Aus dem Institut für Normale und Pathologische Physiologie
der Philipps-Universität Marburg

Abteilung kardiovaskuläre Zellphysiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Karl-Heinz Voigt

Die Peptide CGRP, Adrenomedullin und PTHrP bewirken eine Dilatation der Koronargefäße durch Aktivierung von KATP-Kanälen.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von Jan Gerhardus aus Siegen

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 22.05.2003.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Prof. Dr. Dr. Daut
Korreferent: PD Dr. Voigt

0 Inhalt

1 Zusammenfassung S. 01

2 Einleitung S. 02

Fragestellung
Regulation des koronaren Blutflusses
ATP-sensitive Klaiumkanäle und ihre Rolle bei Vasodilatation
Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)
Adrenomedullin (ADM)
Parathyroid hormone-related Peptide (PTHrP)
Auswahl der Methode

3 Methodik S. 19

Prinzip des isoliert perfundierten Herzens
Versuchsaufbau und Messtechnik
Tierhaltung
Perfusionslösung
Präparation
Versuchsbeginn
Statistik

4 Ergebnisse S. 32

Wirkung von Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)
Wirkung von Adrenomedullin (ADM)
Wirkung von Parathyroid hormone-related Peptide

5 Diskussion S. 43

6 Literaturverzeichnis S. 52

7 Anhang S. 61

Curriculum vitae
Verzeichnis der akademischen Lehrer
Danksagung

1 Zusammenfassung

CGRP, Adrenomedullin und PTHrP sind seit Mitte der 80er Jahre als vasoaktive Peptide bekannt. Bisher wurden Untersuchungen über die gefäßerweiternde Wirkung dieser Substanzen nur an Zellen oder nicht-isolierten Organen durchgeführt. Das isoliert perfundierte Mäuseherz zeichnet sich durch die isolierte Betrachtungsweise eines ganzen Organs aus. Die Maus zeigt zudem hohe Homologie hinsichtlich ihres Genoms zum Menschen. Es konnten folgende Hypothesen erstmals am isoliert perfundierten Mäuseherzen belegt werden:

- CGRP ist ein stark gefäßerweiterndes Peptid

- Adrenomedullin ist ein stark gefäßerweiterndes Peptid

- PTHrP ist ein stark gefäßerweiterndes Peptid

- CGRP und Adrenomedullin zeigen fast identische Wirkung bei identischer Konzentration

- Die K_{ATP}-Kanäle spielen eine entscheidende Rolle bei der vasodilatatorischen Wirkung der Peptide CGRP, Adrenomedullin und PTHrP

2 Einleitung

Fragestellung

Die Mechanismen der Regulation des koronaren Gefäßtonus sind von enormer Wichtigkeit für die klinische Medizin. Das menschliche Herz wird über die Herzkranzgefäße während der mechanischen Diastole mit sauerstoffgesättigem Blut versorgt, dabei beträgt die Ausschöpfung des Sauerstoffgehalts in Ruhe bereits 70 Prozent. Eine ausreichend vermehrte Versorgung des Herzens mit Sauerstoff bei erhöhtem Bedarf beispielsweise unter Belastung oder pathologischen Bedingungen ist also über diesen begrenzten Rahmen hinaus nur durch eine Erhöhung des Blutflusses möglich, was durch eine Verminderung des Widerstandes der Koronargefäße erreicht werden kann.

In der Pharmakologie kennt man seit langem Stoffgruppen, die vasodilatierende Wirkung haben. Dazu gehören die antipektanginös eingesetzten Nitrate (Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat, Isosorbid-endo-5-mononitrat) und Kalziumkanalblocker (Nifedipin, Verapamil, Diltiazem) als Vor- und Nachlastsenker sowie die Koronardilatatoren.

Die Koronardilatatoren sind als therapeutisch eingesetzte Medikamente nach wie vor umstritten, und nach den bisherigen klinischen Erfahrungen hat sich keine der eingesetzten Substanzen eindeutig durchsetzen können. So ist bewiesen, dass Dipyridamol (ein koronarer Vasodilatator, dessen Wirkprinzip eine Hemmung des Adenosin-Wiederaufnahmeprozesses in die Zelle darstellt) nach einer Schädigung im koronaren Gefäßbett vor allem in den gesunden, per se noch gut durchbluteten Arealen wirkt und diese im Sinne eines so genannten Steal-Phänomens auf Kosten der bereits minder durchbluteten geschädigten Bereiche noch besser versorgt werden (Buffington, 1991; Seiler et al., 1997; Akinboboye, 2001). Damit verfehlen sie ihren therapeutischen Ansatz, nämlich die Rettung der unzureichend versorgten Areale. Deshalb ist es umso wichtiger und vordringlich, die vielfältigen Regulationsmechanismen des koronaren Widerstandes weiter aufzuklären und zu verstehen. Dabei sind seit den achtziger Jahren höhermolekulare Peptide ins Blickfeld gerückt.

In einer inzwischen klassischen Arbeit demonstrierten Brain et al. 1985 in "Nature" die peripher gefäßerweiternde Wirkung eines zu diesem Zeitpunkt neuentdeckten Produktes des Calcitonin – Gens, nämlich Calcitonin gene-related peptide (CGRP). CGRP gehört, wie inzwischen gezeigt werden konnte, gemeinsam mit Adrenomedullin und anderen zu einer Gruppe von Molekülen, die man heute als vasoaktive Peptide bezeichnet (Wimalawansa, 1997). Die gefäßerweiternde Wirkung solcher Substanzen in verschiedenen Körperregionen konnte bewiesen werden, so auch in den Koronargefäßen am Herzen. Dabei ist es nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung, über welche zellbiologischen und zellphysiologischen Mechanismen die Vasodilatation zu Stande kommt. Es wurde gezeigt, dass einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration dabei eine wichtige Rolle zukommt (Nuki et al., 1993; Kato et al., 1995), und dass die Peptide letztlich über eine Verminderung des intrazellulären Kalziumspiegels zu wirken scheinen (Ishikawa et al., 1993; Kureishi et al., 1995; Sun & Benishin, 1995; Fukuizumi et al., 1996; Sheykhzade & Berg Nyborg, 2001).

Bereits 1990 konnten Daut et al. zeigen, dass K_{ATP}-Kanäle in der glatten Muskulatur der koronaren Gefäße wesentlich an der Regulation der hypoxischen Vasodilatation beteiligt sind (Daut et al., 1990). Durch die Gabe von 2 μM des selektiven K_{ATP}-Kanal-Blockers Glibenclamid (ein Sulfonylharnstoffderivat, das wegen seiner Wirkung auf die im Pankreas vorhandenen K_{ATP}-Kanäle in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt wird) konnte die hypoxische Vasodilatation vollständig aufgehoben werden. Inzwischen herrscht weitgehende Einigkeit darüber, dass die K_{ATP}-Kanäle wesentlich an den Vorgängen, die zur hypoxischen Vasodilatation führen, beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der vasoaktiven Peptide in Hinsicht der eventuellen Wirkung über K_{ATP}-Kanäle liefern. Nur über ein besseres Verständnis der Wirkungsweise, die heutzutage auf molekularbiologischer Ebene erforscht und verstanden werden kann und soll, können in absehbarer Zeit Medikamente mit gut planbarer Wirkung in der klinischen Therapie gefunden werden.

Regulation des koronaren Blutflusses

Der koronare Blutfluss spielt eine außerordentlich wichtige Rolle im menschlichen Körper, er muss eine der jeweiligen Situation angepasste Durchblutung und damit Sauerstoffversorgung des Herzmuskels sicherstellen. Er unterliegt komplizierten Regelmechanismen und wird durch verschiedene Steuerelemente dem jeweiligen Bedarf angepasst. Die Arteriolen, der Ort des größten Widerstands im Gefäßsystem, besitzen wie alle anderen Butgefäßabschnitte in ihrer Tunica media glatte Muskelzellen, die durch Kontraktion zu Gefäßverengung und durch Relaxation zu Gefäßerweiterung führen. Gewöhnlich wird ein basaler Tonus ständig aufrecht erhalten, selbst wenn keine sympathische Innervation vorhanden ist.

Generell lassen sich die Regulatoren des arteriolären Gefäßtonus in intrinsische, lokal zu findende, und übergeordnete extrinsisch – systemische Faktoren einteilen. Zu den intrinsischen Faktoren gehören:

- Physikalische Faktoren: Druck von außen komprimiert die Gefäße und führt so zu verminderter Durchblutung; als Bayliss-Effekt bezeichntet man das Phänomen, dass bei intravasaler Druckerhöhung eine reaktive Kontraktion der glatten Muskulatur erfolgt.

- Produkte des Endothels: z.B. trägt Endothelin zur Aufrechterhaltung des basalen Tonus bei, NO (früher als EDRF bezeichnet) führt zu Vasodilatation – es ist wegen seiner starken Wirkung Bestandteil einiger antipektaninöser Medikamente, u.a. Isosorbitdinitrat (ISDN) und Glyceroltrinitrat.

- lokal sezernierte Metabolite: bei steigender Stoffwechselaktivität werden viele chemische Substanzen sezerniert, die im Allgemeinen gefäßerweiternde Wirkung besitzen wie z.B. Laktat und Adenosin. Ebenso lokal werden vasoaktive Substanzen sezerniert: so genannte Autakoide wie Histamin, Bradykinin, Serotonin, Thromboxan, Prostaglandine, Leukotriene und andere.

Zu den extrinsischen Faktoren gehört das automnome Nervensystem: Eine Erhöhung des Sympathikotonus führt über vermehrte Noradrenalinausschüttung zu Vasokonstriktion, eine Verminderung des Sympathikotonus zu Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und daraus resultierender Vasodilatation. Steigt der parasympathische Tonus an, kommt es zu Vasodilatation, umgekehrt führt eine Senkung des Vagotonus zu Vasokonstriktion. In den in dieser Arbeit betrachteten Koronarien verhält es sich umgekehrt, hier führt ein erhöhter Sympathikotonus zur Vasodilatation und ein verminderter zur Gefäßverengung. Ebenfalls dem extrinsischen System zuzurechen sind systemisch wirkende Botenstoffe wie ADH, Angiotensin und Adrenalin. Außerdem sind pH, PaO_2 und $PaCO_2$ an der Regulation des Gefäßmuskeltonus beteiligt.

Im Gegensatz zu großen Arterien und Gefäßen, die als separate funktionelle Einheiten verstanden werden können, sind Mikrogefäße strukturell und funktionell Teil des durch sie versorgten Gewebes, ihre Funktion ist abhängig vom Typus und der Aktivität des umgebenden Gewebes (Simoniescu & Simoniescu, 1984; Shepro & D'Amore, 1984). Diese Arbeit konzentriert sich auf die Mikrozirkulation der koronaren Gefäße und dort auftretende Phänomene, dabei ist das intrinsische Regulationssystem von großer Bedeutung. Hier liegen Kardiomyozyten, glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Nervenzellen, Fibroblasten und Perizyten in unmittelbarer Nachbarschaft. Die enge Beziehung all dieser Zelltypen drückt sich dadurch aus, dass beispielsweise einem humanen Kardiomyozyten durchschnittlich drei bis vier Gefäßlumina direkt anliegen, und der Abstand der teilweise miteinander anastomosierenden Gefäße beträgt im Schnitt nur 17,5 – 19 µM (Beckerath et al., 1991). Eine chemische Interaktion und Kommunikation der verschiedenen Zellarten, vor allem von Herzmuskelzellen (Gerlach et al., 1963; Berne, 1963; Berne, 1980), Endothelzellen (Kelm & Schrader, 1990) und glatten Gefäßmuskelzellen miteinander ist schon seit langem bekannt. Von immenser Bedeutung für eine solche chemische Interaktion ist ein mit interstitieller Flüssigkeit gefüllter perivaskuläre Raum. Das Endothel stellt für die dorthin freigesetzten Substanzen normalerweise eine Barriere dar, sodass aufgrund dessen sehr hohe Konzentrationen der sezernierten Substanzen im perivaskulären Raum erreicht und aufrecht erhalten werden können (Decking et al., 1988; Wangler et al., 1989; Bassinghtwaighte, 1992; Gidday et al., 1992).

ATP-sensitive Kaliumkanäle und ihre Rolle bei Vasodilatation

Ionenkanäle sind Membranproteine, die je nach Struktur und Aufbau für bestimmte Ionen durchlässig sind. Diese Ionen folgen dann – wenn der Kanal geöffnet ist – dem biologisch-chemischen Gradienten, um das Ruhepotential der Membran aufrecht zu erhalten oder die Zellmembran zu hyper- oder zu depolarisieren. Die Ionen wandern durch eine wassergefüllte Pore nach intra- oder extrazellulär. Zu den wichtigsten Ionenkanälen gehören die Natriumkanäle, die insbesondere zu Beginn des Aktionspotentials am Nerven in Erscheinung treten, die Kalziumkanäle und die Kaliumkanäle (vor allem für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials wichtig). Es ist eine große Zahl verschiedener Kaliumkanäle bekannt. Durch unterschiedliche Kombination von Untereinheiten entsteht eine Vielzahl von verschiedenen Kanälen; die sehr heterogene Gruppe der Kaliumkanäle umfasst im Herzen vor allem:

- einwärts-gleichrichtende Kanäle (inward rectifier – Kir): Kir 2.1, Kir 3.1, Kir 3.4, Kir 6.1, Kir 6.2. Sie besitzen zwei transmembranäre α-Helices.
- spannungsabhängige Kanäle (K_V): Shaker – Familie, u.a. K_V1 – K_V6; sie besitzen sechs transmembranäre α-Helices.
- Die α-Untereinheit des K_{ATP}-Kanals ist ebenfalls ein Mitglied der Kir-Familie und ist zusätzlich mit Sulfonylharnstoffrezeptoren kombiniert. Dadurch entstehen die ATP-sensitiven Kaliumkanäle.

Die ATP-sensitive Kaliumkanäle wurden gefunden im Herzmuskel (Noma, 1983), Pankreas-Inseln (Cook & Hales, 1984), Skelettmuskel (Spruce, Standen & Stanfield, 1985), ZNS (Ashford, Boden & Treherne, 1990), Endothel (Mederos y Schnitzler et al., 2000) und glatten Gefäßmuskelzellen (Standen, Quayle, Davies et al., 1989; Clapp & Gurney, 1992). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie den zellulären Metabolismus mit dem Membranpotential koppeln, indem sie durch – metabolisch bedingt – hohe intrazelluläre ATP-Spiegel geschlossen werden, das heißt ihre Öffnungswahrscheinlichkeit nimmt sehr stark ab. Sie sind also durch eine starke Hemmung in ihrer Aktivität durch intrazellulär hohen ATP-Spiegel charakterisiert. Dadurch

kommt es zu einer Depolarisation der Zellmembran, was wiederum in den glatten Muskelzellen die dort ebenfalls in der Membran befindlichen spannungsanbhängigen Kalzium-Kanäle dazu veranlasst, zu öffnen (bzw. deren Öffnungswahrscheinlichkeit stark erhöht). Darauf führt ein Kalziumeinstrom letztlich zu Kontraktion der glatten Muskelzellen und damit zu einer Verengung der Gefäße. Umgekehrt hat eine Verminderung des ATP-Spiegels eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle zur Folge, was über einen verminderten Kalziumeinstrom und damit verminderten Kalziumspiegel zur Erschlaffung der glatten Muskulatur führt – es resultiert eine Vasodilatation.

Die K_{ATP}-Kanäle liegen vor als komplexe Proteine, bestehend aus mehreren Untereinheiten. Aus diesen Untereinheiten formen sich verschiedene K_{ATP}-Kanäle, die gewebsspezifisch auftreten (Tab. 1 und Abb. 2) (Sakura et al., 1995; Inagaki et al., 1995; Aguilar-Bryan et al., 1995; Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996; Chutkow et al., 1996; Yamada et al., 1997). Es handelt sich dabei immer um Oktamere aus je vier Alpha-Untereinheiten und vier Beta-Untereinheiten. Die Alpha-Untereinheiten entstammen der Familie der Kalium-einwärts-gleichrichtenden Proteine (inward rectifier; Kir 6.1 und Kir 6.2) und formen die Kanalpore (Inagaki et al., 1995). Sie determinieren in erster Linie die Ionenselektivität und die gleichrichtenden Eigenschaften des Kanals. Die vier Beta-Untereinheiten sind ihrer Sulfonyl-Harnstoff-Affinität wegen der Gruppe der Sulfonylharnstoffrezeptoren (sulphonyl urea receptor; SUR) zugeordnet und in SUR1 (Aguilar-Bryan et al., 1995), SUR2A (Inagaki et al., 1996) und SUR2B (Isomoto et al., 1996) unterteilt. Die SUR-Untereinheiten sind vornehmlich für ADP-Sensitivität und die pharmakologischen Eigenschaften verantwortlich (D'hahan et al., 1999) sowie für die Reaktion auf Blocker und Öffner von Kaliumkanälen (Bryan & Aguilar-Bryan, 1999). Die gewebsspezifische Kombination von Kir- und SUR-Untereinheiten könnte auch für die unterschiedlichen Kaliumströme in den jeweiligen Geweben verantwortlich sein, die sich in Patch Clamp-Untersuchungen gezeigt haben, sowie die unterschiedlich starken Reaktionen auf parmakologische Substanzen wie z.B. Diazoxid (Cui et al., 2001).

Die Amino- und Carboxy-Enden der Alpha-Untereinheiten liegen intrazellulär. Dazwischen befinden sich zwei transmembranäre Domänen und zentral von zwei kurzen extrazellulären nicht glykosylierten Schleifen eingefasst der porenbildende Bereich. Für die Kaliumselektivität der Porenregion, die auch als H5-Segment bezeichnet wird, ist die konservierte

Aminosäurensequenz Threonin-Isoleucin-Glycin-Phenylalanin-Glycin (TIGFG) verantwortlich. Die Alpha-Untereinheit besitzt eine für ATP hochaffine Bindungsstelle (Trapp et al., 1998; Tucker et al., 1998; Tanabe et al., 2000) und scheint damit für die ATP-abhängige Hemmung der K_{ATP}-Kanäle vorwiegend verantwortlich zu sein (Tucker et al., 1998; Tanabe et al., 1999).

