

Aus der Franz-Volhard-Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Einfluß von Atrionatriuretischen Peptid auf die Makromolekülpermeabilität aortaler und koronarer Endothelien

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von Christoph Bach
aus Bobingen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Haller
2. Prof. Dr. H.-W. Reinhardt
3. Prof. Dr. T. Lenz

Datum der Promotion: 18.11.2002

Einfluß von Atrionatriuretischen Peptid auf die Makromolekülpermeabilität aortaler und koronarer Endothelien.

Atrionatriuretisches Peptid (ANP) moduliert die Barrierenfunktion in endothelialen Monolayers; jedoch sind die Mechanismen noch unklar.

Wir überprüften die Hypothese, inwiefern die ANP-Wirkung auf die Permeabilität (P) abhängig ist von einem veränderlichen Gleichgewicht der Nukleotide cyclic GMP (cGMP) und cyclic AMP (cAMP), und hierbei der C-ANP-Rezeptor eine funktionelle Bedeutung aufweist. Die ANP-Wirkung wurde hierbei in koronaren (CEC) and aortalen Endothelzellen (AEC) im Vergleich untersucht.

Die endotheliale Makromolekülpermeabilität (P) wurde aus dem Übertritt von Trypanblaugelabelten Albumin über das Monolayer ermittelt. Wir erfassten neben der Permeabilität den zellulären Gehalt von cGMP und cAMP, mit und ohne Pertussitoxin (PT), mit dem Proteinkinase G –Inhibitor KT 5823 und mit beiden Substanzen in Kombination. Dann wiederholten wir die gesamte Versuchsserie mit dem ANP-Derivat C-ANP, das selektiv nur an den C-ANP-Rezeptor bindet.

Ergebnisse: In CEC verursachte ANP (100nM) eine Abnahme der P ($48\% \pm 7\%$, mean \pm SD, N=6, $p < 0.05$) und des cAMP-Gehaltes ($55\% \pm 8\%$) sowie einen Anstieg des cGMP-Gehaltes ($+62\% \pm 6\%$). Vorbehandlung der CEC mit KT 5823 (1 μ M) für 30 min, oder mit PT (1mg/ml) für 60 min reduzierte den Effekt von ANP auf die P ($26\% \pm 5\%$) und auf den cAMP-Gehalt ($23\% \pm 6\%$). Der Einsatz beider Hemmsubstanzen KT 5823 plus PT verhinderte den ANP-Effekt auf die P komplett.

C-ANP hatte einen geringeren Einfluß auf die P: C-ANP (100nM) verminderte die P ($28\% \pm 6\%$), hatte jedoch keinen Effekt auf den cGMP-Gehalt, jedoch erhöhte es ebenfalls den cAMP-Gehalt ($28\% \pm 7\%$). Dieser Effekt wurde durch KT 5823 nicht beeinflusst, jedoch komplett durch PT verhindert.

Im Kontrast dazu zeigt ANP in AEC eine Zunahme der P ($59\% \pm 8\%$), wobei jedoch die Veränderungen der Nukleotide dieselben sind wie in CEC: Erhöhung des cGMP-Gehaltes ($44\% \pm 6\%$) und Verminderung des cAMP-Gehaltes ($58\% \pm 8\%$).

Zusammenfassung: (1) ANP moduliert die endotheliale Barrierenfunktion über zwei unterschiedliche Wirkmechanismen: über die Steigerung des cGMP-Gehaltes via A-/B-ANP-Rezeptor und über die Reduktion des cAMP-Gehaltes via des C-ANP-Rezeptors.

(2) Während die ANP-Wirkung über dieselben intrazellulären Wirkmechanismen vermittelt wird, zeigt es hinsichtlich der Permeabilität einen inverse Effekt in den beiden untersuchten Endothelzellsystemen: Es verminderte die P in CEC und steigert diese AEC.

Schlagwörter:

ANP

Permeabilität

ANP-C-Rezeptor

Endothel

Influence of Atrial Natriuretic Peptid (ANP) in Modulating Endothelial Permeability of Coronary and Aortic Monolayers.

Atrial natriuretic peptide (ANP) improves the barrier function in primary cultures of endothelial monolayers; however, the mechanism is unclear.

