geschlechtern gleich und nimmt ab dem 70. Postnataltag (P70) kaum noch zu (Tiemann et al., 2003).

Für unsere Untersuchung ergeben beide Quotienten homologe Ergebnisse (HW/BW-Ratio, HW/TL-Ratio). Die Implantation einer Minipumpe scheint keinen Einfluss auf die körperliche Entwicklung der Tiere zu haben. Somit können beide Quotienten zur Beurteilung einer Herzhypertrophie herangezogen werden. Eine Abnahme oder auch eine Zunahme des Körpergewichtes (BW) ist aber in jedem Fall als Hinweis auf den klinischen Allgemeinzustand der operierten Tiere zu werten.

4.2.1 Sham vs. Placebo

Ein wichtiger Aspekt betrifft den Vergleich der Ergebnisse zwischen den Kontrollgruppen. Hier fällt ein signifikant erhöhter intrakardialer SAP der Placebo-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe auf. Hieraus kann eine wesentliche mechanische Mehrbelastung der Versuchstiere der Placebo-Gruppe allein durch die Implantation der osmotischen Minipumpen abgeleitet werden. Auch das Herzgewicht, der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht sowie der Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge zum Zeitpunkt der Herzkathetermessung zeigten einen tendenziell höheren Wert innerhalb der Placebo-Gruppe und bestätigten eine mechanische kardiale Mehrbelastung dieser Gruppe. Die Implantation einer osmotischen Minipumpe scheint einen erheblichen Einfluss auf den mittleren intrakardialen Blutdruck zu haben. Bei den Tieren der Sham-Gruppe wurden keine Minipumpen implantiert, sondern es erfolgte lediglich eine Scheinoperation mit der Durchführung des OP-Schnittes und Nahtadaptation der Wundränder. Dies erklärt den niedrigeren intrakardialen SAP der Tiere zum Zeitpunkt der Herzkathetermessung. Die Tiere der Sham-Gruppe waren keiner Druckbelastung des Thorax

durch die Implantation einer Minipumpe, keiner vermehrten Volumenbelastung durch die Abgabe des Agens NaCl und auch keiner Belastung durch eine bioaktive PTHrP-Domäne ausgesetzt.

Unterstrichen werden diese Feststellungen durch die Ergebnisse der intrakardialen diastolischen Blutdruckmessung (DAP). Es ist zu vermuten, dass der Beginn eines einsetzenden Herzfehlers durch einen erhöhten linksventrikulären diastolischen Blutdruck gekennzeichnet ist. Auch hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied innerhalb der Kontrollgruppe. Der intrakardiale DAP der Placebo-Gruppe ist gegenüber der Sham-Gruppe signifikant erhöht. Da ein Hauptaugenmerk unserer Studie in der Beurteilung einer manifesten Herzinsuffizienz bzw. beginnenden kardialen Dysfunktion liegt, sollte der durch die Minipumpenimplantation bedingte größere intrakardiale DAP als Referenzwert Verwendung finden. In diesem Zusammenhang ist allerdings auch festzustellen, dass die hämodynamisch messbare kardiale Mehrbelastung durch die Minipumpenimplantation nicht zu einer verifizierbaren Herzhypertrophie führt. Die hierfür entscheidenden Parameter Herzgewicht, HW/BW-Ratio und HW/TL-Ratio zeigen keinen signifikanten Unterschied. Auch die körperliche Entwicklung der Versuchstiere wird durch eine Pumpenimplantation nicht negativ beeinflusst. Insgesamt löst aber allein die Implantation der osmotischen Minipumpen ohne die Anwendung eines physiologisch wirksamen Agens hämodynamisch messbare kardiale Veränderungen aus. Aufgrund dieser Fakten sollte die Placebo-Gruppe als Kontrollgruppe eingesetzt werden.

4.3 Diskussion der EKG-Ergebnisse

Bei der Entwicklung bzw. Kompensation eines Herzfehlers ist auch eine Veränderung des EKG der Versuchstiere zu beurteilen. Hier fällt als einzige Veränderung eine signifikante Verlängerung der p-Welle in der Placebo-Gruppe auf. Die Verlängerung der p-Welle gilt als elektrophysiologisches Zeichen für eine hämodynamische Belastung mit der Gefahr von irregulären Herzschlägen. In unserem Fall stellt die Implantation einer osmotischen Minipumpe die hämodynamische Belastung des Organismus dar. Diese hämodynamische Belastung durch die Minipumpenimplantation besteht auch bei den Agenzien PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111). Die Verlängerung der p-Welle wird allerdings durch die aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) normalisiert.

Die weiteren untersuchten EKG-Parameter (die ventrikuläre Überleitung, die Erregung des Ventrikels und die Erregungsrückbildung) zeigen keine signifikanten Unterschiede. Auch pathologische EKG-Veränderungen können nicht beobachtet werden.

Die aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) haben *in vivo* einen protektiven elektrophysiologischen Effekt im Rahmen einer hämodynamischen Stresssituation durch eine Stabilisierung der Dauer der Vorhoferregung.