Die Beta-Ketten besitzen ein extrazellulär gelegenes, glykosyliertes Amino-Ende. Darauf folgen elf transmembranäre Domänen und eine erste, intrazellulär gelegene Nukleotidbindungstasche. Nach weiteren sechs transmembranären Domänen, von denen eine glykosyliert ist, folgt das intrazelluläre Carboxy-Ende. Dieses Carboxy-Ende weist eine weitere Nukleotidbindungstasche auf, so dass man bei jeder Beta-Untereinheit bei siebzehn transmembranären Domänen insgesamt zwei intrazellulär gelegene Nukleotidbindungstaschen findet. Die Nukleotidbindungstaschen weisen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz die so genannten Walker-Motive auf (Walker et al., 1982): Walker A und Walker B, sowie eine dazwischen gelegene weitere Aminosäuresequenz. Diese drei Aminosäuresequenzen sind charakteristisch für die ABC-Transporter. Die Nukleotidbindungstaschen haben unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften und Funktionen. Die erste Nukleotidbindungstasche ist wesentlich stärker affin für ATP als die zweite, jedoch hydrolysiert sie ATP im Gegensatz zur zweiten Nukleotidbindungstasche kaum (Ueda et al., 1997; Matsuo et al., 1999). Zuätzlich besteht eine Interaktion der beiden Nukleotidbindungstaschen. Wenn z.B. ATP an der ersten Nukleotidbindungstasche bindet, wird es durch nachfolgend an die zweite Nukleotidbindungstasche angedocktes ADP stabilisiert (Ueda et al., 1999).

Kinetik und Pharmakologie der Beta-Untereinheiten sowie ihre ATP-Sensitivität können also funktionell getrennt werden: eine Region innnerhalb der ersten fünf Transmembrandomänen der SUR-Untereinheit spezifiziert die Kinetik, während das C-terminale Segment mit seinen Nukleotibindungstaschen ATP und ADP binden kann (Babenko et al., 1999).

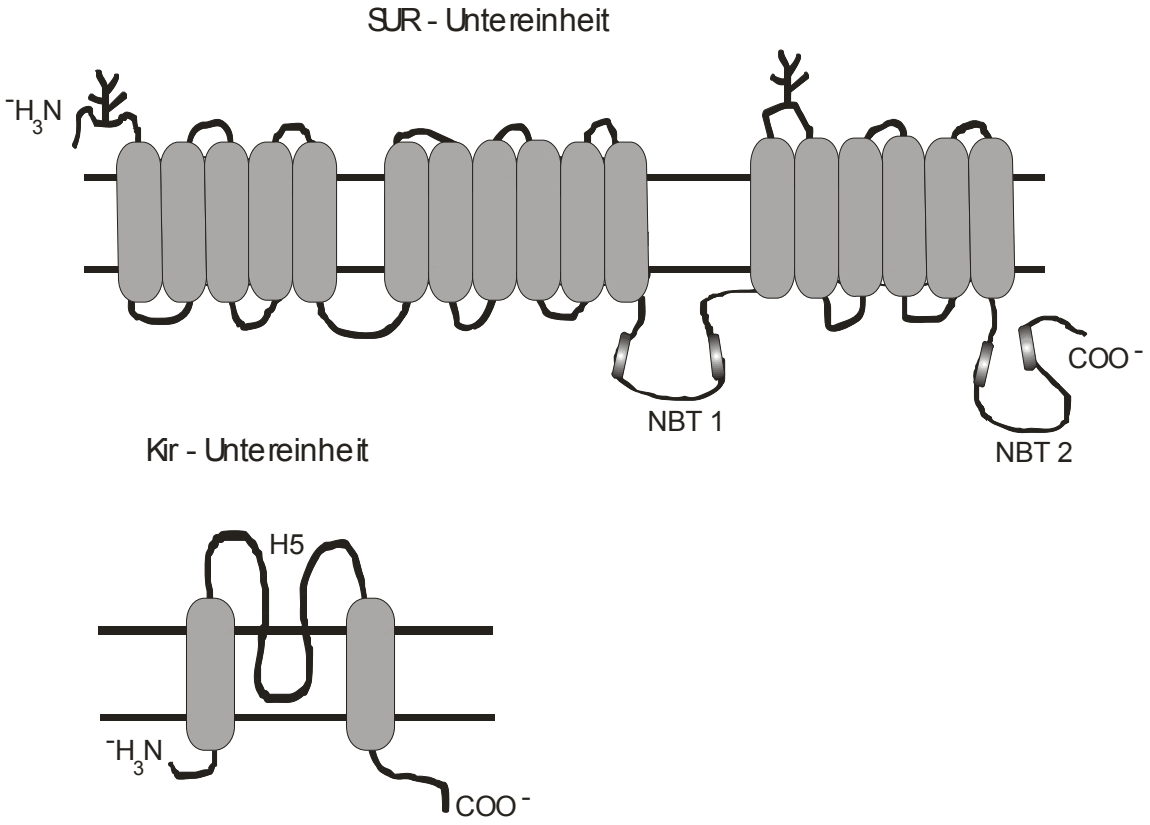


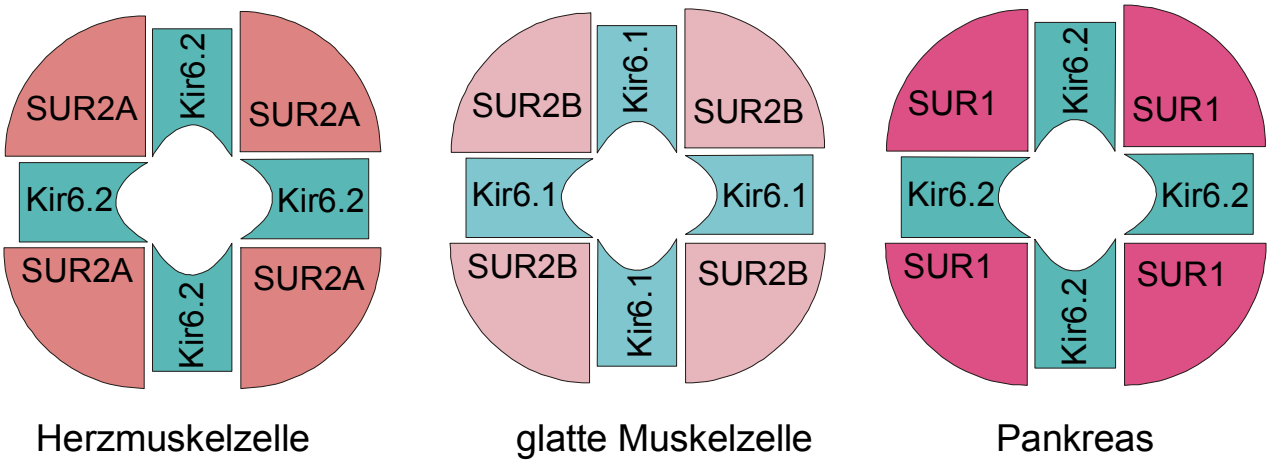
Abb. 1: *schematischer Aufbau der Untereinheiten SUR und Kir, aus denen sich die K_{ATP}-Kanäle zusammensetzen. Die SUR-Untereinheit besitzt siebzehn transmembranäre Domänen, ein extrazelluläres Amino-Ende und ein intrazelluläres Carboxy-Ende. Sie besitzt zwei intrazelluläre Nukleotidbindungstaschen NBT 1 und NBT 2. Die Nukleotidbindungstaschen weisen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz die Motive Walker A und Walker B auf. Die SUR-Untereinheit ist an zwei Stellen glykosyliert.*

Die Kir-Untereinheit besitzt zwei transmembranäre Domänen, zwischen denen die H5-Region die Pore bildet. Amino- und Carboxy-Ende liegen intrazellulär.

Zelltyp	Kir – Untereinheit	SUR - Untereinheit
β-Zellen des Pankreas	Kir6.2	SUR1
Nervensystem	Kir6.2	SUR1
Herzmuskel und Skelettmuskel	Kir6.2	SUR2A
Glatte Muskulatur	Kir6.1	SUR2B

Tab.1: *Durch Kombination von Kir- und SUR-Untereinheiten entstehende K_{ATP}-Kanäle und ihr Vorkommen in verschiedenen Geweben. In glatter Muskulatur sind die K_{ATP}-Kanäle aus Kir6.1 oder 6.2 und SUR2B kombiniert.*

Abb.2: *Die gewebespezifisch exprimierten K_{ATP}-Kanäle in glatten Muskelzellen und damit auch in glatten Gefäßmuskelzellen fügen sich aus je vier Kir6.1 oder Kir6.2 und vier SUR2B – Untereinheiten zu einem Oktamer zusammen.*



Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)

Calcitonin und CGRP gehören gemeinsam mit Adrenomedullin (ADM) und Amylin zu einer Familie strukturell und biologisch verwandter Polypeptide (Oliver et al., 1998). CGRP ist ein Peptid, das sich aus 37 Aminosäuren zusammensetzt und ein potentes Relaxans sowohl vaskulärer als auch gastrointestinaler glatter Muskelzellen darstellt (Le Zhang et al., 1994). Man kennt zwei CGRP-Formen: das ursprünglich entdeckte Produkt des Calcitonin-Gens, inzwischen als α-CGRP bezeichnet, und das unabhängig vom Calcitonin-Gen codierte β-CGRP. Diese beiden Moleküle unterscheiden sich lediglich in drei Aminosäuren voneinander (Steenberg et al., 1985). Hinsichtlich ihrer biologischen Aktivitäten konnte bisher kein Unterschied festgestellt werden; diese biologischen Aktivitäten umfassen die Regulation von Synapsen, der Antigenpräsentation, der Neurotransmission und des vaskulären Tonus (McLatchie et al., 1998).

Calcitonin und Calcitonin gene-related Peptide (CGRP) werden von demselben Gen codiert. Durch alternatives Spleißen entsteht entweder Calcitonin oder α-CGRP. Bei diesem Vorgang werden gewebespezifisch durch Herausschneiden von Introns bestimmte Exons miteinander kombiniert und zur mRNA transkribiert: in thyroidalen C-Zellen werden die Exons 1, 2, 3 und 4 transkribiert, als Endprodukt der Translation und posttranslationeller Prozesse entsteht Calcitonin. In Nervengewebe dagegen entsteht aus den Exons 1, 2 und 3 sowie 5 und 6 als Endprodukt α-CGRP (Abb. 3). Bei den CGRP-Rezeptoren wurden zwei Subtypen klassifiziert und als CGRP 1 bzw. CGRP 2 bezeichnet, basierend auf der Affinität zu CGRP (8-37), einem CGRP-Peptid, dem die ersten sieben Aminosäuren fehlen und das den Effekt des eigentlichen CGRP antagonisiert; dabei weist CGRP (8-37) eine hohe Affinität zu CGRP 1-Rezeptoren auf, nicht aber zu CGRP 2-Rezeptoren (Yoshimoto et al., 1998). Aufgrund der Tatsache, dass ein CGRP-Molekül ohne die ersten sieben Aminosäuren keine Wirkung besitzt, ist davon auszugehen, dass diese sieben Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die Wirkung von CGRP besitzen. Tatsächlich findet sich in diesem C-terminalen Bereich eine Disulfidbrücke zwischen Position zwei und sieben. Diese Disulfidbrücke könnte für die Sekundärstruktur von CGRP verantwortlich sein.

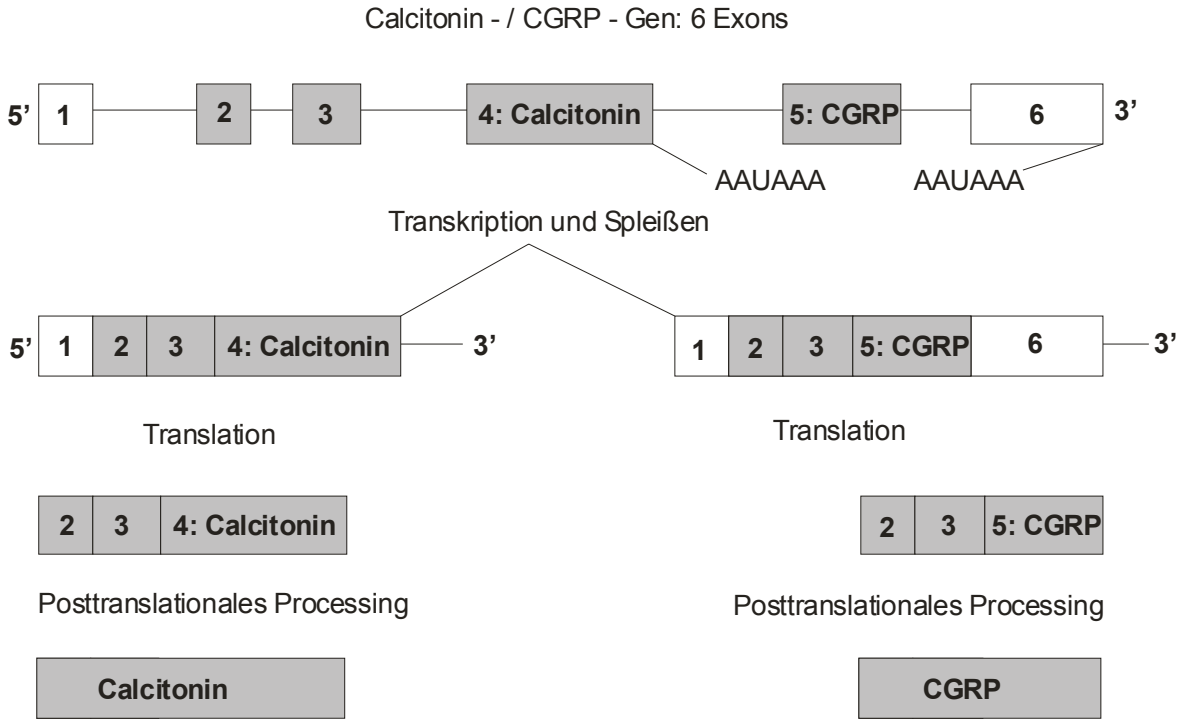


Abb. 3: *Durch alternatives Spleißen wird in C-Zellen der Schilddrüse Calcitonin gebildet, in Nervengewebe CGRP: Werden die Exone 1-4 transkribiert, ensteht nach Translation und posttranslationellem Processing Calcitonin. Werden die Exone 1-3 und 5-6 transkribiert, entsteht nach Translation und posttranslationellem Processing CGRP.*

Das Gen besitzt nach Exon 4 und Exon 6 jeweils einen Poly-A-Schwanz, der für den Prozess der Lokalisation des alternativen Spleißens von Wichtigkeit ist.

Innerhalb der CGRP 1-Klasse wurden wiederum einzelne Rezeptoren isoliert, unter anderem RCD 1 (im Hippokampusbereich der Ratte) und ein mit dem Calcitonin-Rezeptor verwandter Rezeptor, der als Calcitonin receptor-like receptor (CRLR) bezeichnet wird (ebenfalls im Rattenhirn). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das humane Homolog von CRLR die pharmakologischen Eigenschaften der CGRP 1-Klasse besitzt (Oliver et al., 1998). CRLR kann dabei sowohl als CGRP 1-Rezeptor als auch als Rezeptor für Adrenomedullin (ADM) fungieren; dies wird moduliert durch eine Familie von Proteinen, die in der Literatur als Receptor activity modifying Proteins (RAMPs) bezeichnet werden. RAMPs sind integrale Membranproteine mit einem langen extrazellulären N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulär gelegenen C-Terminus. RAMP 1 bis 3 sind beschrieben worden (McLatchie et al., 1998), sie interagieren mit mindestens zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, nämlich dem Calcitonin-Rezeptor (CR) und dem Calcitonin receptor-like receptor (CRLR) (Foord et al., 1999). Ohne RAMP-Beteiligung bleibt der Rezeptor sensitiv für Calcitonin und heißt dann folgerichtig CR. Alle RAMPs machen den Calcitonin – Rezeptor (CR) für Amylin sensitiv, RAMP 1 und RAMP 2 sind für die Modulation des CRLR-Moleküls verantwortlich. Ein auf CGRP reagierender Rezeptor wird dabei gebildet, wenn RAMP 1 interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass nur CRLR oder RAMP 1 jeweils alleine ohne das andere Molekül in einer Zelle exprimiert keine signifikante Reaktion auf CGRP-Applikation hervorrufen, dagegen die gemeinsame Expression in einer Zelle eine Antwort in Form eines Anstieges des cAMP-Spiegels hervorruft (McLatchie et al., 1998).

Adrenomedullin (ADM)

In engem Zusammenhang mit dem oben beschriebenen CGRP ist Adrenomedullin zu sehen, insbesondere wegen des postulierten gemeinsamen RAMP-modulierten Rezeptor-Moleküls CRLR. Erstmals wurde Adrenomedullin 1993 als Produkt des Phäochromozytoms, einem katecholamin-bildenden Tumor des Nebennierenmarks, identifiziert (Kimatura et al., 1993a). In gemeinsamer Expression und Interaktion von CRLR und RAMP2 entsteht der ADM-Rezeptor.

Adrenomedullin soll über eine Erhöhung des zytomplasmatischen cAMP-Spiegels in verschiedenen Geweben einschließlich der glatten Muskelzellen wirken, was zu nachfolgender Gefäßrelaxation und -erweiterung führen könnte (Kubota et al., 1985; Edvinsson et al., 1985; Ishizaka et al., 1994; Shimekake et al., 1995).

Adrenomedullin ist ein aus 52 Aminosäuren bestehendes Peptid mit einer Disulfidbrücke zwischen der sechzehnten und einundzwanzigsten Aminosäure und besitzt einen amidierten Tyrosinrest am Carboxy-Ende. Aufgrund seiner Homologie zu CGRP wurde es der Calcitonin-CGRP-Amylin-Familie zugeordnet (Kitamura et al., 1993a). Die Synthese erfolgt aus einem Vorläufer-Molekül, dem Präproadrenomedullin, welches vom Adrenomedullin-Gen auf Chromosom 11 codiert wird (Ishimitsu et al., 1994). Dieses Präproadrenomedullin besteht aus 185 Aminosäuren (Kitamura et al., 1993b, Sakata et al., 1993) und besitzt am N-Terminus eine 21 Aminosäuren lange Signalsequenz, an die sich eine zwanzig Aminosäuren lange amidierte Aminosäuresequenz anschließt, die als „Proadrenomedullin N-terminal 20-peptide“ oder PAMP bezeichnet wird (Kitamra et al., 1993b).