We tested the hypothesis that the ANP-induced alteration in endothelial permeability is related to an altered balance between cyclic GMP (cGMP) and cyclic AMP (cAMP) via functional involvement of the C-ANP-receptor in coronary endothelial (CEC) and aortic endothelial (AEC) cells.

Endothelial macromolecule permeability (P) was determined by passage of trypan-blue-labeled albumin across rat coronary and porc aortic endothelial monolayers. We measured permeability, as well as cGMP and cAMP, with or without pertussis toxin (PT), the protein kinase G inhibitor KT 5823, and both in combination. Next, we repeated this entire series, giving the truncated ANP-derivate C-ANP, which binds only to the C-ANP-receptor.

We found: In CEC ANP (100nM) caused a decrease in P (48% \pm 7%, mean \pm SD, N=6, $p < 0.05$) and cAMP (55% \pm 8%) and a increase in cGMP (+62% \pm 9%). Pretreatment of CEC with KT 5823 (1 μ M) for 30 min, or with PT (1mg/ml) for 60 min reduced the effect of ANP on P (26% \pm 5%) and on cAMP (23% \pm 6%), respectively. Pretreatment of CEC with both KT 5823 plus PT abolished the effect of ANP on P completely.

C-ANP had less effect on P: C-ANP (100nM) decreased P (28% \pm 6%), had no effect on cGMP, but decreased cAMP (28% \pm 7%). This effect was not influenced by KT 5823, but was completely abolished by PT.

In contrast ANP showed in AEC an increase in P (59% \pm 8%), but the same alterations of cGMP (44% \pm 6%) increase and cAMP decrease (58% \pm 8%).

Conclusion: (1) ANP modulates endothelial barrier function by two cooperative mechanisms: enhancing the cellular cGMP content via A-/B-ANP-receptor receptor coupled cGMP-formation, and by reduction of cAMP content via C-ANP-receptor.

(2) While using the same intracellular messenger systems in AEC and CEC, ANP effects inverse alterations in P: decreases in CEC and increases in AEC.

Keywords:

ANP
endothelium
permeability
ANP-C-receptor

1	Einleitung	7
1.1	Endotheliale Barrierenfunktion	7
1.2	Atrionatriuretisches Peptid (ANP)	7
1.3	Wirkung von ANP auf die zyklischen Nukleotide	7
1.4	Wirkung von ANP auf die Permeabilität	8
2	Aufgabenstellung	8
3	Material und Methoden	9
3.1	Primärkulturen mikrovaskulärer Koronarendothelzellen (Ratte)	9
3.2	Primärkulturen makrovaskulärer Aortenendothelzellen (Schwein)	9
3.3	Aussaat der Endothelzellen auf Filtermembranen	9
3.4	Messung der makromolekularen Permeabilität	9
3.5	Versuchsprotokoll der Permeabilitätsmessung	11
3.6	Messung des zellulären Gehaltes an zyklischen Nukleotiden	11
3.7	Versuchssubstanzen:	11
3.8	Verbrauchsmaterialien	12
3.9	Geräte	12
3.10	Statistik	13
4	Ergebnisse	13
4.1	Mikrovaskuläre Endothelzellen	13
4.1.1	Wirkung von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP auf die Permeabilität	13
4.1.1.1	Konzentrationsreihe mit 8-Br-cAMP	13
4.1.1.2	Konzentrationsreihe mit 8-Br-cGMP	14
4.1.1.3	Zeitverlauf der 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP-Wirkung	15
4.1.2	Wirkung von ANP	16
4.1.2.1	Einfluß von ANP auf die zellulären Nukleotidspiegel	16
4.1.2.1.1	cAMP-Spiegel	16
4.1.2.1.2	cGMP-Spiegel	16
4.1.2.2	Einfluß von ANP auf die Permeabilität	17
4.1.2.2.1	Konzentrationsreihe	17
4.1.2.2.2	Zeitverlauf	18
4.1.3	Wirkung von C-ANP	19
4.1.3.1	Einfluß von C-ANP auf die endothelialen Nukleotidspiegel	19
4.1.3.1.1	cAMP-Spiegel	19