4.4 Diskussion der hämodynamischen Ergebnisse

In der Literatur wird PTHrP auch eine positive chronotrope Wirkung zugeordnet (Hara et al., 1997; Nickols et al., 1989; Ogino et al., 1995). Unsere Ergebnisse können diesen Effekt für die Aminosäuresequenzen 7-34 und 107-111 bei gesunden Individuen nicht bestätigen. Zwischen den einzelnen Gruppen ergeben sich sowohl bei der peripheren, als auch bei der zentralen Herzfrequenzmessung keine signifikanten Unterschiede. Diese Feststellung unterstreicht die vornehmliche Wirkung dieser beiden aktiven Domänen auf das Hypertrophie- bzw. Kontraktilitätsverhalten der Kardiomyozyten. Eine Beeinflussung der Herzfunktion durch einen chronotropen Adaptationsvorgang erfolgt *in vivo* nicht.

Die beiden unterschiedlichen aktiven Domänen scheinen ebenfalls keinen Einfluss auf den peripher gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruck zu haben. Die Ergebnisse zeigen bei diesen Parametern vergleichbare Ergebnisse für alle Gruppen. In der Literatur wird eine vasodilatatorische Wirkung von PTHrP durch die Aktivierung des PTH1-Rezeptors beschrieben (Clemens et al., 2001; Nickols et al., 1989; Qian et al., 1999). Die Ergebnisse der peripheren Blutdruckmessung bestätigen, dass eine vasodilatatorische Wirkung des Polyhormons PTHrP nur durch die Aktivierung des PTH1-Rezeptors erfolgen kann. Die aktiven Domänen 7-34 und 107-111 sind nicht in der Lage den PTH1-Rezeptor zu aktivieren und können somit auch keinen Einfluss auf die Blutdruckregulation nehmen.

Von der aktiven Domäne PTHrP (107-111) wurde auch *in vivo* eine kardiale Hypertrophieinduktion mit den hämodynamischen Zeichen einer Herzinsuffizienz erwartet. Von dem PTH1-Rezeptor Antagonisten PTHrP (7-34) wurde hingegen eine Verbesserung der kardialen Leistungsfähigkeit ohne eine Beeinflussung der Wachstumsantwort der Kardiomyozyten angenommen. Die erwarteten funktionellen Einflüsse und Veränderungen der

aktiven Domänen traten *in vivo* an gesunden Herzen so nicht ein. Die hämodynamischen Messungen deuten zwar auf der einen Seite durch die signifikante Erhöhung des intrakardialen systolischen Blutdrucks (SAP) durch den PTH1-Rezeptor Antagonisten gegenüber den Gruppen PTHrP (107-111) und Sham tendenziell auf eine Verbesserung des Kontraktilitätsverhaltens der Kardiomyozyten durch die systemische Applikation des PTH1-Rezeptor Antagonisten PTHrP (7-34) hin. Auf der anderen Seite steigt aber auch der intrakardiale diastolische Blutdruck (DAP) - als hämodynamische Messgröße einer beginnenden Herzinsuffizienz - durch den Antagonisten im Mittel signifikant an. So ist der intrakardiale DAP für PTHrP (7-34) gegenüber den Gruppen PTHrP (107-111) und Sham – jedoch nicht gegenüber der Kontrollgruppe Placebo – signifikant erhöht. In der Gruppe PTHrP (7-34) scheint genauso wie in der Placebo-Gruppe durch die Implantation der osmotischen Minipumpe eine kardiale Belastung mit den funktionellen Zeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz vorzuliegen. PTHrP (7-34) scheint jedoch durch eine signifikante Verbesserung der maximalen intrakardialen Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{max}$) gegenüber der ebenfalls durch die Minipumpe belasteten Placebo-Gruppe in der Lage zu sein, die Kontraktilität der Kardiomyozyten zu verbessern. Zwischen den Gruppen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) liegt für diesen Parameter kein signifikanter Unterschied vor. Somit scheinen beide aktiven Domänen die Kontraktilität der Kardiomyozyten *in vivo* in gleichem Maß zu beeinflussen.

Erstaunlicherweise führt die Applikation von PTHrP (107-111) zu keinem hypertrophen Effekt, sondern verbessert die kardiale Leistungsfähigkeit durch ein signifikantes Sinken des intrakardialen DAP gegenüber den Gruppen PTHrP (7-34) und der Placebo-Gruppe. Der intrakardialen DAP der Gruppen PTHrP (107-111) und Sham ist mit Werten von 3,95 mmHg (PTHrP (107-111)) und 1,69 mmHg (Sham-Gruppe) sogar annähernd gleich.