Der Plasmaspiegel von Adrenomedullin bewegt sich beim Gesunden in der Größenordnung von 1-10 pM (zumeist 2 bis 3,5 pM) (Hinson et al., 2000). Man vermutet, dass Adrenomedullin im Plasma vorwiegend in C-terminal glykosylierter Form vorliegt und über enzymatische Amidierung in die aktive Form überführt wird. Die glycierte Form wird auch als intermediäres Peptid bezeichnet. Die Plasmakonzentration des inaktiven Adrenomedullins liegt bei 2,7 ± 0,18 pM, die der aktiven Form bei 0,48 ± 0,05 pM (Kitamura et al., 1998). Die Bioverfügbarkeit von Adrenomedullin könnte auch durch das aktuell entdeckte Adrenomedullin-Bindungsprotein AMBP 1 beeinflusst werden (Elsasser et al., 1999). Die Plasmahalbwertszeit von

Adrenomedullin liegt bei 22,0 ± 1,6 Minuten (Meeran et al., 1997). Es wurde vorgeschlagen, dass die Lunge der Hauptabbauort von Adrenomedullin sei (Nishimiki et al., 1994).

Die Expression wurde insbesondere im Herzen, der Niere und Nebenniere, der Leber und der Lunge von Ratte und Mensch nachgewiesen (Kitamura et al., 1993; Sakata et al., 1994). Die Expression von Adrenomedullin-Rezeptoren wurde besonders ausgeprägt im Herzen gefunden, was auf einen direkten Einfluss auf die kardiale Funktion hinweisen könnte (Nishimiki et al., 1998). So wurde auch eine positive Wirkung von Adrenomedullin auf die NO-Synthese im Herzen (Ikeda et al., 1996), eine vermehrte Expression nach Herzversagen bei Ratten (Nishimiki et al., 1998) sowie eine erhöhte Konzentration von Adrenomedullin im septischen Schock, nach Herzversagen beim Menschen (Jougasaki et al., 1995; Nishimiki et al., 1995; Nishimiki et al., 1997) und bei Bluthochdruck entdeckt. Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung in der Homöostase des Blutdrucks sein. Zudem wurde die Synthese von Adrenomedullin auch in glatten Gefäßmuskelzellen und in Endothelzellen nachgewiesen (Sugo et al., 1994). Da Adrenomedullin einzig im septischen Schock Plasmakonzentrationen in der zur direkten Rezeptoraktivierung nötigen Höhe erreicht, kann man von auto- und parakriner Wirkung ausgehen.

Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP)

Man hat lange vermutet, dass Parathormon (PTH), ein von den Nebenschilddrüsen sezerniertes Peptid, gefäßerweiternde Wirkung besitzt (z.B. Mok et al., 1989). Heute weiß man, dass nicht durch PTH selbst, sondern durch Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP) eine stark gefäßerweiternde Wirkung hervorgerufen und von diesem über PTH-Rezeptoren vermittelt wird (Massfelder et al., 1996). Zunächst wurde PTHrP als Verursacher von oft beobachteter Hyperkalzämie im Rahmen maligner Erkrankungen, also paraneoplastischer Natur, beschrieben (Martin et al., 1991; Orloff et al., 1994; Stewart et al., 1995). Die Calcium-mobilisiernde Wirkung legte eine enge Verwandtschaft zu PTH nahe, woraus sich die Nomenklatur erklärt. In weiteren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass PTHrP nicht nur in den Nebenschilddrüsen, sondern ubiquitär sezerniert wird und offenbar drei Hauptfunktionen besitzt: Erstens ist es wichtig für Modulation und Regulation von transplazentärem Calciumtransport (Tucci et al., 1996; Martin et al., 1997; Farrugia et al., 2000), zweitens spielt es eine entscheidende Rolle während Entwicklung und Differenzierung in fast allen bisher darauf untersuchten Geweben (Guise & Mundy, 1996; Kronenberg et al., 1996; Cooper, 1997; Dunbar & Wysolmerski, 1999)(wodurch es funktionell in die Nähe von Wachstumshormonen wie TGF-α oder IGF-1 eingeordnet werden kann), drittens besitzt es stark relaxierende Wirkung auf glatte Muskulatur (u.a. Tucci et al., 1996).

Aus dem Produkt des PTHrP-Gens werden durch alternatives Spleißen initial drei Translationsprodukte gebildet. Sie besitzen alle drei eine 36 Aminosäuren große Signalsequenz, gefolgt von 139 Aminosäuren. Die Unterscheidung ist anhand der Carboxy-Enden möglich: Eine Isoform endet mit der 139. Aminosäure; die zweite Isoform beinhaltet zwei zusätzliche Aminosäuren, während die dritte Isoform insgesamt 34 zusätzliche Aminosäuren besitzt. Die Homologie zu PTH findet sich in den ersten 13 Aminosäuren; die Aminosäure*sequenz* an Position 14 bis 34 unterscheidet sich zwar von PTH, zeigt aber interessanterweise eine sehr ähnliche *Konformation* zu PTH. Deshalb bezeichnet man auch diesen Teil der Aminosäuresequenz als PTH-ähnlich. Die Aminosäuresequenz 35 bis 111 zeigt keine Verwandtschaft zu bekannten Proteinen, ist aber konserviert (Mensch, Ratte, Huhn, Maus). Ebenfalls einen gewissen Konservierungsgrad zeigen die Aminosäuren 111 bis 139. Die

restlichen Aminosäuren weisen keine Homologien auf (Massfelder et al., 1996).

Die Gruppe von (reifen) Tochterproteinen, die durch posttranslationelle Reifung der Vorläuferproteine entsteht, ist nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Bisher ist unter anderem PTHrP 1-36 identifiziert worden, außerdem eine reife Form, die an Aminosäure 37 beginnt; auf Grund der spezifischen Aminosäurenkonfiguration der mRNA an der Stelle 102 – 106: Lys-Lys-Lys-Arg-Arg vermutete man weitere PTHrP – Isoformen ab Aminosäure 107, inzwischen kennt man PTHrP 107-111, PTHrP 107-139 und PTHrP 109-138. Diese Vielfalt an reifen PTHrP-Molekülen lässt eine Varietät hinsichtlich der Rezeptoren vermuten. Mindestens zwei Subtypen kommen in Frage: Rezeptoren, die die PTH-verwandte Region binden können und damit PTHrP 1-34 und PTHrP 1-36, sowie Rezeptoren für die mittleren Regionen (PTHrP 37-?) und die COOH-Region (PTHrP 107-139 etc.), die PTH-unabhängig sind. Insgesamt ist über die PTHrP-Rezeporen bisher wenig herausgefunden worden, insbesondere die postulierten Rezeptoren für mittlere und C-terminierte Regionen sind weitgehend unbekannt. Es scheint zudem einen eigenen PTHrP 1-36 Rezeptor zu geben, der auf PTH keine Reaktion zeigt; neue Untersuchungen haben gezeigt, dass PTHrP-Wirkungen auch über Rezeptoren vermittelt werden, die von den klassischen PTH/PTHrP Rezeptoren völlig unabhängig sind (Yamamoto et al., 1997; Valin et al., 2001).

Die eingangs beschriebenen Hauptfunktionen von PTHrP werden von verschiedenen Isoformen unterschiedlich ausgefüllt: so stimuliert PTHrP 1-36 die Osteoklastentätigkeit, während PTHrP 107-139 sie hemmt. Die somatotropen Wirkungen werden offenbar von N-terminalen PTHrP-Produkten wahrgenommen, während der Calcium-Transport eher durch mittlere Isoformen (PTHrP 37-?) moduliert wird; andererseits beeinflussen die N-terminalen Isoformen in der Niere sowohl Calcium-Transport als auch Entwicklung. Man kann also keineswegs von absoluter Spezifität hinsichtlich Wirkort oder Funktion reden. Vasodilatierende Effekte im Koronarsystem konnten in vitro mit PTHrP 1-34 und PTHrP 1-36 gezeigt werden.

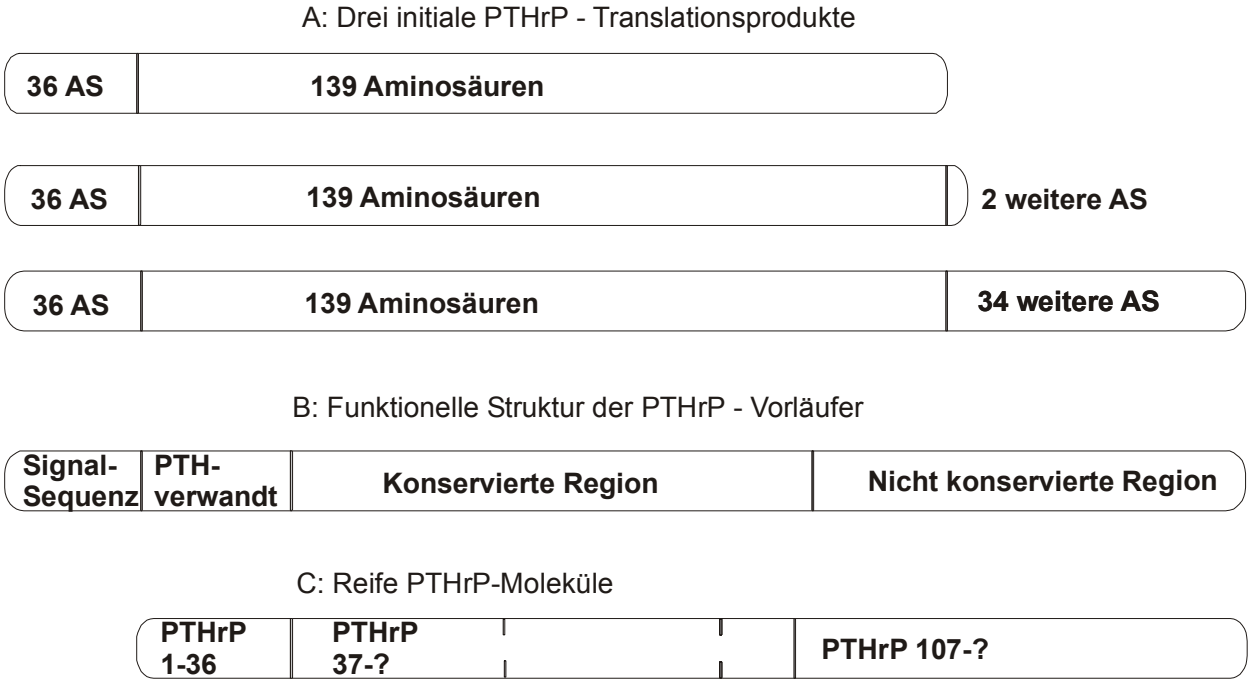


Abb. 4: *durch alternatives Spleißen entstehen drei initiale Translationsprodukte des PTHrP-Gens, die sich durch die Länge ihres Carboxy-Endes unterscheiden (A). Funktionell enthalten alle drei Vorläufermoleküle ein 36 Aminosäuren langes Signalpeptid am N-Terminus, eine PTH-homologe bzw. PTH-konformationsähnliche Sequenz über 34 Aminosäuren, eine bei vier Spezies konservierte Sequenz von 77 Aminosäuren gefolgt von 28 geringgradig konservierten Aminosäuren und 33 Aminosäuren, die keine Homologie zu irgend einem bekannten Peptid aufweisen und humanspezifisch sind (B). Eine Vielzahl von reifen PTHrP-Moleülen entsteht durch posttranslationale Modifikation, die reifen PTHrP-Moleküle sind bis auf wenige Ausnahmen noch weitgehend uncharakterisiert (C).*

3 Methodik

Prinzip des isoliert perfundierten Herzens

Um die Änderungen des koronaren Gefäßwiderstandes nach Applikation verschiedener Pharmaka am Herzen der Maus zu untersuchen, wählten wir die Methode des isoliert perfundierten Herzens. Dabei wird das Herz vom übrigen Situs getrennt, was bedeutet, dass sowohl Lungen- als auch Körperkreislauf fehlen und nervale, humorale und nutritive Regelkreise des Gesamtorganismus ausgeschaltet sind. So ist eine relativ isolierte Betrachtung der Herzfunktion möglich. Die einzelnen Ergebnisse sind aufgrund der Standardisierung jederzeit reproduzierbar.

Bei Versuchen mit isoliert perfundierten Organen besteht außerdem im Gegensatz zur in vivo-Betrachtung des gesamten Organismus die Möglichkeit, Bedingungen wie Sauerstoffgehalt, pH und Temperatur zu regulieren und zu variieren; es können auch toxische Dosen eingesetzt und getestet werden.

Bei der Methode des isoliert perfundierten Herzens wird eine Kanüle in den Aortenstumpf eingeführt und die Aorta daran befestigt, und anschließend wird das Herz retrograd durch den Aortenstumpf mit saliner und sauerstoffangereicherter Lösung perfundiert. Die Valvae aortae schließen sich durch den Druck des Lösungsmittelstroms, so dass das jeweilige Perfusat durch die Koronarostien in die *Arteriae coronariae* fließt. Perfundiert wird flusskonstant oder druckkonstant durch die Aortenkanüle, an der das Herz mit chirurgischem Nahtmaterial (Catgut) angebunden ist. Über einen T-Schenkel werden die Druckänderungen fortgeleitet und werden dort gemessen. Das Perfusat fließt über den *Sinus coronarius* ab. Sowohl bei flusskonstanter als auch bei druckkonstanter Perfusion lässt sich der koronare Gefäßwiderstand aus dem Verhältnis der konstanten zur variablen Größe (Flussrate / Druck oder umgekehrt) berechnen.

Den Berechnungen liegt das Hagen-Poiseuillesche Gesetz zu Grunde, welches besagt, dass der Leitwert G sich nach folgender Formel berechnet:

$$G = \frac{\pi \cdot r^4}{8 \cdot l \cdot \eta} \Rightarrow R = \frac{8 \cdot l \cdot \eta}{\pi \cdot r^4}$$

(l = Länge der Röhre, η = Viskosität der Flüssigkeit, π = 3,1415927, r = Radius der Röhre)

Der Term wird oft als Strömungsleitwert G, der Kehrwert als Strömungswiderstand R bezeichnet. Wichtig ist vor allem die Abhängigkeit von r^4. Eine Verdoppelung des Radius führt also zu einer Versechzehnfachung der durchfließenden Flüssigkeitsmenge pro Zeiteinheit durch ein Rohr. Dies gilt für laminare Strömungen in einem starren Rohr, ist aber sehr begrenzt auch auf den Blutfluss im Gefäßsystem anwendbar.

Von besonderem Interesse ist diese Abhängigkeit in der Medizin bei der Regulierung des Blutkreislaufes. Durch geringe Querschnittsveränderungen wird in den Arteriolen die Durchblutung sehr effektiv geregelt. Änderungen des Gefäßquerschnitts sind somit der dominierende Regelungsfaktor, so auch im in dieser Arbeit untersuchten Koronarsystem. Wenn Länge der Röhre und Viskosität der Flüssigkeit wie bei unserer Methode konstant sind, ergibt sich bei Weglassen aller Konstanten aus der Hagen-Poiseuilleschen Formel vereinfachend eine umgekehrte Proportionalität des Gefäßradius in seiner vierten Potenz zum Widerstand R. Das Ohmsche Gesetz wiederum erlaubt, den Strömungswiderstand R wie schon oben erwähnt aus dem Verhältnis von Druck zu Fluss zu berechnen.

$$R = \frac{Druckänderung}{Flussänderung} \approx \frac{1}{r^4}$$

Entweder wird der Druck oder der Fluss konstant gehalten. Ich habe mich für die messtechnisch einfachere Variante des konstanten Flusses entschieden, so dass dieser dann mathematisch eliminiert werden kann. Es ergibt sich eine umgekehrte Proprotionalität des Gefäßradius in seiner vierten Potenz zur Druckänderung: man erhält also bei Verdoppelung des Gefäßradius einen Abfall des Perfusionsdrucks um nahezu das Sechzehnfache und umgekehrt eine entsprechende Widerstandserhöhung, also einen Anstieg des Perfusionsdrucks bei Halbierung des Gefäßradius gemäß der vereinfachten Gleichung.

$$Druckänderung = \Delta P = \frac{1}{r^4}$$

Versuchsaufbau und Messtechnik

Die Perfusion der *Arteriae coronariae* erfolgte retrograd durch den Aortenstumpf bei konstanter Flussrate, wobei die *Valvae aortae* geschlossen waren und das Perfusat durch die Koronarostien in die *Arteriae coronarie* abfloss; gemessen wurden die Druckänderungen, die sich ergaben, wenn sich die Koronarien erweiterten oder verengten. Dazu war die *Aorta ascendens* des Herzens an ein dünnes Kanülenstück aus rostfreiem Stahl angebunden, welches in einer dreischenkeligen Aortenkanüle aus Polymethylmethacrylat (PMMA) eingearbeitet war. In das Kanülenstück war eine Rille gefräst worden, in der der Knoten aus chirurgischem Nahtmaterial lag. So wurde ein Abrutschen des Herzens von der Kanüle vermieden. Während der Experimente wurde zwischen den benötigten Lösungen hin- und hergeschaltet, dies wurde mittels eines mechanischen Umschalters bewerkstelligt, welcher direkt vor der Aortenkanüle befestigt war (Abb. 5 unten). So war der Lösungswechsel in weniger als einer halben Sekunde möglich, ohne dass sich Temperatur oder koronarer Perfusionsdruck änderten und so dass die Effekte ohne Zeitverzögerung gemessen werden konnten. Die Lösungen wurden für die Dauer des jeweiligen Versuchs in Glasflaschen gefüllt, diese wurden mit einem Gummistopfen verschlossen und in einem Wasserbad (Thermomix, Braun-Melsungen AG, Melsungen) erwärmt. Außerdem wurden die Lösungen für mindestens 15 Minuten mit Carbogen begast. Die Lösungen wurden gefiltert und durch einen gläsernen Wärmetauscher geleitet, so dass das am Herzen ankommende Perfusat auf 37 °C erwärmt war. Alle Leitungen und Verbindungsstücke waren aus Glas oder rostfreiem Stahl angefertigt, um eine unerwünschte Aufnahme oder Abgabe von Gas auf dem Zuleitungsweg zu vermeiden; der gemessene PO_2 der hypoxischen Perfusionslösung beträgt nach diesem Vorgehen ca. 9-10 mmHg in der Aorta und ist damit im terminalen Gefäßbett nahe null (Beckerath et al., 1991). Das perfundierte Herz wurde seinerseits in ein Überlaufgefäß getaucht und schwamm damit im aus dem *Sinus coronarius* austretenden Effluat.