4.1.3.1.2	cGMP-Spiegel	19
4.1.3.2	Einfluß von C-ANP auf die Permeabilität.....	20
4.1.3.2.1	Konzentrationsreihe	20
4.1.3.2.2	Zeitverlauf	21
4.1.4	Wirkung von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin.....	21
4.1.4.1	Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität.....	21
4.1.4.2	Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf cAMP-Spiegel	22
4.1.5	Wirkung von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin.....	23
4.1.5.1	Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität.....	23
4.1.5.2	Einfluß von C-ANP in Gegenwart Pertussistoxin auf die cAMP-Spiegel	24
4.1.6	Wirkung von ANP auf die Permeabilität in Gegenwart von KT 5823.....	24
4.1.7	Wirkung von C-ANP auf die Permeabilität in Gegenwart von KT 5823.....	24
4.1.8	Wirkung von ANP auf die Permeabilität in Gegenwart von Pertussistoxin und KT 5823.....	24
4.2	Makrovaskuläre Endothelzellen.....	25
4.2.1	Wirkung von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP auf die Permeabilität	25
4.2.1.1	Konzentrationsreihe mit 8-Br-cAMP	25
4.2.1.2	Konzentrationsreihe mit 8-Br-cGMP	26
4.2.1.3	Zeitverlauf der 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP- Wirkung.....	26
4.2.2	Wirkung von ANP.....	27
4.2.2.1	Einfluß von ANP auf die endothelialen Nukleotidspiegel	27
4.2.2.1.1	cAMP-Spiegel	27
4.2.2.1.2	cGMP-Spiegel	27
4.2.2.2	Einfluß von ANP auf die Permeabilität.....	28
4.2.2.2.1	Konzentrationsreihe	28
4.2.2.2.2	Zeitverlauf	29
4.2.3	Wirkung von C-ANP.....	30
4.2.3.1	Einfluß von C-ANP auf die endothelialen Nukleotidspiegel	30
4.2.3.1.1	cAMP-Spiegel	30
4.2.3.1.2	cGMP-Spiegel	30
4.2.3.2	Einfluß von C-ANP auf die Permeabilität.....	31
4.2.3.2.1	Konzentrationsreihe	31
4.2.3.2.2	Zeitverlauf	32
4.2.4	Wirkung von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin.....	32
4.2.4.1	Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität.....	32

4.2.4.2	Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf cAMP-Spiegel.....	33
4.2.5	Wirkung von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin.....	34
4.2.5.1	Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität.....	34
4.2.5.2	Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die cAMP-Spiegel....	35
4.2.6	Wirkung von ANP in Gegenwart von KT 5823 auf die Permeabilität.....	35
4.2.7	Wirkung von C-ANP in Gegenwart von KT 5823 auf die Permeabilität.....	35
4.2.8	Wirkung von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin und KT 5823 auf die Permeabilität.....	36
5	Diskussion.....	37
5.1	Zentrales Ergebnis.....	37
5.2	Regulation der Nukleotide.....	37
5.3	Antagonistische Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität.....	39
5.4	Synergistische Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität.....	39
5.5	Inverse Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität.....	40
5.6	Inverse Wirkung von ANP auf die Permeabilität.....	40
5.7	Gefäßspezifische Differenzierung der Endothelzellen.....	41
6	Zusammenfassung.....	43
7	Literatur.....	44
	Abkürzungen.....	49
	Danksagung.....	50
	Lebenslauf.....	51
	Publikationen.....	52
	Erklärung.....	53

1 Einleitung

1.1 Endotheliale Barrierenfunktion

Das Endothel kleidet das gesamte Gefäßsystem des Organismus mit einer einschichtigen Zellschicht über eine Fläche von ca. 1000qm aus. Über diese Oberfläche reguliert es als Monolayer den Austausch aller Nährstoffe, Elektrolyte, Botenstoffe und Metabolite zwischen dem intravasalen Raum und dem extravasalen Organgewebe des Körpers. Täglich werden über diese Barriere 80.000l Wasser und 20.000g Glukose transportiert (1).

Der Stoffaustausch durch das Endothel erfolgt transzellulär und parazellulär (1,58). Der parazelluläre Weg ist entscheidend für den Transport von Makromolekülen wie Albumin und erfolgt über Diffusion (58). Er führt durch die "gaps", die Interzellulärspalten, die sich in den dichten Schlußleisten der Endothelzellen befinden. Der mittlere Porenradius der "gaps" liegt bei 4-5nm und schränkt den freien Übertritt von Albumin (Molekülradius: 3.5nm) auf einen Koeffizienten von 5% ein (1). Jedoch existieren auch Poren von bis zu 20-30nm Radius, die auch größeren Makromolekülen den Durchtritt gewähren (1). Der Zellverband bestimmt durch Kontraktion und Relaxation seines Zytoskelettes die Porenöffnung der verschiedenen "gaps". Je stärker die Kontraktion der Zellfilamente, desto größer die Porenöffnung und der Stoffaustausch. Neben der Porengröße wird der freie Übertritt der Moleküle zusätzlich vom hydrostatischen und onkotischen Druck beeinflusst (58).