Unterstützt wird diese Tatsache durch einen weiteren Hypertrophiemarker, nämlich dem Herzgewicht. Hier erreicht der Antagonist PTHrP (7-34) im Mittel die größten Werte. PTHrP (107-111) bewirkt hingegen im Mittel das niedrigste Herzgewicht. Dieses Ergebnis wird durch die Quotienten HW/TL und HW/BW unterstützt. Sollte PTHrP (107-111) auch bei gesunden Individuen *in vivo* eine kardiale Hypertrophie induzieren, so wäre mit einer Zunahme des Herzgewichtes durch die vermehrte Proteinsynthese zu rechnen (Schluter et al., 1997).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sagen, dass die Applikation von PTHrP (107-111) bei gesunden Herzen keinen hypertrophen Effekt auslöst. Im Gegenteil, PTHrP (107-111) scheint

sogar die kardiale Funktion bei einer bestehenden hämodynamischen Belastung durch eine Minipumpenimplantation deutlich zu verbessern.

4.5 PTHrP-Wirkung unter Druckbelastung

Eine alleinige systemische Applikation der aktiven Domäne PTHrP (107-111) scheint unter physiologischen Bedingungen *in vivo* innerhalb von 14 Tagen keine hämodynamisch nachweisbare kardiale Dysfunktion auslösen zu können.

Die vorliegende Untersuchung ist Teil einer größeren Studie, in der *in vivo* die kardiovaskuläre Wirkung von PTHrP-Teilpeptiden mit und ohne TAC-Operation verfolgt wurde. Diese größere Studie wurde in Zusammenarbeit mit dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgenommen. Die hier unter normotonen Bedingungen untersuchte aktive Domäne PTHrP (7-34) wurde auch nach einer TAC-Operation - also unter Druckbelastung - in ihrer Wirkung beschrieben (Meyer et al., 2007). Diese kardiale Druckmehrbelastung führt zu einer vermehrten PTHrP-Expression *in vivo*. Die durch die TAC-Operation induzierte Herzhypertrophie wurde nicht durch die Anwesenheit des Antagonisten PTHrP (7-34) beeinflusst. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Hypertrophiemarker ANP, TGF- β_1 und ODC (*Ornithin Decarboxylase*) ebenfalls in beiden Gruppen gleichstark exprimiert wurden. Auch die PTHrP-Expression wurde durch die TAC-Operation sowohl in Ab- wie in Anwesenheit des Antagonisten erhöht. Allerdings wurde durch die Gabe von PTHrP (7-34) die Expression der *SR-Ca²⁺-ATPase 2A* (SERCA) signifikant erhöht, und zwar in beiden Gruppen; also unabhängig von der Druckbelastung. Die Expression der SERCA ist ein molekularer Marker für die Aktivität des sarkoplasmatischen Retikulums und damit der Kontraktilität (Meyer et al., 2007).

Bezüglich der gemessenen kardiovaskulären *in vivo*-Parameter ergab sich durch die TAC-Operation eine deutliche, aber nicht signifikante Erhöhung des intrakardialen SAP unabhängig von der Anwesenheit des Antagonisten PTHrP (7-34). Auch der intrakardiale DAP stieg durch die TAC-Operation, jedoch im Gegensatz zum intrakardialen SAP war dieser Anstieg signifikant (von ca. 8,5 auf ca. 18,5 mmHg). Die Anwesenheit von PTHrP (7-34) hatte darauf keinen Einfluss. Interessanterweise führte die Anwesenheit des Antagonisten zu einer Verbesserung der Kontraktilität (dp/dt_{max}), sowohl ohne als auch mit TAC-Belastung. Dieser positive Einfluss des Antagonisten zeigte sich auch in der Relaxationsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) bei den TAC-operierten Tieren. PTHrP (7-34) verbessert also bei einer bestehenden Druckbelastung die

kardiale Leistungsfähigkeit signifikant (Meyer et al., 2007). Dieses hämodynamische Ergebnis wird auf zellulärer Ebene durch eine erhöhte Expression von SERCA durch PTHrP (7-34) unterstützt. Eine erhöhte Expression von SERCA kann die Kontraktilität von Kardiomyozyten verbessern (del Monte et al., 1999). *In vivo* verbesserte der PTH1-Rezeptor Antagonist PTHrP (7-34) die ventrikuläre Funktion druckbelasteter Herzen durch eine Blockade der negativen Wirkung des PTH1-Rezeptors, der durch die beschriebene verstärkte Expression der N-terminalen Region PTHrP (1-34) aktiviert wurde (Meyer et al., 2007).

Zu der zweiten in der vorliegenden Studie untersuchten aktiven Domäne PTHrP (107-111) liegen derartig umfangreiche *in vivo* Daten noch nicht vor. Allerdings führt die *in vitro* Applikation von PTHrP (107-111) an isolierten Kardiomyozyten zu einer Hypertrophie (Schluter et al., 1997; Whitfield, et al., 1996). Diese hypertrophe Wirkung erfolgt durch eine Aktivierung der Proteinkinase C, ohne die Kontraktilität der Kardiomyozyten zu beeinflussen (Schluter et al., 1997). PTHrP (107-111) führte in unserer Untersuchung *in vivo* nicht zu einer signifikanten kardialen Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz.

PTHrP scheint also *in vivo* allein keine Hypertrophie des Herzens auslösen zu können, sondern wirkt wahrscheinlich *in vivo* nur als Cofaktor bei einer kardialen Druckmehrbelastung. Inwieweit auch noch weitere Aminosäuresequenzen bzw. aktive Domänen der C-terminalen Region oder der Midregion zu der kardialen Hypertrophie in solchen Umständen beitragen, ist noch unklar.