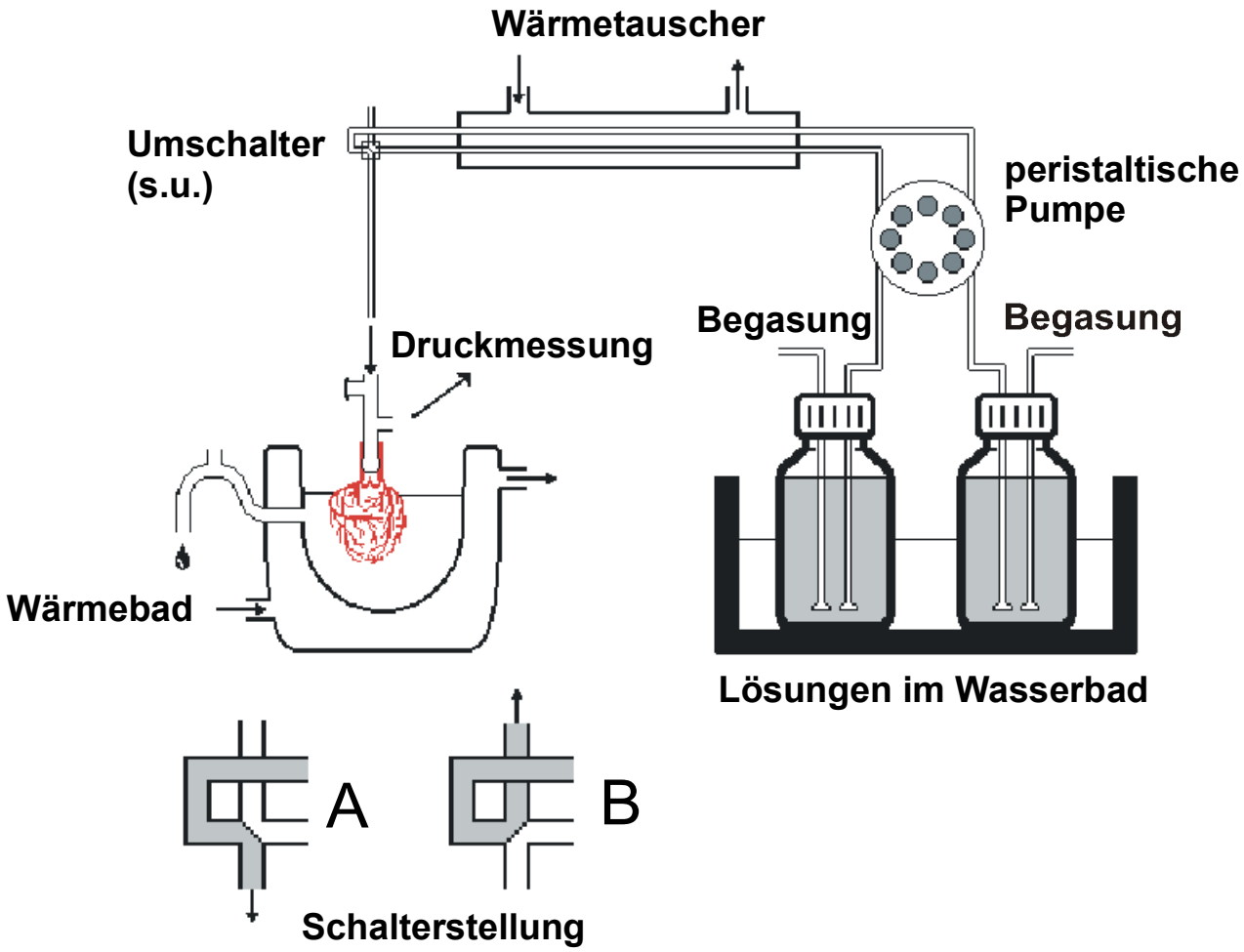


Abb. 5: *Versuchsaufbau für alle Experimente: retrograde flusskonstante Perfusion mit saliner Lösung durch peristaltische Pumpe; Wechsel zwischen verschiedenen Lösungen durch Änderung der Schalterstellung von A auf B möglich. Wärmetauscher, Wärmebad und Wasserbad sind mit dicken Plastikschläuchen untereinander verbunden, das darin zikulierende Wasser hat eine Temperatur von 37° C. Das Mäuseherz schwimmt im Effluat der Perfusionslösung, das aus dem Truncus pulmonalis austritt. Über Glasleitungen werden die vorgewärmten Lösungen mit sauerstoffreichem oder hypoxischem Gas äquilibriert und weiter zur Aortenkanüle geleitet. Dort wird an einem Schenkel der koronare Perfusionsdruck mittels Druckwandler gemessen und von dort zum Computer weitergeleitet.*

Der Wärmetauscher, das Wasserbad für die begasten Lösungen und das doppelwandige gläserne Wärmebad des Herzens waren durch großlumige, dickwandige Schläuche miteinander verbunden, in denen 37° C warmes Wasser zirkulierte. Das Herz war während des Experiments im ständig aus dem *Sinus coronarius* austretenden Effluat eingetaucht, wodurch eine konstante Temperatur von Herz und Perfusat (37° C) gewährleistet war. Außerdem wurde durch diese Maßnahme der Gewebedruck im Herzen erhöht und ein transkapillarer Flüssigkeitsaustritt mit Ödembildung verhindert (Döring u. Dehnert 1985).

Eine peristaltische Pumpe bewerkstelligte den Transport der Lösungen zum Umschalter hin. Um die Artefakte, die sich bei Schlauchpumpen in Form von welligen Druckschwankungen zwangsläufig ergeben, zu minimieren, wählten wir ein Modell, das den jeweiligen Kanal vor den Pumprollen aufteilt und auf zeitlich versetzt laufende Pumpköpfe leitet. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde so verbessert. Die Flussrate betrug zwischen 1,5 und 2,5 ml/min. und konnte stufenlos geregelt werden.

Tierhaltung

Die Organentnahmen wurden an männlichen und weiblichen Mäusen verschiedener Tierstämme mit Gewichten von 25-45 g vorgenommen. Es wurden jeweils sechs bis zehn Tiere in einem Käfig unter bestmöglichen Bedingungen (Raumtemperatur, normale Luftfeuchtigkeit) gehalten, Futter und Wasser erhielten die Versuchstiere bis zum Beginn des Experiments. Die durchgeführten Organentnahmen wurden monatlich dem zuständigen Veterinäramt gemeldet.

Perfusionslösungen

Perfundiert wurde bei Experimenten am stillgelegten Herzen mit folgender Lösung (Angaben in mM / l):

NaCl	**105**
$MgCl_2$	**0,8**
$CaCl_2$	**1**
KCl	**15**
NaH_2PO_4	**1**
$NaHCO_3$	**24**
Glucose	**10**

Außerdem enthielten alle Lösungen 2 mM Natrium-Pyruvat, welches vom Herzen direkt verstoffwechselt werden kann und daher die Erholung beschleunigt, und 10µM N-ω-Nitro-L-Arginin, ein spezifischer und irreversibler Hemmer der EDRF-Synthese, wodurch der Ausgangsdruck erhöht war und die Effekte klarer erkennbar wurden, ohne verfälscht zu werden.

Präparation

Zunächst wurden Mäuse mit einem Körpergewicht von 25 bis 40 g durch eine intraperitoneale Injektion mit gelöstem Urethan (Sigma) narkotisiert (1,5 mg/g Körpergewicht). Außerdem erfolgte eine Vollheparinisierung mit 20 IE Liquemin je Maus, um die Bildung von Mikrothromben im terminalen Gefäßsystem zu inhibieren. Sobald der Kornealreflex erloschen war, wurde mit der Organentnahme begonnen. Die Tiere wurden mit dem Rücken auf einer Gummimatte befestigt, indem sie mit ausgestreckten Extremitäten durch Stecknadeln in den Pfoten an ihr fixiert wurden. Nun wurde das Fell über dem *Processus xyphoideus* mit wenigen Schnitten abpräpariert und der Torso durch einen Längsschnitt unterhalb des Rippenbogens sowie je einen Schnitt lateral der Knorpel-Knochen-Grenze eröffnet; unter vorsichtigem Anheben der Brustwand wurde das *Diaphragma* durchtrennt und die nun mobilisierte vordere Rumpfwand nach kranial weggeklappt. Damit lag der Brust- und obere Bauchsitus frei.

Jetzt wurde die Aorta im unteren Brustraum auf der Wirbelsäule aufgesucht. Hier wurde sie mit einer Pinzette möglichst weit kaudal ergriffen und vorsichtig nach kranial gelöst. Dabei wurde darauf geachtet, während der Präparation möglichst weit herzfern zu bleiben, um Läsionen zu vermeiden. Um die Ischämietoleranz zu erhöhen, gab ich aus einer bereitstehenden Spritzflasche auf den Situs etwas gekühlte (Kühlschranktemperatur, ca. 10 °C) 15mM K-Lösung, bevor die Feinarbeit begonnen wurde. Nach dem vorsichtigen Freipräparieren und Mobilisieren der Aorta wurde mit wenigen Schnitten von kranial nach kaudal das Herz mitsamt der anhängenden Lungenteile herausgetrennt. Dabei wurde versucht, die anliegenden Gefäße zu schonen, um keine unnötigen Blutungen hervorzurufen, die die Sichtverhältnisse extrem verschlechtert hätten. Nun wurde das isolierte Herz-Lungen-Paket in einem mit gekühlter (ca. 10 °C) 15mM K-Lösung gefüllten Gefäß geschwenkt, wobei ein Großteil des Restblutes aus dem immer noch schlagenden Herzen gepumpt wurde. Jetzt legte ich das Herz in die ebenfalls mit gekühlter (ca. 10 °C) 15mM K-Lösung gefüllte Präparationskammer (Abb. 6).

Diese Präparationskammer bestand aus einer doppelwandigen Plexiglasschale mit 9 cm Durchmesser, war mit einer Überlaufdrainage ausgestattet und an eine Absaugpumpe angeschlossen. Ins Innere der Präparationsschale ragte ein Dorn, an dessen hinterem Ende die

Aortenkanüle aufgesteckt wurde. An der seitlichen Öffnung war über einen Silikonschlauch und Glasröhren die Perfusion (s.u.) angeschlossen; aus der vorderen Öffnung floss die Perfusionslösung hervor.

Die noch anhängenden Lungen wurden entfernt und die Aorta herznah freigelegt. Dann erfolgte das Durchschneiden im oberen Bereich der *Aorta ascendens*, der distale Rest des Gefäßes wurde verworfen. Ich zog den übrig gebliebenen Aortenstumpf wenige Millimeter über die Kanüle und hielt das Herz ca. 1 min. in dieser Position. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Herz mit einer 60 cm höher hängenden carbogenbegasten (95% O_2, 5% CO_2) 15mM K-Lösung druckkonstant perfundiert. Dabei befreite sich das Herz endgültig vom Restblut und der Stoffwechsel konnte

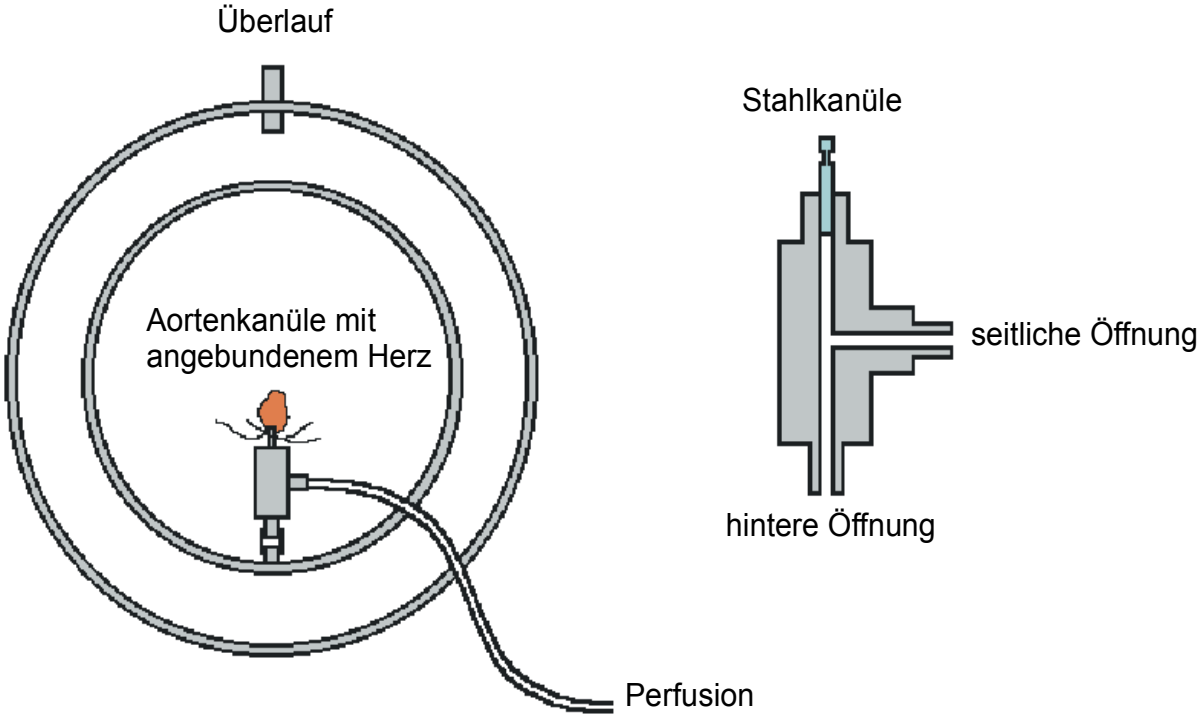


Abb. 6: *Präparationsschale mit aufgesteckter und mit dem voderen Bereich in das Zentrum weisender Aortenkanüle. Die Kanüle wurde mit Hilfe eines Plastikschlauchstücks an einem Dorn an der inneren Wandung der doppelwandigen Präparationsschale befestigt. In das vordere Kanülenende ist eine Stahlkanüle eingearbeitet, die wiederum an ihrem vorderen Ende eine Fräsung aufweist. An die seitliche Öffnung ist die druckkonstante Perfusion angeschlossen, später wird über die seitliche Öffnung der coronare Perfusionsdruck gemessen und über die hintere Öffnung flusskonstant perfundiert.*

sich erholen. Zum Anbinden des Aortenstumpfes an die Aortenkanüle wurde die Perfusion gestoppt; bereits in Schlingen um die Kanüle gelegte Fäden wurden mit Hilfe zweier Pinzetten nacheinander über die auf das Kanülenende aufgezogene Aorta geschoben und festgezogen. Daraufhin wurde die Perfusion sofort wieder freigegeben. Jetzt konnte ohne Zeitdruck das noch vorhandene Fett- und Bindegewebe sowie noch anhängende Gefäßteile abpräpariert werden. Die Aortenkanüle mit dem daran festgebundenen Herz wurde nun rasch und ohne Ausübung von starken Scherkräften vom Dorn der Präparationskammer gelöst und mit dem freien hinteren Ende an die Perfusionsapparatur angehängt, aus der schon flusskonstant Perfusat tropfte. Erst jetzt wurde die druckkonstante Perfusion abgenommen. Aus dem T-Schenkel floss dann ein Teil der flusskonstanten Perfusion heraus, womit das Risiko einer Luftembolie niedrig gehalten wurde. An die nun frei gewordene seitliche Öffnung wurde ein Gummischlauch befestigt, der über einen Druckwandler die Druckmessungen registrierte und an den Computer sowie den zur Kontrolle parallel geschalteten Druckschreiber weiterleitete.

Die elektronische Erfassung der Messdaten erfolgte mit Hard- und Software der Firma Axon Instruments, inc., die grafische Verarbeitung mit Origin und Corel Draw; die statistische Auswertung mit Matheass.

Versuchsbeginn

Nachdem die Herzen für 10 Minuten an der Kanüle angebunden noch in der Präparationskammer druckkonstant perfundiert worden waren (Abb. 7), wurde die Kanüle mit dem daran befindlichen Herzen schnell an die flusskonstante Perfusion angeschlossen. Von diesem Zeitpunkt an wurde der koronare Perfusionsdruck am T-Stück gemessen.

Zu Beginn konnte ein Anstieg des koronaren Perfusionsdrucks beobachtet werden, bis sich nach ca. 15 Minuten ein "steady state" eingestellt hatte. Normalerweise hatte der Perfusionsdruck dann einen Wert von 80 bis 100 mmHg erreicht, bei Drücken unter 50 mmHg wurden die Herzen als nicht geeignet verworfen. Nach einer Latenzzeit von drei Minuten wurde für drei Minuten mit hypoxischer (95% N_2, 5% CO_2) Lösung perfundiert, um eine hypoxische Vasodilatation auszulösen. Wenn diese zu beobachten und der Druck dabei um mindestens 40% gesunken war, konnte ich davon ausgehen, dass das Herz durch die Präparation nicht zu stark vorgeschädigt und damit geeignet war und auch richtig perfundiert wurde (eine Hauptschwierigkeit war das korrekte Anbinden an das richtige Gefäß, die Aorta und nicht den *Truncus pulmonalis*. Ein Fehler in dieser Phase konnte hier durch das Ausbleiben der Vasodilatation aufgedeckt werden). Danach wurde das Herz wieder mit sauerstoffgesättigter Lösung perfundiert, bis der Ausgangsdruck wieder erreicht war.

Nun begann ich, die Flussrate für jeweils eine Minute um einen konstanten Wert zu senken. Dabei zeigte sich an den mit N-ω-Nitro-L-Arginin-haltiger Lösung perfundierten Herzen, dass bei sehr hohen und sehr niedrigen Flussraten die Druckänderungen klein und unregelmäßig waren, während im tief-mittleren Bereich gleich bleibende und große Abstufungen zu sehen waren. Dies galt auch für die Effekte verschiedener vasodilatatorisch wirksamer Substanzen wie z.B. Adenosin, und auch für die hypoxische Vasodilatation. Innerhalb dieses linearen Bereiches wählte ich für meine Experimente diejenige Flussrate aus, bei der die Flussrate und der daraus resultierende Druck im niederen Bereich verglichen mit dem Ausgangsdruck - in der Regel war das zwischen 50 und 60 mm Hg - lag. So wurde bei optimaler Visualisierung der Druckänderungen einer zu hohen Druck- und Volumenbelastung des Herzens, was im Laufe der Experimente zur ödematösen Schwellung des vortraumatisierten Herzens und damit zu einer Verfälschung der Meßergebnisse führen kann, maximal vorgebeugt. Nach einer erneuten Latenz

von mindestens drei Minuten im "steady state" wurde ein weiteres Mal für drei Minuten mit hypoxischer Lösung perfundiert, um die als Referenz geltende maximale hypoxische Vasodilatation der Gefäße des betreffenden Herzens für die von nun an konstante Flussrate zu bestimmen, und danach wieder auf normoxische Lösung umgeschaltet. Nach dem Erreichen des Ausgangsdruckes wurde mit den eigentlichen Experimenten begonnen.