Aus diesen Größen ergibt sich der Albuminfluß als Ausdruck der makromolekularen Permeabilität des Endothels. Das koronare Endothel zum Beispiel ist unter submaximaler Belastung einer Fahrradergometrie in der Lage, seine Permeabilität bis auf das 15-fache zu steigern (20).

Die Permeabilität wird durch das Zusammenwirken einer Vielzahl endogener und exogener Botenstoffe, die auf das Endothel einwirken, beeinflusst. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Wirkung des Atrionatriuretischen Peptides (ANP) auf die Permeabilität von Endothelien unterschiedlichen Ursprungs.

1.2 Atrionatriuretisches Peptid (ANP)

ANP, erstmals von Bold et al. 1981 (2) entdeckt, wird vornehmlich in atrialen Kardiomyozyten synthetisiert (4) und aufgrund erhöhter atrialer Wandspannung, neurohumoraler Faktoren und erhöhter Herzfrequenz in die Blutbahn freigesetzt (4,9).

Das Hormon besitzt eine kardioprotektive Wirkung. Einerseits beeinflusst es den Organismus durch antiadrenerge Effekte, andererseits reduziert es das intravasale Volumen und die myokardiale Vorlast (4,5). Es ist in der Blutbahn des gesamten Körpers sowohl unter physiologischen Situationen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei Ischämie nachweisbar und greift je nach regionalen Anforderungen über seine Rezeptoren A, B und C in die Modulation der endothelialen Barriere ein.

1.3 Wirkung von ANP auf die zyklischen Nukleotide

Als der entscheidende intrazelluläre Transduktionsweg von ANP hinsichtlich der Permeabilität wird von allen Arbeitsgruppen die Aktivierung der partikulären Guanylatzyklase (GC) (13-20) und der Proteinkinase G (PK G) angesehen (47,49,50). Die GC ist an die beiden ANP-Rezeptoren, ANP-A und ANP-B, gekoppelt (21-22).

Neben der partikulären GC existiert eine lösliche GC, die ebenfalls zur cGMP-Generierung und Permeabilitätsveränderungen in der Zelle führt. Die lösliche GC wird durch Substanzen wie Nitrovasodilatoren, NO und freie Radikale (5) aktiviert, ist aber ohne Beziehung zu einer bekannten biologischen Wirkung von ANP (7).

Der dritte ANP-Rezeptor, ANP-C oder Clearance-Rezeptor genannt, ist verantwortlich für die Elimination von ANP aus dem Organsystem. Er senkt die ANP-Konzentration, indem ANP an diesen Rezeptor bindet und internalisiert wird (27,28). Eine funktionelle Zuordnung in der Signaltransduktion konnte allerdings die Arbeitsgruppe von Shrivastava (29,30) erbringen. In nichtendothelialen Geweben beobachtete sie unter dem Einfluß von ANP eine cAMP-Absenkung und wies diesen Effekt einer Kopplung des ANP-C-Rezeptors mit einer Adenylatzyklase (AC) zu.

Es stellte sich uns die Frage, ob auch im Endothel eine Kopplung des ANP-C-Rezeptors mit einer AC besteht und dieser Weg einen zweiten Signaltransduktionsweg zur Modulierung der Permeabilität darstellt.

1.4 Wirkung von ANP auf die Permeabilität

Zwar ist die Wirkung von ANP auf die Permeabilität von allen Autoren nachgewiesen, jedoch bestehen noch ungeklärte Ansichten über dessen genaue Wirkungsweise.

Eine Gruppe von Autoren (13-18) konnte eine ANP-Wirkung ausschließlich nur dann beobachten, wenn die Permeabilität des Endothelverbandes durch den Einsatz von Thrombin und Oxidantien erhöht wurde. Der Einsatz von ANP brachte die endotheliale Permeabilität auf die Ausgangspermeabilität zurück.