4.6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie hat erstmals die Wirkung der beiden aktiven Domänen PTHrP (7-34) und (107-111) *in vivo* unter physiologischen Bedingungen an Mäusen beschrieben. Es zeigte sich, dass ein erhöhter Plasmaspiegel der aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) unter physiologischen Bedingungen keine kardiale Dysfunktion auslöst. Die *in vitro* Ergebnisse der Beeinflussung des Hypertrophieverhaltens isolierter Kardiomyozyten durch PTHrP (107-111) können *in vivo* unter physiologischen Bedingungen nicht bestätigt werden, denn *in vivo* führte PTHrP (107-111) nicht zur Induktion einer kardialen Hypertrophie (Schluter et al., 1997). Als weitere Erkenntnis ergibt sich, dass der PTH1-Rezeptor Antagonist seine positive inotrope Wirkung nur bei einer Erhöhung des Plasmaspiegels der kardial negativ wirkenden N-terminalen Region PTHrP (1-36) entfalten kann. Unter physiologischen Bedingungen führt der PTH1-Antagonist PTHrP (7-34) zu keinem kardialen Benefit. Ein eigener funktioneller Mechanismus

zur Verbesserung des Kontraktionsverhaltens der Kardiomyozyten und somit prophylaktische Effekte können somit ausgeschlossen werden.

Durch eine operative Konstriktion der Aorta thoracalis (TAC), mit einer vermehrten Druckbelastung des Herzens, kann die Expression von PTHrP (1-36) künstlich erhöht werden. Die erhöhte PTHrP-Konzentration führt durch die Aktivierung des PTH1-Rezeptors via der N-terminalen Region zu einer kardialen Dysfunktion, ohne das hypertrophe Wachstum der Kardiomyozyten zu beeinflussen (Meyer et al., 2007). Diese funktionell negative kardiale Wirkung von PTHrP wird durch die Erkenntnis untermauert, dass die synthetisch hergestellte Aminosäuresequenz PTHrP (1-34) in einer *in vitro* Untersuchung auch zu einer Verringerung der Kontraktionsamplitude der Kardiomyozyten führt, die durch den PTH1-Rezeptor Antagonisten PTHrP (7-34) blockiert und aufgehoben werden kann (Meyer et al., 2007). Der PTH1-Rezeptor Antagonist verbessert in diesem Fall entscheidend die Kontraktilität der Kardiomyozyten und damit die kardiale Leistungsfähigkeit. Hieraus ergibt sich ein möglicher therapeutischer Ansatz in der medikamentösen Behandlung der Herzinsuffizienz, da bei Patienten mit bekannten Herzfehlern regelmäßig erhöhte PTHrP-Plasmaspiegel beobachtet werden. Darüberhinaus scheint die PTHrP-Expression den Normalwert nicht wieder zu erreichen, da bei Patienten mit chronischen Herzfehlern regelmäßig erhöhte PTHrP-Plasmaspiegel nachgewiesen werden, die sogar in ihrer Höhe mit der Ausprägung der kardialen Dysfunktion korrelieren (Ogino et al., 2002).

Die *in vitro* Ergebnisse der aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) an isolierten Kardiomyozyten konnten *in vivo* nicht bestätigt werden. PTHrP (107-111) scheint unter *in vivo* Versuchsbedingungen weder zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten noch zu einer Verschlechterung der Herzfunktion zu führen. Im Gegenteil, PTHrP (107-111) scheint unerwartet zu einer Verbesserung der kardialen Leistungsfähigkeit bei gesunden Mäusen zu führen und eine protektive kardiale Wirkung zu haben. Für den PTH1-Rezeptor Antagonist PTHrP (7-34) ist eine Verbesserung der Kardiomyozytenkontraktilität beschrieben worden. Hierfür ist ein erhöhter Plasmaspiegel von PTHrP erforderlich. Dieser liegt z. B. nach einer TAC-Operation vor. Dann kann PTHrP (7-34) die negative Wirkung von PTHrP am PTH1-Rezeptor blockieren und somit die Kontraktilität verbessern. Die alleinige Applikation von PTHrP unter physiologischen Bedingungen führt *in vivo* zu keiner Verbesserung der Herzfunktion. Anders als PTHrP (107-111) besitzt PTHrP (7-34) bei gesunden Herzen kein kardial protektives Potential.

PTHrP (107-111) besitzt unter physiologischen Umständen keine pro-hypertrophen Eigenschaften, sondern scheint – anders als durch die Ergebnisse vorangegangener *in vitro* Studien zu erwarten – sogar die kardiale Leistungsfähigkeit in hämodynamischen Streßsituationen günstig zu beeinflussen. Die bisherigen Beobachtungen deuten für PTHrP (107-111) auf ein funktionelles und elektrophysiologisches kardiales Benefit unter *in vivo* Versuchsbedingungen hin. Unsere Untersuchung konnte eine Verbesserung der Herzleistung durch PTHrP (107-111) und eine elektrophysiologische Stabilisierung im Rahmen einer hämodynamischen Belastung feststellen. Der PTH1-Rezeptor Antagonist PTHrP (7-34) führt im Vergleich zu PTHrP (107-111) nicht zu einer positiv inotropen Wirkung bei gesunden Herzen, verringert aber die Gefahr von Extrasystolen durch eine Stabilisierung die Dauer der p-Welle in hämodynamischen Steßsituationen.