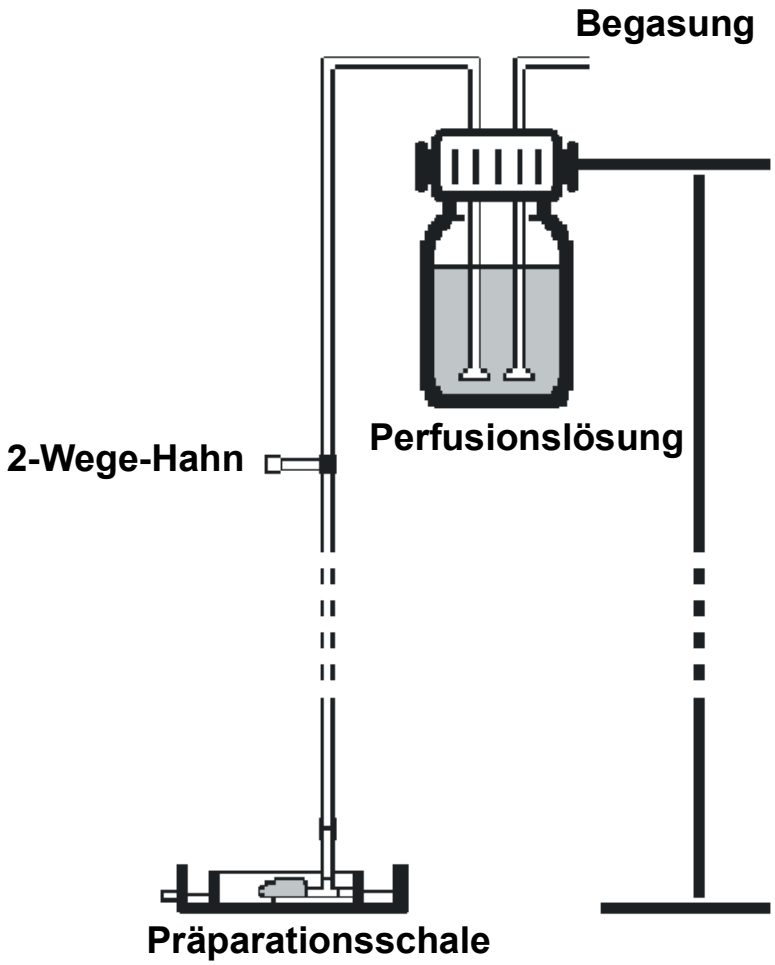


Abb. 7: *druckkonstande Perfusion zu Beginn der Versuche im Anschluss an die Präparation: aus einem 60 cm höher stehenden Gefäß wird das Herz über die Schwerkraft mit saliner, sauerstoffreicher Lösung perfundiert. Dieser Zustand wurde für 10 Minuten beibehalten, danach wurde das Herz an die eigentliche Versuchsapparatur angeschlossen.*

Statistik

Anzahl der Herzen: insgesamt wurden 89 Mäuseherzen untersucht. Davon waren 83 zu Beginn des Experiments mit NNA vorbehandelt. Alle Herzen wurden durch Erhöhung der Kaliumkonzentration im Perfusat von 4 mM auf 15mM stillgestellt (kardioplege Lösung).

Mittelwert und Standardabweichung: alle Resultate sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte (arithmetisches Mittel) ± Standardabweichung angegeben. Das arithmetische Mittel errechnet sich aus dem Quotienten der Summe aller Beobachtungen und der Anzahl dieser Beobachtungen.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Student's t-Test überprüft.

4 Ergebnisse

Die gefäßerweiternde Wirkung von CGRP wird über ATP-sensitive Kaliumkanäle vermittelt

Durch Perfusion mit hypoxischer Lösung wird am isoliert perfundierten Herzen eine maximale Vasodilatation ausgelöst. Der verbleibende Druck ist auf den Widerstand der Kapillaren zurückzuführen. Bei flusskonstanter Perfusion (Perfusionsrate: 1,3 bis 1,7 ml/min) mit normoxischer Lösung wurde am isolierten Mäuseherzen ein koronarer Perfusionsdruck zwischen 70 und 100 mmHg erreicht. Bei Perfusion mit hypoxischer Lösung stellte sich die erwartete maximale Vasodilatation (in der Regel innerhalb von drei Minuten ein "steady state") ein, der koronare Perfusionsdruck war dann um 42,36 ± 7,27 mmHg bzw. auf 27,65 ± 6,08 % des Ausgangsdrucks gesunken (n=44). Dann wurde wieder mit normoxischer Lösung perfundiert, worauf der koronare Perfusionsdruck einen steilen Anstieg nahezu auf seinen Ausgangswert zeigte. Nach Wiedererreichen des Ausgangsdrucks wurde CGRP in einer Konzentration von 100 nM über einen Zeitraum von fünf Minuten appliziert - innerhalb dieses Zeitraums war stets ein „steady state“ erreicht. CGRP verursachte dabei eine Verminderung des Druckes auf 38,23 ± 3,99 % relativ zum Ausgangsdruck, die in ihrer Amplitude der durch Hypoxie ausgelösten Vasodilatation zu 96,38 ± 2,01 % entsprach (n=9). Die Latenzphase bis zum Erreichen eines „steady state“ war dabei etwa doppelt so groß wie bei Hypoxie, das bedeutet, die maximal durch CGRP auslösbare Vasodilatation tritt zwar nahezu vollständig, jedoch wesentlich langsamer ein (Abb. 8). Um die mögliche Beteiligung von ATP – sensitiven Kaliumkanälen zu überprüfen, wurde der Versuch erneut durchgeführt und nach dem Erreichen der vollständigen Vasodilatation durch CGRP zusätzlich Glibenclamid in einer Konzentration von 2 µM hinzugegeben. Glibenclamid ist ein Sulfonylharnstoffderivat, das in dieser Konzentration selektiv die ATP – sensitiven Kaliumkanäle blockiert. Sofort war ein steiler Anstieg des koronaren Perfusionsdrucks zu beobachten, bis nach wenigen Minuten der Ausgangsdruck wieder erreicht war. In einem anderen Versuch wurde gleichzeitig CGRP in 100 nM und Glibenclamid in 2µM Konzentration gegeben, ohne dass zuvor eine Vasodilatation durch CGRP ausgelöst wurde. Dabei blieb der koronare Perfusionsdruck nahezu unverändert, die gleichzeitige

Gabe von Glibenclamid verhinderte also die Wirkung von CGRP. Da diese mit Hilfe von Glibenclamid nahezu vollständig reversibel war und in Anwesenheit von derselben Konzentration Glibenclamid keine Vasodilatation durch CGRP auslösbar war, ist anzunehmen, dass die K_{ATP}-Kanäle bei der Vasodilatation durch CGRP eine tragende Rolle spielen.

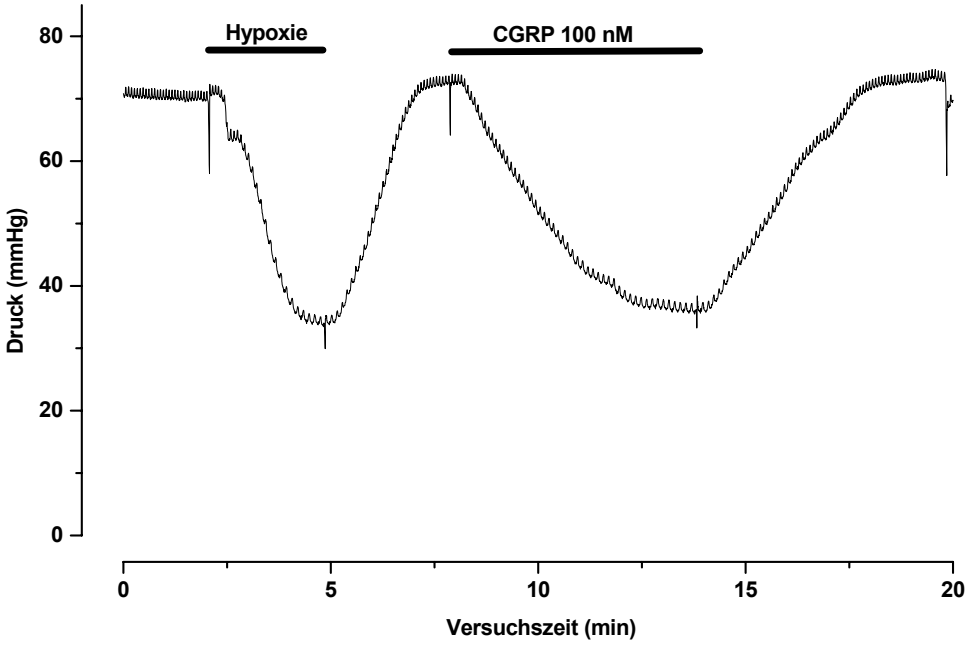


Abb. 8: *die dreiminütige Perfusion mit hypoxischer Lösung verursachte am isoliert perfundierten Herzen eine maximale Vasodilatation. 100 nM CGRP verursachten eine submaximale Vasodilatation mit einer Latenz von 5 Minuten. Die Wellenform der Kurven ist als Artefakt durch die Pumpen-Peristaltik zu erklären..*

Die gefäßerweiternde Wirkung von Adrenomedullin wird über ATP-sensitive Kaliumkanäle vermittelt und weist eine große Ähnlichkeit zu derjenigen von CGRP auf.

Wie eingangs beschrieben, vermutet man einen eng verwandten Wirkmechanismus von CGRP und Adrenomedullin, möglicherweise über denselben Rezeptor. Ich führte daher dieselben Versuche mit Adrenomedullin durch wie zuvor mit CGRP. Zunächst untersuchte ich die Reaktion auf Applikation von 100 nM Ardenomedullin. Dabei konnte ein submaximaler Druckabfall um 95,22 ± 3,09 % relativ zur Hypoxie und auf 38,97 ± 4,59 % relativ zum Ausgangsdruck beobachtet werden, der dem durch 100 nM CGRP ausgelösten Abfall des koronaren Perfusionsdrucks hinsichtlich der Latenz und der Amplitude sehr ähnlich war (n=7) (Abb. 9). Auch der durch Adrenomedullin ausgelöste Druckabfall war durch zusätzliche Applikation von 2 µM Glibenclamid nahezu vollständig reversibel und in Anwesenheit von derselben Konzentration Glibenclamid nicht auslösbar (Abb. 11). ATP – sensitive Kaliumkanäle sind demnach auch hier entscheidend beteiligt; die Ähnlichkeit der Antwort zu derjenigen auf CGRP lässt einen engen Zusammenhang der jeweiligen Mechanismen vermuten.

Um die Ähnlichkeit des durch die beiden vasoaktiven Peptide ausgelösten maximalen Druckabfalls zu demonstrieren, führte ich einige Versuche mit beiden Stoffen am selben Herzen durch. Dabei wurde zunächst ein Abfall des koronaren Perfusionsdrucks durch 100 nM CGRP ausgelöst. Nach Erreichen des maximalen Druckabfalls wurde CGRP ausgewaschen, um danach Adrenomedullin in einer Konzentration von 100 nM zu geben. Hier bestätigte sich die Ähnlichkeit des Verhaltens der Koronargefäße hinsichtlich der Applikation beider Stoffe: die maximal ausgelöste Vasodilatation durch Adrenomedullin entsprach derjenigen durch CGRP zu nahezu 100% (Abb. 10).

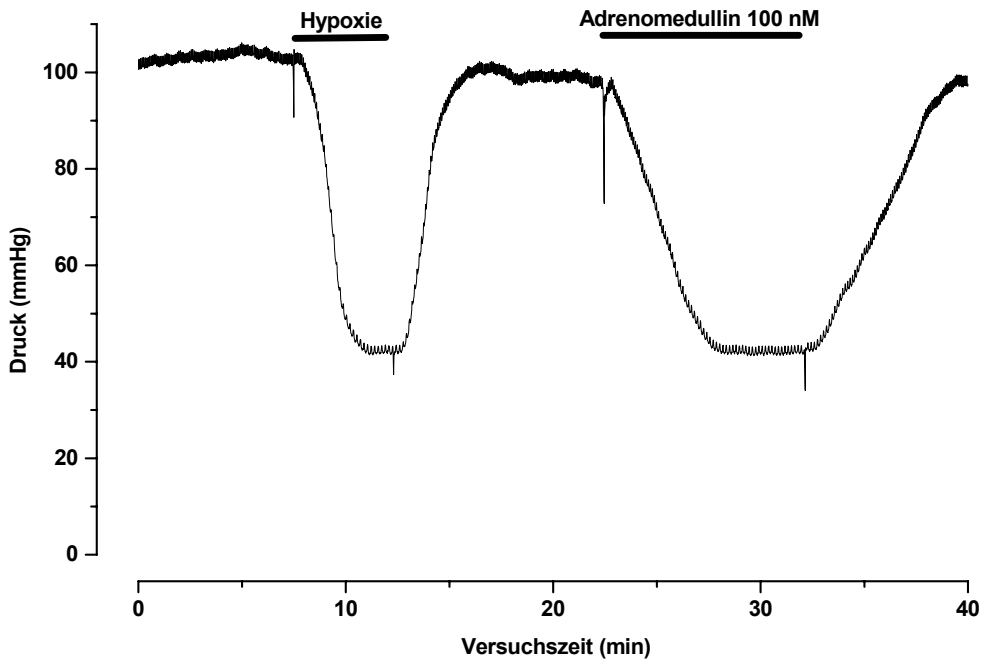


Abb. 9: *100 nM Adrenomedullin verursachen eine submaximale Vasodilatation mit einer Latenz von 5 Minuten.*

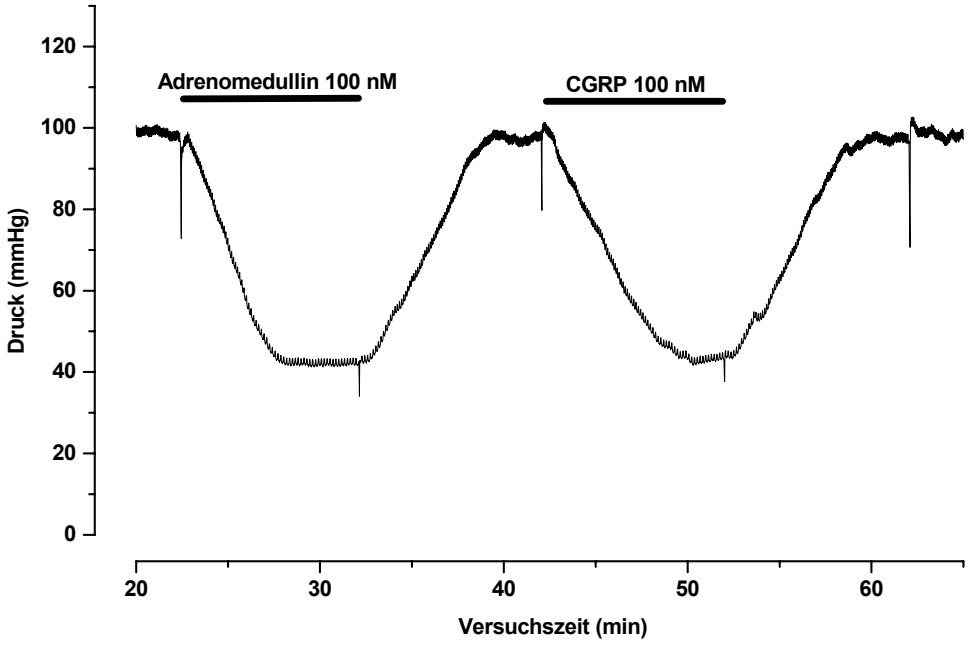


Abb. 10: *100 nM Adrenomedullin verursachen einen submaximalen Abfall des koronaren Perfusionsdrucks, der hinsichtlich Amplitude und Rückbildung sehr ähnlich ist. Die Untersuchungen in Abb. 9 und Abb.10 wurden am selben Herzen durchgeführt.*

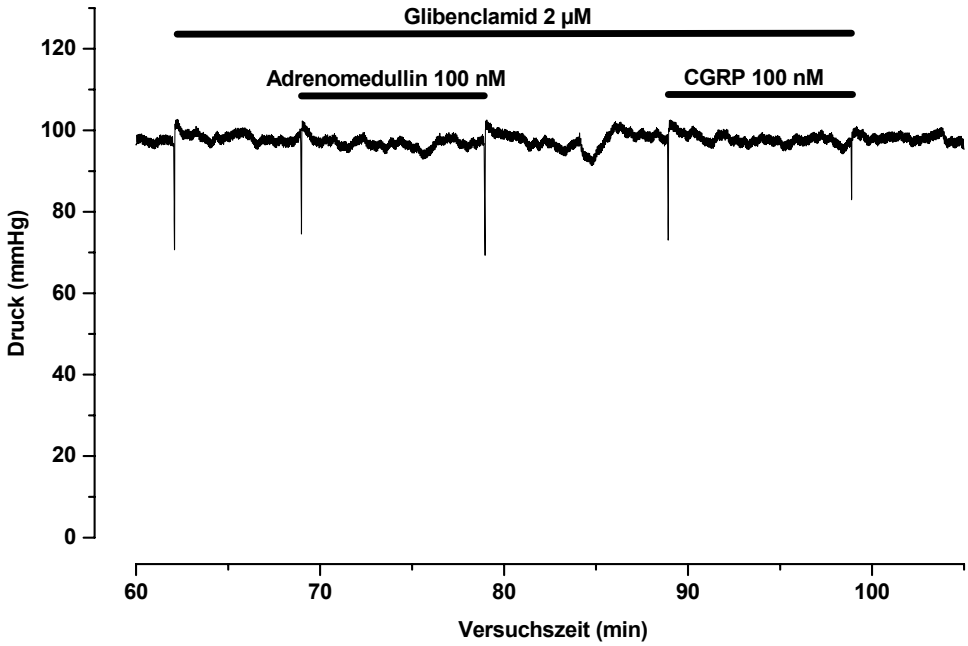


Abb. 11: *die Wirkung von 100 nM Adrenomedullin und von 100 nM CGRP war unter gleichzeitiger Gabe von 2 µM Glibenclamid nicht auslösbar.*

Die gefäßerweiternde Wirkung von PTHrP wird über ATP-sensitive Kaliumkanäle vermittelt.