Andere (19,20,47) konnten zeigen, daß ANP selbst auch ohne Vorstimulation am "ruhenden Endothel" wirkt. ANP führte hier zu einer Erhöhung der Permeabilität.

Alle bisher genannten Autoren benutzten zu ihren Versuchen makrovaskuläre, aortale Endothelzellen. Untersuchungen an mikrovaskulären, koronaren Zellverbänden (20) jedoch führte an ruhenden Zellen zu einer Erniedrigung der Permeabilität.

Es stellt sich die Frage, von welchen Kriterien die Wirkung von ANP auf die Permeabilität abhängig ist.

2 Aufgabenstellung

Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob ANP nicht nur über die partikuläre Guanylatzyklase sondern auch über eine Adenylatzyklase auf die endotheliale Permeabilität einwirke und dieser Effekt über den ANP-C-Rezeptor vermittelt sei.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die permeabilitätsverändernde Wirkung von ANP eine Abhängigkeit vom Ursprung des Endothels aufweise.

3 Material und Methoden

3.1 Primärkulturen mikrovaskulärer Koronarendothelzellen (Ratte)

Männlichen, ca. 250g schweren, narkotisierten Wistar-Ratten wurde das Herz explantiert, die epikardialen Mesothelzellen in 70% Ethanol devitalisiert und das Herz anschließend 20 Minuten mit Kollagenase Typ II in der Langendorf-Anlage bei 95%iger O₂- und 5%iger CO₂-Inkubation perfundiert (51). Die Ventrikel wurden danach vom Herzen abgetrennt, mechanisch zerkleinert und wiederum Kollagenase und später Trypsin zugesetzt. Durch Zentrifugation bei 360rpm wurden die koronaren Endothelzellen im Überstand von den Kardiomyocyten separiert und in einem Kulturmedium aus HEPES-gepufferter Nährlösung M199 unter Zusatz von 20% Mixed-Serum aus Fetal- und Newborn- Calfserum im Verhältnis 1:1 sowie 250IU/ml Penicillin, 250µg/ml Streptomycin und 40mg/ml Gentamycin aufgenommen. Auf 100mm Gewebekulturschalen (Falcon) wurden die Endothelzellen in einer Dichte von 10⁶ Zellen/cm² ausgesät und 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Hierauf folgte ein "Waschgang" durch kräftiges Abspülen letaler oder artfremder Zellen. Unter Mediumwechsel alle 2 Tage erreichten die Endothelzellen nach 5-6 Tagen ein konfluentes Stadium. Der Anteil der Endothelzellen erreicht nach diesem Verfahren >95% (>95% F-VIII-AG- bzw. Ac-LDL-Bindung).

3.2 Primärkulturen makrovaskulärer Aortenendothelzellen (Schwein)

Die Pars descendens der Aorta thoracica von Schlachthof-Schweinen wurde innerhalb von 2 Stunden angeliefert (52). Nach der Eröffnung der Gefäße wurden die Endothelzellen behutsam mechanisch abgetragen, in Falcon-Zentrifugenröhrchen 50ml (Becton Dickenson) mit der oben beschriebenen HEPES-gepufferten Nährlösung M199 aufgenommen und zentrifugiert. Die Endothelzellen im Sediment wurden resuspendiert und in oben beschriebener Weise auf Kulturschalen ausgesät, nach 4h gewaschen und bis zur Konfluenz eines Monolayers nach 5-6 Tagen kultiviert. Die Reinheit des Monolayers nach diesem Verfahren lag bei 97% Endothelzellen (>97% F-III-AG- bzw. Ac-LDL-Bindung).

3.3 Aussaat der Endothelzellen auf Filtermembranen

Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers wurde das Endothel mit EDTA-Trypsin-Puffer trypsiniert, resuspendiert und in einer Menge von 300.000 Zellen entweder auf 24mm-Polycarbonatfiltern (Costar Transwell Sixwell, 4 µM Porengröße, Durchmesser 24mm) zur Permeabilitätsmessung oder auf 60mm- Kulturschalen (Falcon) zur Bestimmung des cAMP- und cGMP-Gehaltes ausgesät. Die Experimente erfolgten am 4.Tag, wenn die Endothelzellen erneut ein konfluentes Monolayer ausgebildet hatten. Mit Kontrollschalen wurde gewährleistet, daß das Konfluenzstadium immer am gleichen Tag erreicht wurde.