Aufgrund seiner Komplexität sollte das Polyhormon PTHrP und seine bioaktiven Aminosäuresequenzen in den nächsten Jahren Ziel weiterer Forschungen und Untersuchungen sein, um sein vielfältiges Wirkungsspektrum besser zu verstehen und die nachweisbaren positiven und negativen kardialen und hämodynamischen Wirkungen therapeutisch nutzbar bzw. vermeidbar zu machen.

V. Zusammenfassung

Parathyroid Hormone-related Peptide (PTHrP) ist ein Peptidhormon, welches zuerst im Rahmen maligner Tumorhyperkalziämien beschrieben wurde. PTHrP besteht aus 3 Teilpeptiden. Einer N-terminalen und einer C-terminalen Region sowie einer Midregion. Die N-terminale Region ist aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit innerhalb der ersten 13 Aminosäuren in der Lage, ebenso wie Parathormon, an den bisher einzig bekannten Rezeptor (PTH1-Rezeptor) zu binden und diesen zu aktivieren. Zusätzlich besitzt PTHrP noch verschiedene Aminosäuresequenzen, die als aktive Domänen bezeichnet werden, verschiedene Wirkungen haben, jedoch nicht an den PTH1-Rezeptor binden können. Die kardialen Wirkungen der aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) wurden bisher nur unter *in vitro* Versuchsbedingungen untersucht. So ist für die aktive Domäne PTHrP (107-111) – welche wegen ihrer Inhibition der Osteoklasten-abhängigen Knochenresorption auch als Osteostatin bezeichnet wird - eine Hypertrophie-induktion bei isolierten Kardiomyozyten durch die Aktivierung der Proteinkinase C beschrieben. Die aktive Domäne PTHrP(7-34) ist ein potenter und selektiver PTH1-Rezeptor Antagonist und blockiert die negativen kardialen Wirkungen von Parathormon und des Teilpeptides PTHrP (1-34). PTHrP (7-34) aktiviert zusätzlich die Proteinkinase A und führt dadurch zu einer Verbesserung der Kontraktilität der Kardiomyozyten. Welchen Effekt diese beiden aktiven Domänen bei gesunden Herzen *in vivo* auslösen, ist bis jetzt nicht untersucht worden und ist die Fragestellung der vorliegenden Studie.

Für unsere *in vivo* Untersuchung wurden insgesamt 28 männliche Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet. Der Versuchsaufbau bestand aus insgesamt 4 Gruppen (PTHrP (7-34), PTHrP (107-111), Placebo und Sham). Den Tieren wurde im Alter von 6 - 8 Wochen je eine osmotische Minipumpe implantiert. Die osmotischen Minipumpen waren entweder mit den synthetisch hergestellten aktiven Domänen PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) oder in der Placebo-Gruppe mit NaCl befüllt. Bei der Sham-Gruppe erfolgte lediglich eine Scheinoperation ohne die Implantation einer Minipumpe. Über die osmotischen Minipumpe konnte eine kontinuierliche Abgabe der Agenzien über einen Zeitraum von 14 Tagen gewährleistet werden. Nach dieser Zeit wurden die hämodynamischen Parameter mittels eines Herzkatheters gemessen und die Hypertrophieparameter (Herz-, Lungen- und Körpergewicht) bestimmt. Weiterhin erfolgten die Messung der Tibialänge und die Berechnung des Quotienten aus Herzgewicht zu Tibialänge und des Quotienten aus Körpergewicht zu Tibialänge.