PTHrP ist das jüngste Mitglied der Familie der vasoaktiven Peptide und dem entsprechend noch weitgehend ungenau charakterisiert und hinsichtlich seines Wirkmechanismus unaufgeklärt.
Die Applikation von 40 µM PTHrP verursachte einen Abfall des koronaren Perfusionsdrucks um 74 ± 3,4 % relativ zur zuvor ausgelösten maximalen hypoxischen Vasodilatation (n=5) (Abb. 12); dieser Effekt ließ sich durch weitere Erhöhung der Konzentration von PTHrP nicht weiter steigern. Auch dieser Druckabfall war unter Zugabe von 2 µM Glibenclamid nahezu vollständig reversibel und in gleichzeitiger Anwesenheit von derselben Konzentration Glibenclamid durch PTHrP nicht auslösbar (Abb. 13). PTHrP rief eine Vasodilatation hervor, die der durch CGRP ausgelösten Vasodilatation zu etwa zwei Dritteln, der durch Adrenomedullin ausgelösten Vasodilatation ebenfalls zu etwa zwei Dritteln entsprach. Hinsichtlich des qualitativen Kurvenverlaufs ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, auch hier erfolgte der Abfall des Perfusionsdrucks nach kurzer Latenz. Diese Latenz war wieder größer als die Latenz des hypoxischen Druckabfalls, wie dies schon bei CGRP und Adrenomedullin beobachtet werden konnte.

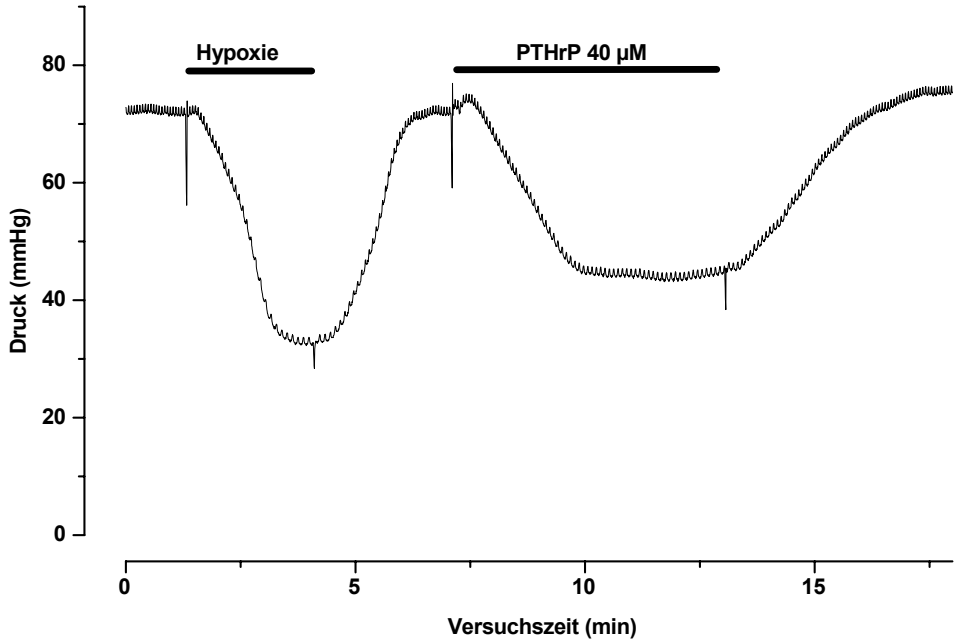


Abb. 12: *40 µM PTHrP verursachte eine Vasodilatation, die der hypoxischen Vasodilatation im Mittel zu 74 ± 3,4 % entspricht. Dieser Effekt war auch durch Dosissteigerung nicht mehr zu verstärken (nicht abgebildet).*

Um den Mechanismus der Signaltransduktion, die der Wirkung der untersuchten vasoaktiven Peptide zu Grunde liegt, weiter aufzuklären, wurden in einer weiteren Versuchsreihe an das isoliert perfundierte Herz 40 µM Sp-cAMP [S] appliziert. Sp-cAMP [S] ist ein membrangängiges cAMP-Analogon. Es imitiert den Effekt eines intrazellulären cAMP-Spiegel-Anstiegs und vermittelt dadurch eine Vasodilatation. Es ist bekannt, dass diese Wirkung über eine proteinkinase-abhängige Phosphorylierung zu Stande kommt. Der Verlauf der Vasodilatation hinsichtlich Latenz und Amplitude reproduzierte die K_{ATP}-vermittelte Vasodilatation. Die Applikation von 40 µM Sp-cAMP [S] rief einen Abfall des koronaren Perfusionsdrucks um 40,59 ± 6,54 mmHg bzw. 95,22 ± 3,09 % relativ zur Hypoxie und auf 38,97 ± 4,59 % relativ zum Ausgangsdruck hervor, die hinsichtlich Latenz und Rückbildung sowohl der durch 100 nM CGRP ausgelösten Vasodilatation als auch der durch 100 nM Adrenomedullin hervorgerufenen Vasodilatation sehr ähnlich war (Abb. 14) (n=3). Der vasodilatatorische Effekt von Sp-cAMP [S] war durch zusätzliche Applikation von 2 µM Glibenclamid vollständig reversibel und in Anwesenheit von derselben Konzentration Glibenclamid nicht auslösbar (Abb. 13 und Abb. 15).

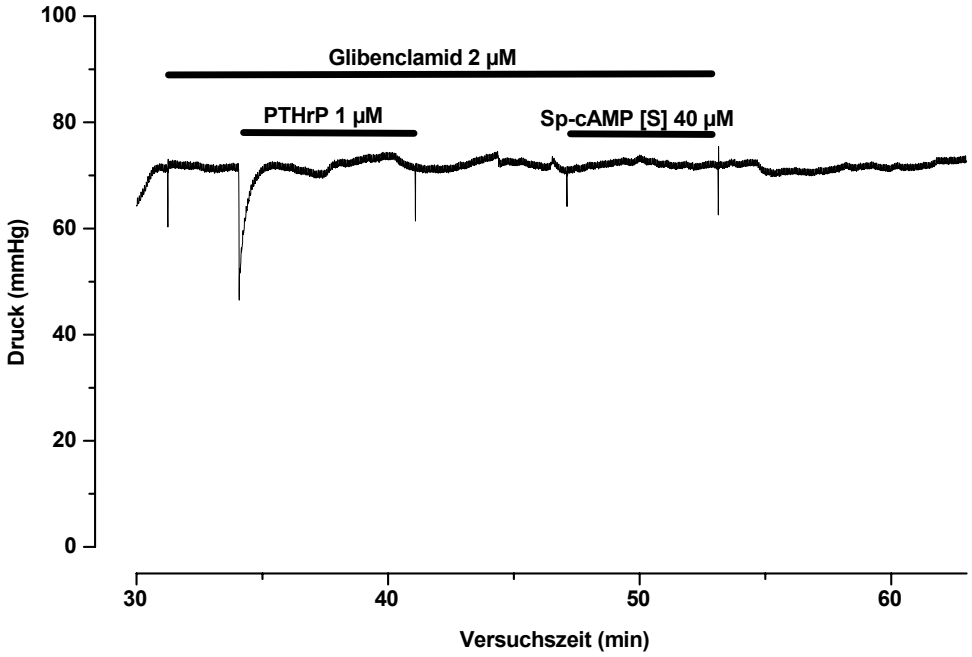


Abb. 13: *die Wirkung von PTHrP und von Sp-cAMP [S] ist bei gleichzeitiger Gabe von 2 µM Glibenclamid nicht auslösbar, die Versuche in Abb. 14 und Abb. 15 wurden am selben Herzen durchgeführt.*

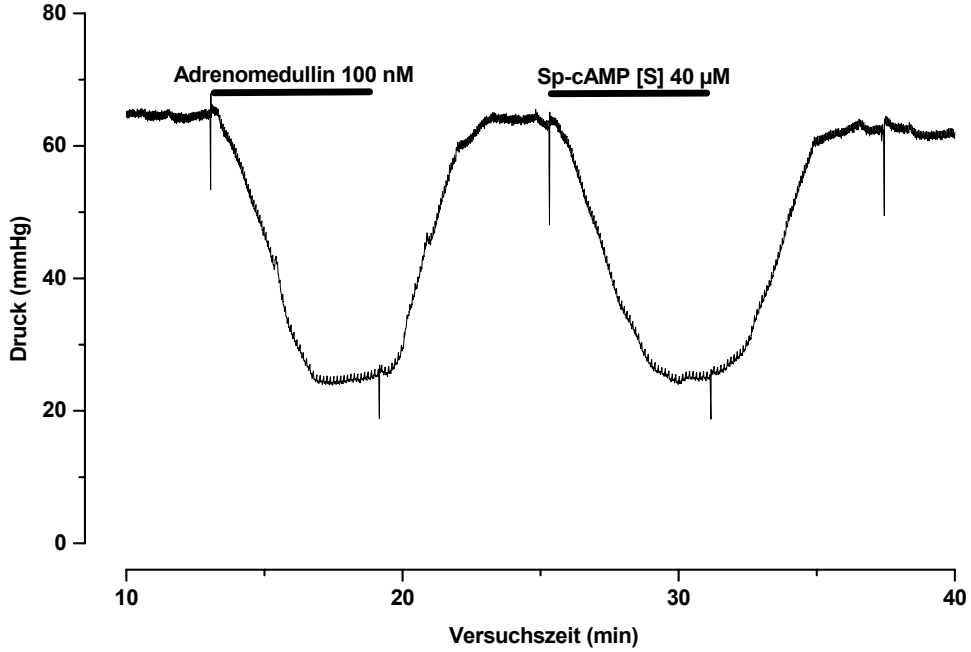


Abb. 14: *die durch Sp-cAMP [S] ausgelöste Wirkung weist eine große Ähnlichkeit zu der durch 100 nM Adrenomedullin ausgelösten Wirkung hinsichtlich Latenz und Amplitude sowie Rückbildung auf.*

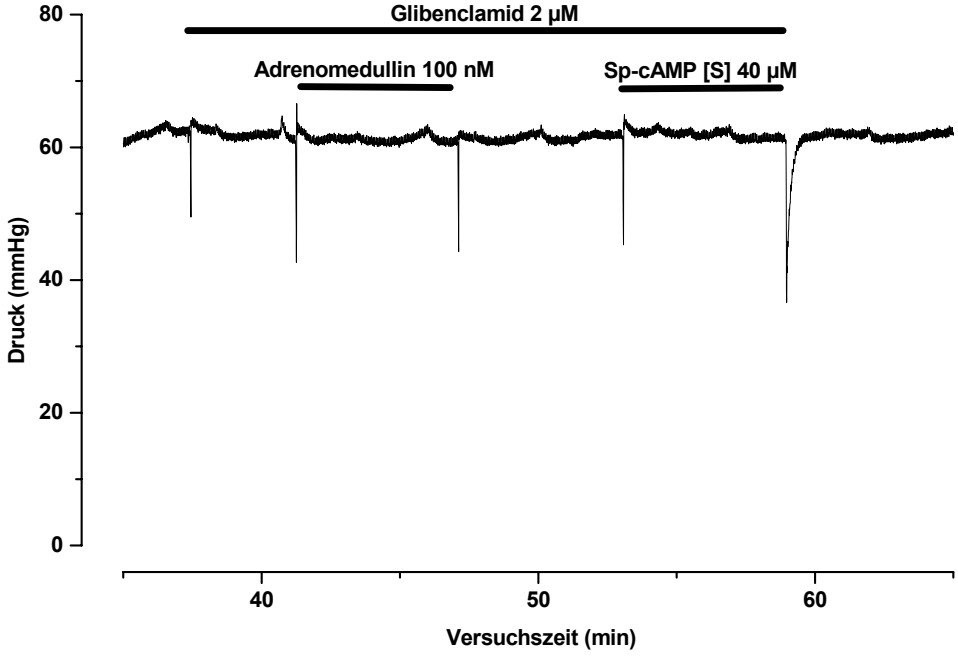


Abb. 15: *sowohl die Wirkung von Sp-cAMP [S] als auch die Wirkung von 100 nM Adrenomedullin sind, wie bereits zuvor gezeigt, in Anwesenheit von Glibenclamid nicht auslösbar. Die Versuche in Abb. 16 und Abb. 17 wurden am selben Herzen durchgeführt.*

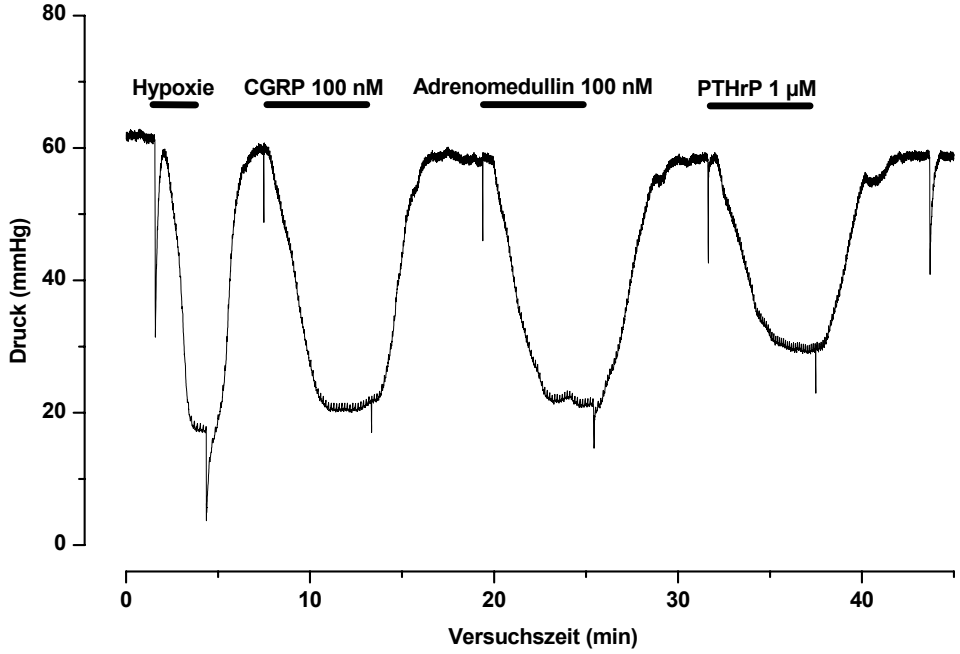


Abb. 16: *die vasoaktiven Peptide CGRP, Adrenomedullin und PTHrP verursachten einen Abfall des koronaren Perfusionsdrucks, der rasch reversibel war.*

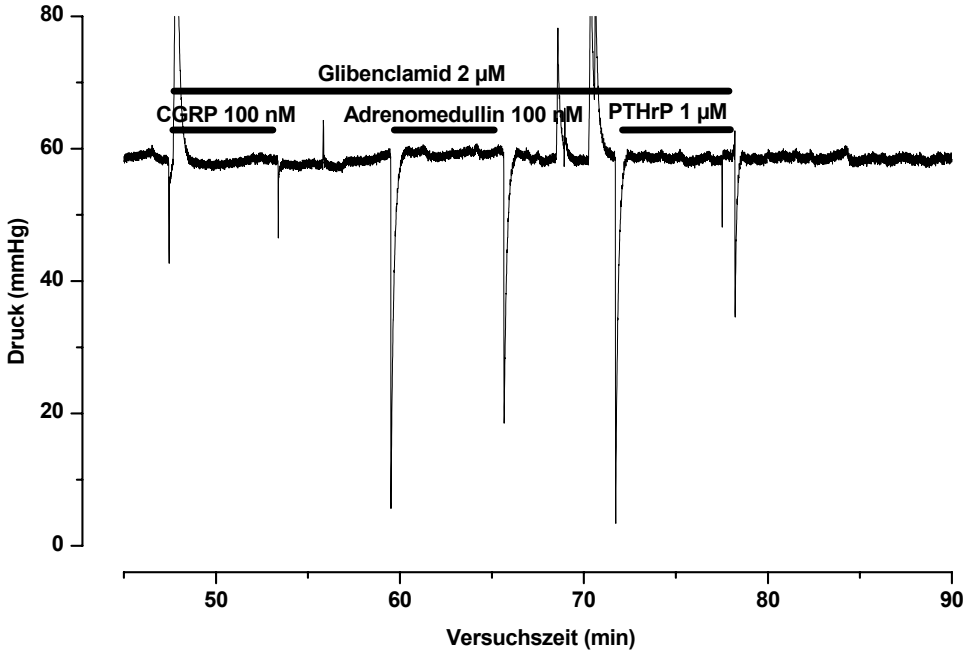


Abb. 17: *die Effekte von CGRP, Adrenomedullin und CGRP waren in Gegenwart von 2 µM Glibenclamid nicht asulösbar. Die massiven Ausschläge stellen Artefakte dar. Die Versuche in Abb. 18 und Abb. 19 wurden am selben Herzen durchgeführt.*

5 Diskussion

Die Untersuchungen wurden am isoliert perfundierten Mäuseherzen durchgeführt. Dieses in seinen Grundlagen auf Oscar Langendorff zurückgehende Verfahren erlaubt die Betrachtung und Interpretation von Vorgängen an einem ganzen Organ, das zudem von systemischen Einflussgrößen befreit ist. Man hat so eine – im Vergleich zu Einzelzell- und Einzelkanalmessungen – wesentlich globalere Sicht und kann die molekularbiologischen Vorgänge der Zelle in einer funktionellen Gesamtbetrachtung untersuchen. Die Methode stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zu den Einzelzell- und Einzelkanalmessungen dar.

Die Mäuseherzen ließen sich nach ihrer Entnahme unter dem Binokular sehr gut präparieren, der freigelegte Aortenstumpf konnte leicht an die vorbereitete Stahlkanüle befestigt werden. Die Perfusion mit auf 37° C vorgewärmter saliner Lösung erhielt die Herzen in der Regel vier bis sechs Stunden am Leben; der Lösungswechsel gestaltete sich durch die direkte Vorschaltung eines Umschalters problemlos und ohne nennenswerten Zeitverlust. Dabei waren stets klar abgrenzbare Umschaltartefakte in der grafischen Darstellung zu sehen, die den Lösungswechsel gut lokalisierten.