3.4 Messung der makromolekularen Permeabilität

Das auf der Filtermembran ausgebildete Monolayer wurde in eine Inkubationskammer (45mm Durchmesser und 30mm Höhe) gesetzt (Abb.A) und unterteilt diese in zwei übereinander liegende Kompartimente, die beide mit einer modifizierten Tyrodelösung gefüllt wurden. 2.5ml wurden in das obere und 10.5ml in das untere Kompartiment (in Vorversuchen über 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C ermittelt) gegeben, sodass bei gleichem Flüssigkeitsstand kein hydrostatischer Druckgradient über den Kompartimenten vorlag. (56,57).

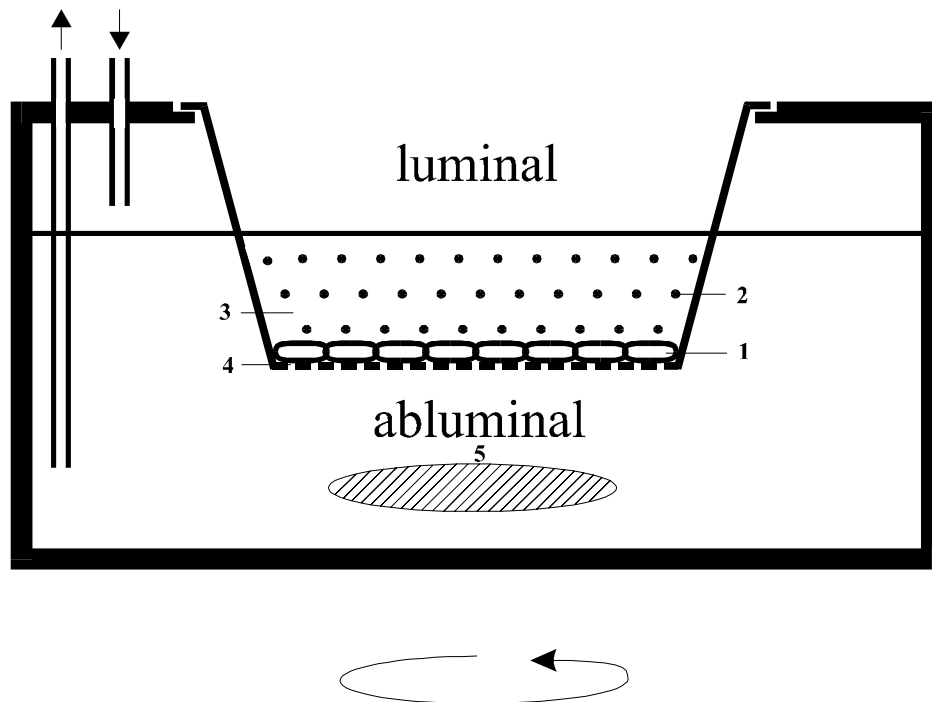


Abb. A: Inkubationskammer: (1) Endotheliales Monolayer (2) Trypanblau-markiertes Albumin (3) Luminales Kompartiment (4) Abluminales Kompartiment (5) magnetischer Mikrorührer.

Dem oberen, "luminalen" Kompartiment wurde trypanblau-markiertes Albumin ($60\mu\text{M}$) zugegeben. Dem unteren "abluminalen" Kompartiment wurde unmarkiertes Albumin beigefügt, sodass in beiden Kompartimenten die gleiche Albuminkonzentration herrschte und ein onkotisches Gleichgewicht hergestellt war.

Der Transport des trypanblau-markierten Albumins vom oberen in das untere Kompartiment erfolgte somit durch diffusive Kräfte. Es wurde im unteren größeren Kompartiment mit einem magnetischen Mikrorührer durchmischt und kontinuierlich über einen geschlossenen Pumpkreislauf einem Zwei-Wellenlängen-Photometer (Modell Specord S-10, Carl-Zeiss-Jena) mit einer Verzögerung von weniger als 15 Sekunden zugeleitet. Dort wurde die Konzentration des Trypanblaus als Absorption bei einer Wellenlänge von 580nm alle 10 Minuten erfaßt, während die Messung der Absorption bei 720nm als Kontrolle diente.