Die Untersuchung zeigt folgende Ergebnisse: Die Implantation der osmotischen Minipumpen hatte keinen Einfluss auf die körperliche Entwicklung der Versuchstiere und stellt ein sicheres und operativ relativ leicht durchzuführendes Verfahren zur kontinuierlichen Abgabe von Agenzien dar. Jedoch bedeutet die Implantation der osmotischen Minipumpen eine hämodynamische Belastung für den Organismus der Tiere. Dies wurde durch eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) des intrakardialen diastolischen Blutdruckes (DAP) der Placebo-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe bestätigt. Der intrakardiale DAP ist ein hämodynamisches Zeichen eines erhöhten Afterloads und einer beginnenden Herzinsuffizienz. Auch der intrakardiale DAP der Gruppe PTHrP (7-34) ist gegenüber der Sham-Gruppe signifikant erhöht. Der intrakardiale DAP der Gruppe PTHrP (107-111) zeigt hingegen gegenüber der Sham-Gruppe keine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$), sondern ist im Vergleich zu der Placebo-Gruppe und dem PTH1-Rezeptor Antagonisten sogar signifikant erniedrigt. Das bedeutet, dass für PTHrP (107-111) und die Sham-Gruppe eine annähernd gleiche hämodynamische Belastung besteht, obwohl in der Gruppe PTHrP (107-111) eine kardiale Mehrbelastung durch die Minipumpenimplantation vorliegt. Weiterhin kann die hämodynamische Belastung des Organismus durch die Implantation einer osmotischen Minipumpe elektrophysiologisch belegt werden. In der Placebo-Gruppe kann eine signifikante Verlängerung der Dauer der p-Welle ($p < 0,05$) im Vergleich zu den untersuchten aktiven Domänen beobachtet werden. In beiden PTHrP-Gruppen war diese p-Wellen Verlängerung nicht nachzuweisen. PTHrP (7-34) und PTHrP (107-111) verhindern die Gefahr von Extrasystolen, die durch die Verlängerung der p-Welle gegeben ist. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass PTHrP (107-111) *in vivo* keinen hypertrophen Effekt auf die Kardiomyozyten auslöst und auch nicht zu den hämodynamischen Zeichen einer Herzinsuffizienz führt. Im Gegenteil, PTHrP (107-111) verbessert die kardiale Leistungsfähigkeit. Diese Feststellung wird dadurch bestätigt, dass keine signifikante Auffälligkeit ($p > 0,05$) für die statischen Hypertrophieparameter (Herzgewicht, Lungengewicht, die Quotienten aus Herzgewicht/ Körpergewicht und Herzgewicht/Tibiallänge) nachzuweisen ist. Insgesamt konnte unsere Untersuchung eine Verbesserung der Herzleistung durch PTHrP (107-111) und eine elektrophysiologische Stabilisierung im Rahmen einer hämodynamischen Belastung *in vivo* feststellen. Der PTH1-Rezeptor Antagonist PTHrP (7-34) führt im Vergleich zu PTHrP (107-111) nicht zu einer positiv inotropen Wirkung bei gesunden Herzen, verringert aber die Gefahr von Extrasystolen durch eine Stabilisierung der Dauer der p-Welle in hämodynamischen Steßsituationen.

VI. Literaturverzeichnis

Abou-Samra AB, Uneno S, Jueppner H, Keutmann H, Potts JT Jr, Segre GV, Nussbaum SR. Non-homologous sequences of parathyroid hormone and the parathyroid hormone related peptide bind to a common receptor on ROS 17/2.8 cells. *Endocrinology* 1989; 125: 2215-2217

Baumgarten G, Kim SC, Stapel H, Vervolgyi V, Bittig A, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knuefermann P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 427-435

Bittig A. Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Hypertrophieantwort nach Druckbelastung im Myokard der Maus. Dissertation med. vet. Justus-Liebig-Universität Gießen 2005

Burtis WJ, Fodero JP, Gaich G, Debeysey M, Stewart AF. Preliminary characterization of circulating amino- and carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related peptide in humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1110-1114

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. In, *J Biol Chem*. 1987; 7151-7156

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

Caulfield MP, Rosenblatt M. Parathyroid hormone-receptor interactions. *Trends Endocrinol Metab* 1990; 1: 164-168

Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fischer E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J, Schluter KD, Silve C, Stewart AF, Takane K, Helwig JJ. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1113-1136

Collip JB. The Internal Secretion of the Parathyroid Glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1925; 11: 484-485

Crass MF 3rd, Pang PK. Parathyroid hormone: a coronary artery vasodilator. *Science* 1980; 207: 1087-1089

Crass MF 3rd, Scarpace PJ. Vasoactive properties of a parathyroid hormone-related protein in the rat aorta. *Peptides* 1993; 14: 179-183

Cros M, Silve C, Graulet AM, Morieux C, Urena P, de Vernejoul MC, Bouizar Z. Estrogen stimulates PTHrP but not PTH/PTHrP receptor gene expression in the kidney of ovariectomized rat. *J Cell Biochem* 1998; 70: 84-93

Curtis NE, King RG, Moseley JM, Ho PW, Rice GE, Wlodek ME. Preterm fetal growth restriction is associated with increased parathyroid hormone-related protein expression in the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 700-705

Curtis NE, Thomas RJ, Gillespie MT, King RG, Rice GE, Wlodek ME. 1998. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) mRNA splicing and parathyroid hormone/PTHrP receptor mRNA expression in human placenta and fetal membranes. *J Mol Endocrinol* 21, 225-234

Day CP, McComb JM, Campbell RW. QT dispersion: an indication of arrhythmia risk in patients with long QT intervals. *Br Heart J* 1990; 63: 342-344

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

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

del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999; 100: 2308-2311

Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 34-49

Everhart-Caye M, Inzucchi SE, Guinness-Henry J, Mitnick MA, Stewart AF. Parathyroid hormone (PTH)-related protein(1-36) is equipotent to PTH(1-34) in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 199-208

Fenton AJ, Kemp BE, Kent GN, Moseley JM, Zheng MH, Rowe DJ, Britto JM, Martin TJ, Nicholson GC. A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 1991; 129: 1762-1768