Die Etablierung des isoliert perfundierten Herzens am Modell der Maus kann einen wichtigen Schritt zur weiteren Erforschung der Biologie ATP-sensitiver Kaliumkanäle und auch anderer an der Gefäßregulation beteiligter Faktoren darstellen. So wäre es denkbar, mit Knock-out-Mäusen, denen das spezielle Gen für kardiale K_{ATP}-Kanäle fehlt, unter anderem die Effekte der vasoaktiven Peptide zu untersuchen. Würde bei solchen Mäusen die gefäßerweiternde Wirkung von CGRP, Adrenomedullin und PTHrP ausbleiben, wäre ein Beweis erbracht, dass die ATP-sensitiven Kaliumkanäle für deren Effekte unabdingbar sind.

K_{ATP}-Kanäle koppeln Metabolismus und Membranpotential der Zelle

ATP-sensitive Kaliumkanäle sind in vielen Geweben des menschlichen Körpers anzutreffen, so auch in glatten Gefäßmuskelzellen. Sie bestehen aus Oktameren mit je vier SUR- und vier Kir-Untereinheiten. Durch ihre Kanalpore können Kaliumionen nach extrazellulär diffundieren, somit ist das Membranpotential in hohem Maße von ihnen abhängig. Die Kanalpore wechselt in hoher Frequenz spontan vom offenen zum geschlossenen Zustand und umgekehrt. ATP kann den Kanal im geschlossenen Zustand stabilisieren, Proteinkinase A (PKA) hingegen stabilisiert den offenen Zustand des Kanals. Wenn nun die intrazelluläre ADP-Konzentration zunimmt, sinkt dem entsprechend die Wahrscheinlichkeit der K_{ATP}-Kanäle, im geschlossenen Zustand „angehalten“ zu werden. Die Adenylatzyklase ist im – G-Protein-vermittelten – aktivierten Zustand in der Lage, den ADP-Spiegel zu senken. Zusätzlich aktiviert sie die PKA, die wiederum den offenen Zustand des K_{ATP} -Kanals stabilisieren kann. Somit übt die Adenylatzyklase zweierlei Wirkungen aus, die dazu führen, dass K_{ATP} -Kanäle weniger oft geschlossen bleiben und häufiger offen gehalten werden. Dadurch wird der Metabolismus der Zelle modulatorisch für das Membranpotential: bei schlechtem metabolischem Zustand werden die Kanäle weniger oft in geschlossenem Zustand stabilisiert. Substanzen, die die Adenylatzyklase aktivieren, erhöhen aber nicht nur den intrazellulären ADP-Spiegel, sondern aktivieren zusätzlich die PKA.

Je mehr Kanäle im offenen Zustand stabilisiert werden, desto mehr Kalium kann die Kanalporen passieren. Weil die Kaliumkonzentration extrazellulär um ein Vielfaches kleiner ist als intrazellulär, fließen die Ionen nach extrazellulär. Dabei nähert sich das Membranpotential dem Gleichgewichtspotential von Kalium an, es wird positiver. Dadurch vermindert sich die Zahl der offenen spannungsabhängigen Kalziumkanäle in derselben Membran, womit der Kalziumeinstrom in die Zelle gedrosselt wird.

CRLR ist das Rezeptormolekül für CGRP und Adrenomedullin und wird durch RAMPs (Receptor Activity Modifying Proteins) reguliert.

Eine der Fragestellungen bezog sich auf die Rezeptoren für CGRP und Adrenomedullin. Bei beiden handelt es sich um vasoaktive Peptide. CGRP entsteht durch alternatives Spleißen als Produkt des Calcitonin-Gens, während Adrenomedullin aus einem Vorläufermolekül, dem Präproadrenomedullin, abgespalten wird. Die Untersuchungen zeigen, dass beide Peptide einen Abfall des koronaren Perfusionsdrucks bewirken und somit gefäßerweiternde Wirkung im koronaren Gefäßbett haben. Diese Wirkung ist am selben Herzen bei beiden Peptiden hinsichtlich Latenz, Ausbildung und Rückbildung nahezu gleich. Zudem ist die Wirkung beider Peptide durch Glibenclamid vollständig reversibel, bzw. in Gegenwart desselben nicht auslösbar. Glibenclamid ist ein in der bei den Experimenten stets gewählten Konzentration von 2µM/l spezifischer K_{ATP}-Kanal-Blocker. Dies deutet darauf hin, dass ATP-sensitive Kaliumkanäle sowohl für die Wirkung von CGRP, als auch für die Wirkung von Adrenomedullin eine wichtige Rolle spielen.

Um die Signaltransduktion und damit die Wirkung der Peptide zu verstehen, muss man sich mit den Rezeptoren beschäftigen, an denen sie ihre Wirkung entfalten. CGRP wirkt über Rezeptoren, die als CGRP 1 und CGRP 2 klassifiziert wurden. Es deutet jedoch alles darauf hin, dass ein gemeinsames Molekül für die Rezeptoren von CGRP und von Adrenomedullin existiert. Dieses postulierte Rezeptormolekül wird in der Literatur als „CRLR“ bezeichnet. Es kann unter Einflussnahme von RAMPs, so genannten Rezeptor-Aktivität modifizierenden Proteinen, entweder als CGRP-Rezeptor oder als Adrenomedullin-Rezeptor wirken. Für diese Hypothese würde sprechen, dass CGRP und Adrenomedullin eine sehr ähnliche Antwort an den Koronargefäßen im Sinne einer Erweiterung auslösen, die bei beiden durch Glibenclamid gehemmt wird. Die unterschiedliche Sensitivität für CGRP oder Adrenomedullin beruht auf dem zusammen mit CRLR in der Membran eingebauten RAMP. Die Signaltransduktion ist Aufgabe des CRLR-Anteils und damit bei CGRP und Adrenomedullin desselben Moleküls, was meine Ergebnisse ebenfalls bestätigen würden.

Die Signalransduktion der vasoaktiven Peptide CGRP und Adrenomedullin führt über Aktivierung der Adenylatzyklase zur PKA-vermittelten Öffnung der K_{ATP} -Kanäle.

Der Peptid-Rezeptorkomplex aktiviert die Adenylatzyklase indirekt, nämlich über G-Protein. Es gibt G-Proteine, deren α-Untereinheit auf die Adenylatzyklase hemmend wirkt (G_i), und solche, deren α-Untereinheit die Adenylatzyklase aktiviert (G_s). Nach Andockung des vasoaktiven Peptids am rezeptorassoziierten RAMP bindet ein G_s-Protein intrazellulär an CRLR. Am G-Protein folgt der Austausch von GDP gegen GTP, wodurch das G-Protein in einen aktiven Zustand versetzt wird. Dessen α-Untereinheit, die nun GTP trägt, wird dann von der βγ-Untereinheit abgespalten und aktiviert durch Andocken die Adenylatzyklase. Durch diese Aktivierung wird ATP zu ADP und cAMP umgewandelt. Dabei wird zum einen der intrazelluläre ADP-Spiegel erhöht, was die Offenheitswahrscheinlichkeit der K_{ATP}-Kanäle erhöht. Zusätzlich aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA) durch Bindung an deren regulatorische Untereinheit, wodurch die katalysierenden Untereinheiten aktiviert und abgespalten werden. Die aktiven katalysierenden Untereinheiten binden am K_{ATP}-Kanal und stabilisieren ihn in seiner geöffneten Phase durch Phosphorylierung. Einen schematischen Überblick über die geschilderten intrazellulären Abläufe bietet die Abbildung 20.

Das membrangängige cAMP-Analogon Sp-cAMP [S] kann direkt die Proteinkinase A aktivieren und damit die K_{ATP}-Kanäle über diesen einen Zwischenschritt aktivieren. Die dabei in den Experimenten gezeigte Vasodilatation entspricht dem durch CGRP und Adrenomedullin ausgelösten gefeäßerweiternden Effekt. Diese Imitation der Wirkung von CGRP und Adrenomedullin durch den direkten Aktivator der PKA ist ein weiterer starker Hinweis darauf, dass die vermutete Endstrecke der Wirkung von CGRP und Adrenomedullin cAMP und PKA sein könnte.

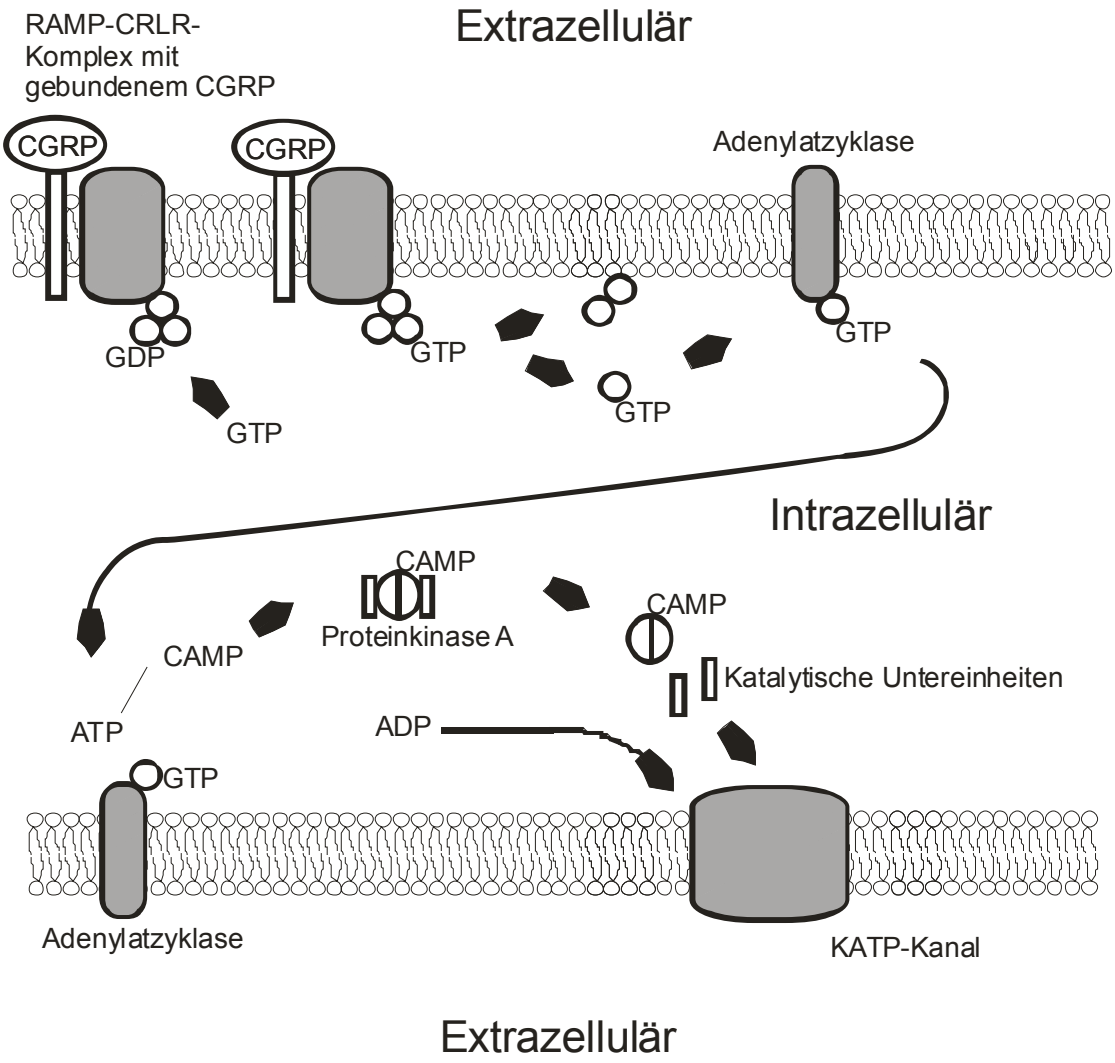


Abb. 20: *das vasoaktive Peptid (hier CGRP) dockt als Ligand am CRLR-assoziierten RAMP-Molekül an. Dadurch wird CRLR für den GDP-tragenden G-Proteinkomplex affin. Nach Bindung des G-Proteinkomplexes an CRLR dissoziiert GDP von der a-Untereinheit des G-Proteins ab, und GTP bindet im Austausch. Dies führt wiederum zur Aktivierung des G-Proteins und Abspaltung der GTP-tragenden a-Untereinheit. Sie bindet an die Adenylatzyklase, die ihrerseits dadurch aktiviert wird und ATP zu cAMP und ADP hydrolysiert. cAMP bindet an den regulierenden Teil von Proteinkinase A; dies führt zu deren Aktivierung, resultierend in Abspaltung der funktionellen, katalytischen Untereinheiten der PKA. Diese Untereinheiten binden intrazellulär an ATP-sensitive Kaliumkanäle und stabilisieren sie in ihrem offenen Zustand. Diesen stabilisierenden Effekt hat auch das in der Adenylatzyklase-Reaktion entstandene ADP.*

PTHrP führt zu Vasodilatation, die derjenigen von CGRP und Adrenomedullin in ihrer Amplitude zu weniger als 75 Prozent entspricht.

PTHrP, ein weiteres vasoaktives Peptid, zeigte in den Experimenten ebenfalls eine Gefäßerweiterung im koronaren Gefäßbett. Die vollständige Hemmbarkeit dieses Effekts durch Glibenclamid zeigt, dass auch hier die K_{ATP}-Kanäle unabdingbar involviert sind. Die im Vergleich zu CGRP und Adrenomedullin schwächere Antwort deutet jedoch darauf hin, dass hier weitere oder gar ganz andere Mechanismen eine Rolle spielen. So könnte PTHrP eine partiell antagonistische Wirkung am entsprechenden Rezeptor besitzen und damit seine eigene gefäßerweiternde Wirkung limitieren, ein denkbarer, jedoch wenig wahrscheinlicher Ansatz. Möglich wäre auch ein bisher nicht erforschter, weiterer Weg der Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen, der dem erwähnten Weg von CGRP und Adrenomedullin über cAMP und PKA allerdings unterlegen ist. PTHrP könnte auch verschiedene Rezeptoren ansprechen und so hemmende und aktivierende Prozesse in Gang setzen. Insgesamt betrachtet fehlen derzeit die Erkenntnisse, um die Wirkung von PTHrP aufzuklären. Die Experimente haben aber gezeigt, dass ATP-sensitive Kaliumkanäle für die Wirkung von PTHrP notwendig sind. Es ist eine G-Protein-gekoppelte Wirkweise wahrscheinlich. Offensichtlich ist die cAMP-Bildung aber nicht so ausgeprägt wie unter CGRP oder Adrenomedullin. Die Ursache für den kleineren Effekt ist unklar und wird weiter Gegenstand der Forschung sein.

Funktionelle Betrachtung und Ausblick: sind die vasoaktiven Peptide potenziell kardioprotektiv einsetzbar?

CGRP, Adrenomedullin und PTHrP sind die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen. Am Mäuseherzen war bei allen die gefäßerweiternde Wirkung im Koronarsystem zu beobachten. Es bleibt die Frage, ob dieser Effekt auch am menschlichen Organismus zu erwarten ist, und ob dieser Effekt auch therapeutisch nutzbar sein kann. Dazu muss man die getesteten Substanzen hinsichtlich ihrer physiologischen Plasmaspiegel und ihrer beobachteten Wirkungen betrachten.

Viele Gewebe sind zur Bildung von Adrenomedullin befähigt. Dazu gehören unter anderem das kardiovaskuläre System mit Endothelzellen und glatten Muskelzellen, die Mesangiumzellen und die glomerulären Epithelien in der Niere und die Epithelien im respiratorischen System. Adrenomedullin wird insbesondere bei vielen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems vermehrt gebildet, die mit erhöhtem Blutdruck einhergehen. Betrachtet man die in den Experimenten aufgetretene gefäßerweiternde Wirkung von Adrenomedullin in diesem Zusammenhang, dann könnte Adrenomedullin Teil der Homöostase des Blutdruckes sein und erhöhtem Blutdruck entgegen wirken. Interessant ist hierbei auch, dass der Adrenomedullin-Spiegel beispielsweise bei Präeklampsie, einer Erkrankung mit hohen Blutdruckwerten in der Schwangerschaft, vermindert ist. Das Fehlen von ausreichend Adrenomedullin könnte bei dieser Erkrankung eine Rolle spielen. Unklar bleibt in den meisten Fällen, ob die erhöhten bzw. verminderten Spiegel konsekutiv oder ursächlich in der Pathophysiologie der Erkrankungen sind. Auf jeden Fall wirkt Adrenomedullin erhöhtem Blutdruck entgegen und könnten in der medikamentösen Blutdrucksenkung einmal eine Rolle spielen.

CGRP wirkt wie Adrenomedullin vasodilatatorisch. Bildungsort sind vorwiegend das periphere und das zentrale Nervensystem. Gewöhnlich bewegen sich die Plasmaspiegel in sehr niedrigen Bereichen. Elektrostimulation von gefäßnahen Nerven führt zu lokal erhöhter Konzentration an CGRP, zudem finden sich hier Rezeptoren für Entzündungsmediatoren wie Histamin und Bradikinin. Deren Ausschüttung könnte die CGRP-Bildung weiter stimulieren (Brain et al., 1996). Entsprechend werden bei Entzündungsvorgängen auch lokal erhöhte CGRP-Spiegel

gemessen. Weiterhin steigt der Plasmaspiegel von CGRP z.B. bei Sepsis und nach Myokardinfarkt an. Die gefäßerweiternde Wirkung von CGRP ist vermutlich ebenso wie Adrenomedullin in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen ein lokal wichtiger Faktor und könnte bei weiterer Aufklärung ihrer Wirkweise eine therapeutische Bedeutung bei Zuständen mit Minderperfusion erlangen.

PTHrP wird vorwiegend von den Nebenschilddrüsen gebildet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch andere Gewebe an der Bildung dieses Peptids beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem auch die glatten Muskelzellen im kardiovaskulären Bereich. Die in den Experimenten gezeigte gefäßerweiternde Wirkung wurde schon vor längerer Zeit demonstriert (Nickols et al., 1989; Tucci et al., 1996). Die Erkenntnisse über PTHrP lassen noch keine weiteren Schlüsse zu, da der Wirkmechanismus noch weitgehend unbekannt ist. Dennoch lassen auch hier die gefäßerweiternden Effekte eine zukünftige therapeutische Rolle von PTHrP möglich erscheinen.

Die Experimente mit den vasoaktiven Substanzen CGRP, Adrenomedullin und PTHrP haben zusammenfassend gezeigt, dass diese Stoffe sehr potente Vasodilatatoren sind. Zumindest die Peptide CGRP und Adrenomedullin wirken über eine intrazelluläre Kaskade durch Aktivierung von G-Proteinen, der Adenylatzyklase und der Proteinkinase A und bewirken die Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen. Sie entfalten ihre Wirkung also letztendlich über eine Änderung des elektrischen Potentials über der Plasmamembran der glatten Gefäßmuskelzelle. Damit sind sie in die Kopplung und Interaktion von Metabolismus und Elektrophysiologie der Zelle eingebunden.