Die Förderrate der pulsarmen Pumpe wurde in Vorversuchen kontrolliert verändert und hatte bei niedrigen Flussraten keinen signifikanten Einfluß auf die Permeabilität über das endotheliale Monolayer, so dass eine entsprechend niedrige Pumpgeschwindigkeit gewählt wurde.

Die Geschwindigkeit des magnetischen Mikrorührers ($6\text{mm} \times 1\text{mm}$) wurde ebenfalls zuvor in verschiedenen Rührgeschwindigkeiten hinsichtlich seines Permeabilitätseffektes überprüft und nicht signifikante Veränderungen mit steigender Geschwindigkeit gefunden, weswegen mit einer niedrigen Rührgeschwindigkeit mit 60 Umdrehungen pro Minute wie in der Literatur beschrieben (13,15) gearbeitet wurde.

Der Albuminfluß (F) über das Monolayer mit der Oberfläche (S) – auch als Flussdichte in der Physik bezeichnet – berechnet sich dann aus der Änderung der Albuminkonzentration (A_2) über die Zeit (dt) im Volumen des unteren Kompartimentes (V): $F (\text{mol} / \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-2}) = d(A_2)/dt \times V/S$.

Um diese Daten mit denen von anderen Veröffentlichungen vergleichen zu können, wurde noch ein Permeabilitätskoeffizient P (cm/s) eingeführt, der die Durchlässigkeit des kombinierten Systems bestehend aus dem endothelialen Monolayer und dem Polycarbonatfilter erfaßt und nach

der Formel ($P = F / ((A1)-(A2))$) berechnet wurde, wobei (A1) die Markerkonzentration im luminalen Kompartiment und (A2) die im abluminale Kompartiment darstellt. Weil die treibende Kraft $((A1)-(A2))$ über den Zeitverlauf des Experimentes ungefähr gleich blieb (38), korrespondieren die relativen Änderungen des Albuminflusses mit den Änderungen des Permeabilitätskoeffizienten.

Der basale Albuminfluß im koronaren Endothel entsprach $4.2 \pm 0.4 \times 10^{-13}$ ($\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$) und korrespondierte mit einer basalen Permeabilität über das koronare Monolayer und dem Filter von $5.37 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ (cm/s) (siehe Ergebnisse 4.1.1.1.). Die Ergebnisse wurden als prozentuale Änderungen der Permeabilität gegenüber der basalen Kontrollsituation von 100% angegeben.

Der basale aortale Albuminfluß entsprach dagegen $3.91 \pm 0.38 \times 10^{-13}$ ($\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$) und einer Permeabilität von $5.0 \pm 0.47 \times 10^{-6}$ (cm / s) über das System (siehe 4.2.1.1.).

3.5 Versuchsprotokoll der Permeabilitätsmessung

Die Messung der Makromolekülpermeabilität erfolgte nach einer Äquilibrationsphase von 30 Minuten. Die basale Permeabilität wurde über weitere 30 Minuten ermittelt. Die jeweilige Versuchssubstanz wurden in angegebener Konzentration dem luminalen und abluminalen Kompartiment 30 bzw. 60 Minuten nach Protokoll zugefügt und im Intervall von 10 Minuten die Permeabilitätsänderungen ermittelt.

Bei der Verwendung von Pertussistoxin (1µg/ml) wurden die Endothelmonolayer 2 Stunden vor der Messung mit dieser Substanz inkubiert und vor Beginn der Messung dreimal mit Basalmedium gewaschen.

Bei Einsatz von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP wurde wegen Lichtempfindlichkeit verdunkelt gearbeitet.

3.6 Messung des zellulären Gehaltes an zyklischen Nukleotiden

Nach Inkubation der konfluenten Endothelmonolayer mit den jeweiligen Versuchssubstanzen wurde das Inkubationsmedium aspiriert und eisgekühltes Ethanol hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden. Die Petrischalen wurden bei -80°C eingefroren und zwischengelagert. Um die intrazellulären, zyklischen Nukleotide zu messen, wurde das Ethanol bei 60°C verdampft, die Zellaufschlüsse in tridestilliertem Wasser suspendiert und in Eppendorf-Gefäße für 5 Minuten bei 14.000G zentrifugiert. Im Überstand wurde mit einem Radioimmunoassay (Amersham; Braunschweig, Deutschland) die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide bestimmt. Im Sediment wurde der Proteingehalt bestimmt. Der zelluläre Gehalt wurde als Konzentration des Nukleotids pro 1mg Protein dargestellt.