Fiaschi-Taesch NM, Stewart AF. Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor--trafficking mechanisms and functional consequences. *Endocrinology* 2003; 144: 407-411

Gagnon L, Jouishomme H, Whitfield JF, Durkin JP, MacLean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH, Chakravarthy B. Protein kinase C-activating domains of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 497-503

Goltzmann D, Peytremann A, Callahan E, Tregear GW, Potts JT Jr. Analysis of the requirements for parathyroid hormone action in renal membranes with the use of inhibiting analogues. *J Biol Chem* 1975; 250: 3199-3203

Goomer RS, Johnson KA, Burton DW, Amiel D, Maris TM, Gurjal A, Deftost LJ, Terkeltaub R. The tetrabasic KKKK(147-150) motif determines intracrine regulatory effects of PthrP 1-173 on chondrocyte PPI metabolism and matrix synthesis. *Endocrinology* 2000; 141: 4613-4622

Grohe C, van Eickels M, Wenzel S, Meyer R, Degenhardt H, Doevendans PA, Heinemann MP, Ross G, Schluter KD. Sex-specific differences in ventricular expression and function of parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 307-316

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

Hohnloser SH, van de Loo A, Arendts W, Zabel M, Just H. QT-dispersion in the surface ECG as a parameter of increased electrical vulnerability in acute myocardial ischemia. *Z Kardiol* 1993; 82: 678-682

Holt EH, Lu C, Dreyer BE, Dannies PS, Broadus AE. Regulation of parathyroid hormone-related peptide gene expression by estrogen in GH4C1 rat pituitary cells has the pattern of a primary response gene. *J Neurochem* 1994; 62: 1239-1246

Hongo T, Kupfer J, Enomoto H, Sharifi B, Giannella-Neto D, Forrester JS, Singer FR, Goltzman D, Hendy GN, Pirola C, et al. 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

Horiuchi N, Holick MF, Potts JT Jr, Rosenblatt M. A parathyroid hormone inhibitor in vivo: design and biological evaluation of a hormone analog. *Science* 1983; 220: 1053-1055

Horiuchi N, Rosenblatt M. Evaluation of a parathyroid hormone antagonist in an in vivo multiparameter bioassay. *Am J Physiol* 1987; 253: E187-192

Inomata N, Akiyama M, Kubota N, Juppner H. Characterization of a novel parathyroid hormone (PTH) receptor with specificity for the carboxyl-terminal region of PTH-(1-84). *Endocrinology* 1995; 136: 4732-4740

Jansen J, Gres P, Umschlag C, Heinzl FR, Degenhardt H, Schluter KD, Heusch G, Schulz R. Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H49-55

Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* 1998; 273: 17299-17302

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

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

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* 1994; 8: 277-289

Karaplis AC, 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

Kemp BE, Moseley JM, Rodda CP, Ebeling PR, Wettenhall RE, Stapleton D, Diefenbach-Jagger H, Ure F, Michelangeli VP, Simmons HA, et al. Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science* 1987; 238: 1568-1570

Kolakowski LF Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 1994; 2: 1-7

Korte T, Fuchs M, Arkudas A, Geertz S, Meyer R, Gardiwal A, Klein G, Niehaus M, Krust A, Chambon P, Drexler H, Fink K, Grohe C. Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction. *Circulation* 2005; 111: 2282-2290

Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC, Kronenberg HM. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 15233-15238

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

Lorenz JN, Robbins J. Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *Am J Physiol* 1997; 272: H1137-1146

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

Mangin M, Webb AC, Dreyer BE, Posillico JT, Ikeda K, Weir EC, Stewart AF, Bander NH, Milstone L, Barton DE, et al. Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 597-601

Mannstadt M, Juppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol* 1999; 277: F665-675

Martin KJ, McConkey CJ Jr, Caulfield MP. The role of protein kinase-A activity in the evaluation of agonist/antagonist properties of analogs of parathyroid hormone-related protein in opossum kidney cells. *Endocrinology* 1992; 131: 2161-2164

Marx SJ. Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 2000; 343: 1863-1875

Meyer R, Schreckenber R, Kretschmer F, Bittig A, Conzelmann C, Grohe C, Schluter KD. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) signal cascade modulates myocardial dysfunction in the pressure overloaded heart. *Eur J Heart Fail* 2007; 9: 1156-1162

Mirvis DM. Spatial variation of QT intervals in normal persons and patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 625-631

Mok LL, Nickols GA, Thompson JC, Cooper CW. Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant. *Endocr Rev* 1989; 10: 420-436

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

Musso MJ, Barthelmebs M, Helwig JJ, Imbs JL. Renal vasodilator effect of parathormone. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1989; 82: 1215-1218

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

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

Ogino K, Ogura K, Kinugasa Y, Furuse Y, Uchida K, Shimoyama M, Kinugawa T, Osaki S, Kato M, Tomikura Y, Igawa O, Hisatome I, Bilezikian JP, Shigemasa C. Parathyroid hormone-related protein is produced in the myocardium and increased in patients with congestive heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4722-4727

Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE, Yang KH, Soifer NE, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev* 1994; 15: 40-60