In ischämischen Bereichen des Herzens kommt es zu einer K_{ATP}-vermittelten Kopplung des dort beeinträchtigten Metabolismus mit dem Membranpotential der Zelle, mit dem Ergebnis der Relaxation der Gefäßmuskelzellen und damit der Vasodilatation. Experimentell lässt sich dieser Effekt durch hypoxische Perfusionslösungen darstellen. Die Beteiligung der K_{ATP}-Kanäle an diesem Vorgang ist durch die Hemmbarkeit des vasodilatativen Effekts durch Glibenclamid gesichert. Bisher sind in der Kardiologie als Vasodilatanzien vorwiegend Stoffe im Einsatz, die über Abspaltung von Stickstoffmonoxid (NO) oder Verstärkung dessen Ausschüttung wirken. Die in dieser Arbeit untersuchten Peptide dagegen bewirken nach bisherigem Kenntnisstand keine NO-Freisetzung und würden so ein völlig anderes Therapiekonzept darstellen. Ob und

inwieweit die vasoaktiven Peptide in Zukunft eine Rolle in der Pharmakotherapie des ischämischen Herzens eine Rolle spielen werden, kann zu Zeit noch nicht abgeschätzt werden. Wohl aber ist die Hoffnung berechtigt, dass dies eines Tages nach intensiver Forschung auf diesem Gebiet der Fall sein kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JPT, Boyd AE, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA: Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science 1995, 268: 423-426.
2. Akinboboye OO, Idris O, Chou RL, Sciacca RR, Cannon PJ, Bergmann SR: Absolute quantitation of coronary steal induced by intravenous dipyridamole. J Am Coll Cardiol 2001, 37 (1): 109-116
3. Ashford ML, Boden PR, Treherne JM: Tolbutamide excites rat glucoreceptive ventromedial hypothalamic neurones by indirect inhibition of ATP-K+ channels. Br J Pharmacol 1990, 101(3): 531-540.
4. Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J: Two regions of sulfonylurea receptor specify the spontaneous bursting and ATP inhibition of KATP channel isoforms. J Biol Chem 1999, 274 (17): 11587-92.
5. Bassingthwaighte JB: Interstitial adenosine: the measurement, the interpretation. J Mol Cell Cardiol 1992, 24: 337-346.
6. Beckerath N, Cyrys S, Dischner A, Daut J: Hypoxic vasodilatation in isolated, perfused guinea-pig heart: an analysis of the underlying mechanisms. J Physiol 1991, 442: 297-319
7. Berne RM: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible regulation in coronary blood flow. Am J Physiol 1963, 204: 317-322.
8. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 1985, 313 (5997): 54-56
9. Brain SD, Cambridge H: Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. Gen Pharmac 1996, 27 (4): 607-611
10. Berne RM: The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. Circ Res 1980, 47: 807-813.
11. Bryan J, Aguilar-Bryan L: Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. Biochem Biophys Acta 1999, 1461 (2): 285-303.
12. Buffington CW: No coronary dilation: no coronary steal. Anesthesiology 1991, 75 (2): 376-377.

13. Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF: 1996. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular K_{ATP} channels. Diabetes 1996, 45: 1439-1445.
14. Clapp LH, Gurney AM: ATP-sensitive K+ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol 1992, 262 (3): H916-H920.
15. Cook DL, Hales CN: Intracellular ATP directly blocks K+ channels in pancreatic B-cells. Nature 1984, 311 (5983): 271-273.
16. Cooper CW: Parathyroid hormone-related protein and its role in pregnancy, lactation, and neonatal growth and development. Eur J Endocrinol 1997, 136 (5): 465-466.
17. Cui Y, Giblin JP, Clapp LH, Tinker A: A mechanism for ATP-sensitive potassium channel diversity: Functional coassembly of two pore-forming subunits. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98 (2): 729-34.
18. Daut J, Maier-Rudolph W, von Beckerath N, Mehrke G, Günther K, Goedel-Meinen L: Hypoxic dilatation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. Science 1990, 247: 1341-1344.
19. Decking UKM, Jüngling E, Kammermeier H: Interstitial transusate concentration of adenosine and inosine in rat and guinea-pig hearts. Am J Physiol 1988, 254 (H1): 125-132.
20. D'hahan N, Jacquet H, Moreau C, Catty P, Vivaudou M.: A transmembrane domain of the sulfonylurea receptor mediates activation of ATP-sensitive K(+) channels by K(+) channel openers. Mol Pharmacol 1999, 56 (2): 308-15.
21. Döring HJ, Dehnert H: Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff. March, Biomesstechnik-Verlag March GmbH 1985: 1-102.
22. Dunbar ME, Wysolmerski JJ: Parathyroid hormone-related protein: a developmental regulatory molecule necessary for mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1999, 4 (1): 21-34
23. Edvinsson L, Fredholm BB, Hamel E, Jansen I, Verrecchia C: Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. Neurosci Lett 1985, 58 (2): 213-207

24. Elsasser TH, Kahl S, Martinez Q, Montuenga L, Pio R, Cuttitta F: Adrenomedullin binding protein in the plasma of multiple species : characterization by radioligand blotting. Endocrinology 1999, 140: 4908-4911.
25. Foord SM, Marshall FH: RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. Trends Pharmacol Sci 1999, 20: 184-187.
26. Farrugia W, de Gooyer T, Rice GE, Moseley JM, Wlodek ME: Parathyroid hormone (1-34) and parathyroid hormone-related protein (1-34) stimulate calcium release from human syncytiotrophoblast basal membranes via a common receptor. J Endocrinol 2000, 166 (3): 689-695.
27. Fukuizumi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Kanaide H: The effects of calcitonin gene-related peptide on the cytosolic calcium concentration and force in the porcine coronary artery. J Pharmacol Exp Ther 1996, 278 (1): 220-231.
28. Gerlach E, Deutike B, Dreisbach RH: Der Nucleotidabbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Koronardurchblutung. Naturwissenschften 1963, 50: 228-229.
29. Gidday JM, Kaiser DM, Rubio R, Berne RM: Heterogeneity and sampling volume dependence of epicardial adenosine concentrations. J Mol Cell Cardiol 1992, 24: 351-364.
30. Guise TA, Mundy GR: Physiological and pathological roles of parathyroid hormone-related peptide. Curr Opin Nephrol Hypertens 1996, 5 (4): 307-315.
31. Hinson JP, Kapas S, Smith DM: Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. Endocrine Rev 2000, 21 (2): 138-167.
32. Ikeda U, Kanbe T, Shimada K: Adrenomedullin increases inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells stimulated with interleukin-1. Hypertension 1996, 27 (6): 1240-1244.
33. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan K: Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. Science 1995, 270: 1166-70.
34. Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan V, Seino S: 1996. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K+ channels. Neuron 1996, 16: 1011-1017.

35. Ishikawa M, Ouchi Y, Orimo H: Effect of calcitonin gene-related peptide on cytosolic free Ca2+ level in vascular smooth muscle. Eur J Pharmacol 1993, 246 (2):121-128.
36. Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H: Genomic structure of human adrenomedullin gene. Biochem Biophys Res Commun 1994, 203: 631-639.
37. Ishizaka Y, Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 1994, 200 (1): 642-646.
38. Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y: A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K+ channel. J Biol Chem 1996, 271: 24321-24324.
39. Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ; Burnett JC: Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. Circulation 1995, 92 (3): 286-289.
40. Kato J, Kitamura K, Kangawa K, Eto T: Receptors for adrenomedullin in human vascular endothelial cells. Eur J Pharmacol 1995, 289 (2): 383-385.
41. Kelm M, Schrader J: Control of coronary vascular tone by nitric oxide. Circ Res 1990, 66: 1561-1575.
42. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun 1993, 192 (2): 553-560.
43. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T: Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. Biochem Biophys Res Commun 1993, 194: 720-725.
44. Kitamura K, Kato J, Kawamoto M, Tanaka M, Chino N, Kangawa K, Eto T: The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is teh major circulating molecular form in human plasma. Biochem Biophys Res Commun 1998, 244: 551-555.
45. Kronenberg HM, Karaplis AC, Lanske B: Role of parathyroid hormone-related protein in skeletal development. Ann N Y Acad Sci 1996, 785: 119-123.
46. Kubota M, Moseley JM, Butera L, Dusting GJ, MacDonald PS, Martin TJ: Calcitonin gene-related peptide stimulates cyclic AMP formation in rat aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 1985, 132 (1): 88-94

47. Kureishi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Nakano T, Kanaide H: Adrenomedullin decreases both cytosolic Ca^{2+}-concentration and Ca^{2+}-sensitivity in pig coronary arterial smooth muscle. Biochem Biophys Res Commun 1995, 212 (2): 572-579.
48. Martin TJ, Moseley JM, Gillespie MT: Parathyroid hormone-related protein: biochemistry and molecular biology. Crit Rev Biochem Mol Biol 1991, 26: 377-395.
49. Martin TJ, Moseley JM,Williams ED: Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine. J Endocrinol 1997, 154: Suppl S23-37.
50. Massfelder T, Helwig JJ, Stewart AF: Editorial: Parathyroid hormone-related protein as a cardiovascular regulatory peptide. Endocrinology 1996, 137 (3): 3151-3153.
51. Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Ueda K : ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1. J Biol Chem 1999, 274: 37479-37482.
52. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 1998, 393 (6683): 333-339.
53. Mederos y Schnitzler M, Langheinrich U, Daut J: ATP-sensitive potassium channels in coronary capillaries isolated from guinea-pig heart. Pflügers Arch 1998, 435 (Suppl.): R 83
54. Meeran K, O'Shea D, Upton PD, Small CJ, Ghatei MA, Byfield PH, Bloom SR: Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. J Clin Endocrinol Metab 1997, 82: 95-100.
55. Mok LLS, Nickols GA, Thompson JC, Cooper CW: Parathyroid hormone as a smooth muscle relaxant. Endocr Rev 1989, 10: 420-436.
56. Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, Dipette DJ, Asimakis GK: Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyreoid hormone-related peptide: humoral hypercalcemia of malignance factor. Enocrinol 1989, 125: 834-841
57. Nishikimi T, Kitamura K, Saito Y, Shimada K, Ishimitsu T, Takamiya M, Kangawa K, Matsuo H, Eto T, Omae T, Matsuoka H: Clinical studies on the sites of production and clearance of circulating adrenomedullin in human subjects. Hypertension 1994, 24: 600-604.
58. Nishikimi T, Saito Y, Kitamura K, Ishimitsu T, Eto T, Kangawa K, Matsuo H, Omae T, Matsuoka H: Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with heart failure. J Am Coll Cardiol 1995, 26 (6): 1424-1431.

59. Nishikimi T, Horio T, Sasaki T, Yoshihara F, Takishita S, Miyata A, Matsuo H, Kangawa K: Cardiac production and secretion of adrenomedullin are increased in heart failure. Hypertension 1997, 30 (6): 1369-1375.
60. Nishikimi T, Horio T, Yoshihara F, Nagaya N, Matsuo H, Kangawa K: Effect of adrenomedullin on cAMP and cGMP levels in rat cardiac myocytes and nonmyocytes. Eur J Pharmacol 1998, 353 (2-3): 337-344.
61. Noma A: ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature 1983, 305 (5930): 147-148.
62. Nuki C, Kawasaki H, Kitamura K, Takenaga M, Kangawa K, Eto T, Wada A: Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds. Biochem Biophys Res Comm 1993, 196: 245-251.
63. Oliver KR, Wainwright A, Heavens RP and others: Distribution of novel CGRP1 receptor and adrenomedullin receptor mRNAs in the rat central nervous system. Brain Res Mol Brain Res 1998, 57 (1): 149-154.
64. Orloff JJ, Reddy D, dePapp 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.
65. Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nakamura S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T: Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. Biochem Biophys Res Commun 1993, 195: 921-927.
66. Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nishizono M, Iehiki Y, Kangawa K, Matsuo H, Eto T: Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma. FEBS Lett 1994, 352 (2): 105-108.
67. Sakura H, Ammala, C,Smith, P. A, Gribble, F. M; Ashcroft, F. M.: Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP- sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. FEBS Lett. 1995, 377: 338-44.
68. Seiler C, Kaufmann U, Meier B: Intracoronary demonstration of adenosine-induced coronary collateral steal. Heart 1997, 77 (1): 78-81.
69. Shepro D, D'Amore PA: Physiology and biochemistry of the vascular wall. In: Handbook of Physiology vol. IV (section 2), Eds. Renkin EM, Michel CC. American Physiological Society, Bethseda, MD, 1984, 103-164.

70. Sheykhzade M, Berg Nyborg NC: Mechanism of CGRP-induced relaxation in rat intramural coronary arteries. Br J Pharmacol 2001, 132 (6): 1235-1246.
71. Shimekake Y, Nagata K, Ohta S, Kambayashi Y, Teraoka H, Kitamura K, Eto T, Kangawa K, Matsuo H: Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca2+ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. J Biol Chem 1995, 270 (9): 4412-4417.
72. Simoniescu M, Simoniescu N: Ultrastructure of the miscrovascular wall. In: Handbook of Physiology vol. IV (section 2), Eds. Renkin EM, Michel CC. American Physiological Society, Bethseda, MD, 1984, 41-101.
73. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR: Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature 1985, 316 (6030): 736-8.
74. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT: Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K+ channels in arterial smooth muscle. Science 1989, 245 (4914): 177-80.
75. Stewart AF, Insogna KL, Broadus AE: Malignancy-associated hypercalcemia. In deGroot LJ: Endocrinology 3rd edition, Saunders, Philadelphia, 1995: 1061-1074.
76. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H: Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor-alpha. Biochem Biophys Res Commun 1994, 203 (1): 719-726.
77. Sun YD, Benishin CG: Effects of calcitonin gene-related peptide on intracellular calcium concentration in longitudinal muscle of guinea pig ileum. Peptides 1995, 16 (2): 299-305.
78. Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amashi T, Ueda K: Direct photoaffinity labelling of the K_{IR} 6.2 subunit of the ATP sensitive K^+ channel by 8-azido-ATP. J Biol Chem, 1999, 274: 3931-3933.
79. Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T, Ueda K: Direct photoaffinity labelling of K_{IR} 6.2 by [gamma-(32)P]ATP-[gamma]4-azidoanilide. Biochem Biophys Res Comm 2000, 272: 3126-319.
80. Trapp S, Proks P, Tucker SJ, Ashcroft FM: Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibiting by ATP. J Gen Physiol 1999, 112: 333-349.
81. Tucci J, Hammond V, Senior PV, Gibson A, Beck F: The role of fetal parathyroid hormone-related protein in transplacental calcium transport. J Mol Endocrinol 1996, 17 (2): 159-164.

82. Tucker SJ, Gribble FM, Proks P, Trapp S, Ryder TJ, Haug T, Reimann F, Ashcroft FM: Molecular determinants of K_{ATP} channel inhibition by ATP. EMBO J 1999, 17: 3290-3296.
83. Ueda K, Inagaki N, Seino S: MgADP antagonism to Mg2+-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. J Biol Chem 1997, 272 (37): 22983-22986.
84. Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S, Amachi T: Proceedins of the National Academy of Science in the U.S.A. 1999, 96: 1268-1272.
85. Valin A, Guillen C, Esbrit P: C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP) (107-139) stimulates intracellular Ca(2+) through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. Endocrinology 2001, 142 (7): 2752-2759.
86. Wangler RD, Gorman MW, Wang CY, DeWitt DF, Chan IS, Bassingthwaighte JB, Sparks HV: Transcapillary adenosine transport and interstitial adenosine concentration in guinea-pig hearts. Am J Physiol 1989, 257: H89-H106.
87. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ: distantly related sequences of the α- and β-subunits of ATP synthase, myosin-kinases and other ATP requiring enzymes and a common nucleotid binding fold. EMBO J 1982, 8: 954-951.
88. Wimalawansa SJ: Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. Crit Rev Neurobiol 1997, 11 (2-3): 167-239.
89. Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y:Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K+ channel. Br J Physiol 1997, 499: 715-720.
90. Yamamoto S, Morimoto I, Yanagihara N, Zeki K, Fujihira T, Izumi F, Yamashita H, Eto S: Parathyroid hormone-related peptide-(1-34) [PTHrP-(1-34)] induces vasopressin release from the rat supraoptic nucleus in vitro through a novel receptor distinct from a type I or type II PTH/PTHrP receptor. Endocrinology 1997 ,138 (5): 2066-2072.
91. Yoshimoto R, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H: Effects of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide on contractions of the rat aorta and porcine coronary artery. Br J Pharmacol 1998, 123 (8): 1645-1654.

92. Zhang L, Bonev AD, Nelson MT, Nelson MT, Mawe GM: Activation of ATP-sensitive potassium currents in guinea-pig gall-bladder smooth muscle by the neuropeptide CGRP. J Physiol 1994, 478 (3): 483-91.

7 Anhang

Curriculum vitae

geboren am 20.11.1974 in Siegen

1981 bis 1985	Grundschule Betzdorf (Marienschule und Martin Luther – Schule)
1985 bis 1994	Privates Gymnasium der Zisterzienserabtei Marienstatt
1994	Allgemeine Hochschulreife
1994 bis 1995	Grundwehrdienst SanBtl 5 in Rennerod
1995 bis 2002	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
1997	Physikum
1998	1. Staatsexamen
2001	2. Staatsexamen
2002	3. Staatsexamen
2002	Vorlage der Dissertation zur Erlangung des Dr. med.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen / Herren in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beyer, Christiansen, Daut, Doss, Engel, Feuser, Geus, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Gröne, Habermehl, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Kienapfel, Klenk, Köhler, Koolman, Krieg, Lang, Lengsfeld, Lennarz, Maisch, Nies, Oertel, Pfeiffer, Reichardt, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schürmann, Schüffel, Schulz, Schwella, Seitz, Steiniger, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, Wilke, Wirth, Zielke.

Danksagung

Dank gilt im Besonderen Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut für seine Hilfsbereitschaft und stets konstruktive Kritik während der Erstellung dieser Arbeit.

Dank für technische und logistische Unterstützung und interessante Diskussionen innerhalb und außerhalb der AG Daut während der Doktorarbeit gilt:

Brigitte Burk

Dr. Christian Derst

Robert Graf

Roswitha Luzius

Dr. Michael Mederos y Schnitzler

Dr. Regina Preisig-Müller

Dr. John Ray

Erich Reisinger

Kersten Schneider

und ganz besonders Erika Hoffmann