Orloff JJ, Soifer NE, Fodero JP, Dann P, Burtis WJ. Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int* 1993; 43: 1371-1376

Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev* 1996; 76: 127-173

Pines M, Adams AE, Stueckle S, Bessalle R, Rashti-Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LJ. Generation and characterization of human kidney cell lines stably expressing recombinant human PTH/PTHrP receptor: lack of interaction with a C-terminal human PTH peptide. *Endocrinology* 1994; 135: 1713-1716

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

Potts JT Jr, Gardella TJ, Juppner H, Kronenberg H. The history of parathyroid hormone and its receptor: structure-based design of parathyroid hormone analogues. *Osteoporos Int* 7 Suppl 1997; 3: S169-173

Qian 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 parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology* 1999; 140: 1826-1833

Rian E, Jemtland R, 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

Schluter K, 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

Schluter KD. PTH and PTHrP: Similar structures but different functions. *News Physiol Sci* 1999; 14: 243-249

Schluter KD, Piper HM. Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1992; 263: H1739-1746

Schluter KD, 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* 310 (Pt 2) 1995; 439-444

Schluter KD, Weber M, Piper HM. Effects of PTH-rP(107-111) and PTH-rP(7-34) on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 3057-3065

Schluter KD, Wingender E, Tegge W, Piper HM. Parathyroid hormone-related protein antagonizes the action of parathyroid hormone on adult cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 3074-3078

Schorr K, Taimor G, Degenhardt H, Weber K, Schluter KD. Parathyroid hormone-related peptide is induced by stimulation of alpha 1A-adrenoceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 111-118

Segre GV, Goldring SR. Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagonlike peptide 1, growth hormone-releasing hormone, and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4: 309-314

Shan J, Pang PK, Lin HC, Yang MC. Cardiovascular effects of human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 23 Suppl 2: S38-41

Soifer NE, Dee KE, Insogna KL, Burtis WJ, Matovcik LM, Wu TL, Milstone LM, Broadus AE, Philbrick WM, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein. Evidence for secretion of a novel mid-region fragment by three different cell types. *J Biol Chem* 1992; 267: 18236-18243

Stewart AF, Horst R, Deftos LJ, Cadman EC, Lang R, Broadus AE. Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia: evidence for humoral and nonhumoral groups. *N Engl J Med* 1980; 303: 1377-1383

Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med* 2000; 342: 177-185

Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA. Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1987; 80: 1803-1807

Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodriguez H, Chen EY. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 1987; 237: 893-896

Sylvén JC, Horacek BM, Spencer CA, Klassen GA, Montague TJ. QT interval variability on the body surface. *J Electrocardiol* 1984; 17: 179-188

Symons C, Fortune F, Greenbaum RA, Dandona P. Cardiac hypertrophy, hypertrophic cardiomyopathy, and hyperparathyroidism--an association. *Br Heart J* 1985; 54: 539-542

Takasu H, Baba H, Inomata N, Uchiyama Y, Kubota N, Kumaki K, Matsumoto A, Nakajima K, Kimura T, Sakakibara S, Fujita T, Chihara K, Nagai I. The 69-84 amino acid region of the parathyroid hormone molecule is essential for the interaction of the hormone with the binding sites with carboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 1996; 137: 5537-5543

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 U S A* 1990; 87: 6969-6973

Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB. Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H464-474

Tregear GW, Van Rietschoten J, Greene E, Keutmann HT, Niall HD, Reit B, Parsons JA, Potts JT Jr. Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity. *Endocrinology* 1973; 93: 1349-1353

van Eickels M, Schreckenber R, Doevendans PA, Meyer R, Grohe C, Schluter KD. The influence of oestrogen-deficiency and ACE inhibition on the progression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 1079-1084

Volz A, Piper HM, Siegmund B, Schwartz P. Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in serum-free primary culture. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 161-173

Watson PH, Fraher LJ, Natale BV, Kisiel M, Hendy GN, Hodsman AB. Nuclear localization of the type 1 parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in MC3T3-E1 cells: association with serum-induced cell proliferation. *Bone* 2000; 26: 221-225

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

Whitfield JF, Isaacs RJ, Jouishomme H, MacLean S, Chakravarthy BR, Morley P, Barisoni D, Regalia E, Armato U. C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111), stimulates membrane-associated protein kinase C activity and modulates the proliferation of human and murine skin keratinocytes. *J Cell Physiol* 1996; 166: 1-11

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

Wu TL, Vasavada RC, Yang K, Massfelder T, Ganz M, Abbas SK, Care AD, Stewart AF. Structural and physiologic characterization of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem* 1996; 271: 24371-24381

Wysolmerski JJ, Stewart AF. The physiology of parathyroid hormone-related protein: an emerging role as a developmental factor. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 431-460

Yamamoto M, Harm SC, Grasser WA, Thiede MA. Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5326-5330

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

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer, der mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt und mir auch in schwierigen Phasen der Arbeit uneingeschränkt geholfen hat, um die Arbeit erfolgreich abschließen zu können.

Auch meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für Ihr Verständnis und ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums und über den Zeitraum der gesamten Arbeit.