3.7 Versuchssubstanzen:

r-ANP (1-28), C-ANP	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden,
Pertussistoxin, KT 5823	Deutschland.
8-Br-cAMP, 8-Br-cGMP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chemikalien/Enzyme/Pharmaka	
Medium M-199 mit Earle's Salzen	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Modifizierte Tyrodelösung (150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.7 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.0 mM CaCl_2 , 30 mM HEPES (pH 7.4, 37°C) mit 10% Newborn Calf Serum und 10% Fetal Calf Serum)	

Elektrolyte: NaCl, CaCl, Kcl, KH ₂ PO ₄ ,	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MgSo ₄ , Hepes, EDTA-Na ₂ , NaHCO ₃ .	Merck, Darmstadt, Deutschland
Newborn Calf Serum	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Fetal Calf Serum	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Hepes-Lösung	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
EDTA-Trypsin	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Penicillin G 100 IU/ml	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Gentamycin 40mg/ml	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Streptomycin 100µg/ml	Life-Technology, Eggenstein, Deutschland
Collagenase Typ II 266U/mg	Worth. Biochem. Corp., New Yersey, USA
Trypsin 1:250	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Albumin, bovine	Sigma, St. Louis, USA.
Trypanblau	Seromed, Berlin, Deutschland
Glukose	Sigma, St. Louis, USA.
Ethylalkohol	Franz-Volhard-Klinik, Berlin, Deutschland
3.8 Verbrauchsmaterialien	
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon- Tube (10, 50ml)	Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturschalen (24, 60, 100mm)	Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland
Polycarbonat -Filtermembran-Einsätze	Costar, Bodenheim, 24mm Diameter, 0,4 µM
Radioimmunassay KIT R509	Amersham, Braunschweig, Deutschland
3.9 Geräte	
Photometer, Modell Specord S-10	Carl-Zeiss, Jena, Deutschland
Pumpe	ISMATEC, Zürich, Schweiz
Computer	486/133 Mhz, Betriebssystem MS-DOS 6.2
Mikroskop, Modell TMSF	Nikon, Japan
pH- Meter	Fullerton, USA
Vortex, REAX 2000	Heidolph, Deutschland
Zentrifuge	Beckmann, München, Deutschland
Tischzentrifuge, Biofuge 13	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laminar-Flow, Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
Absaugpumpe, Hochvakuumpumpe	Edwards, England
Rührer	Janke-Kunkel, Deutschland
Chopper	Bachhofer, Rutlingen, Deutschland

Langendorf-Anlage	Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Feinwaage, Kern 410	A+M Corpor., USA
Steri Cult Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) in der jeweils höchsten kommerziell verfügbaren Qualität bezogen.

3.10 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SD bei $n=6$ unabhängiger Versuche. In der Signifikanzanalyse wurde der T-Test nach Student eingesetzt. Als Signifikanzniveau für die Trennung zweier Werte wurde $p < 0,05$ angesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrovaskuläre Endothelzellen

4.1.1 Wirkung von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP auf die Permeabilität

4.1.1.1 Konzentrationsreihe mit 8-Br-cAMP

8-Br-cAMP führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Permeabilität in koronaren Endothelmonolayern. Die basale Permeabilität - gleichgesetzt mit 100% - betrug $5,45 \times 10^{-6}$ cm/s (Abb.1).

Die Permeabilitätssteigerung war ab einer Konzentration von 5×10^{-7} bis 1×10^{-5} M signifikant und erreichte bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer Steigerung von 38% (SD \pm 5%) ein Maximum.

Geringere bzw. höhere 8-Br-cAMP-Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Permeabilität.

Das Maximum der Permeabilitätsänderung wurde jeweils in der 30. Minute erreicht, und deshalb dieser Zeitpunkt für die vergleichende Darstellung verwendet.

4.1.1.2 Konzentrationsreihe mit 8-Br-cGMP

8-Br-cGMP (Abb.1) führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Permeabilität in koronaren Endothelmonolayern.

Die Permeabilitätsabnahme war ab einer Konzentration von 1×10^{-7} bis 5×10^{-5} M signifikant und erreichte bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer Abnahme um 49% +/- 5% ein Optimum.

Geringere bzw. höhere 8-Br-cGMP-Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Permeabilität.

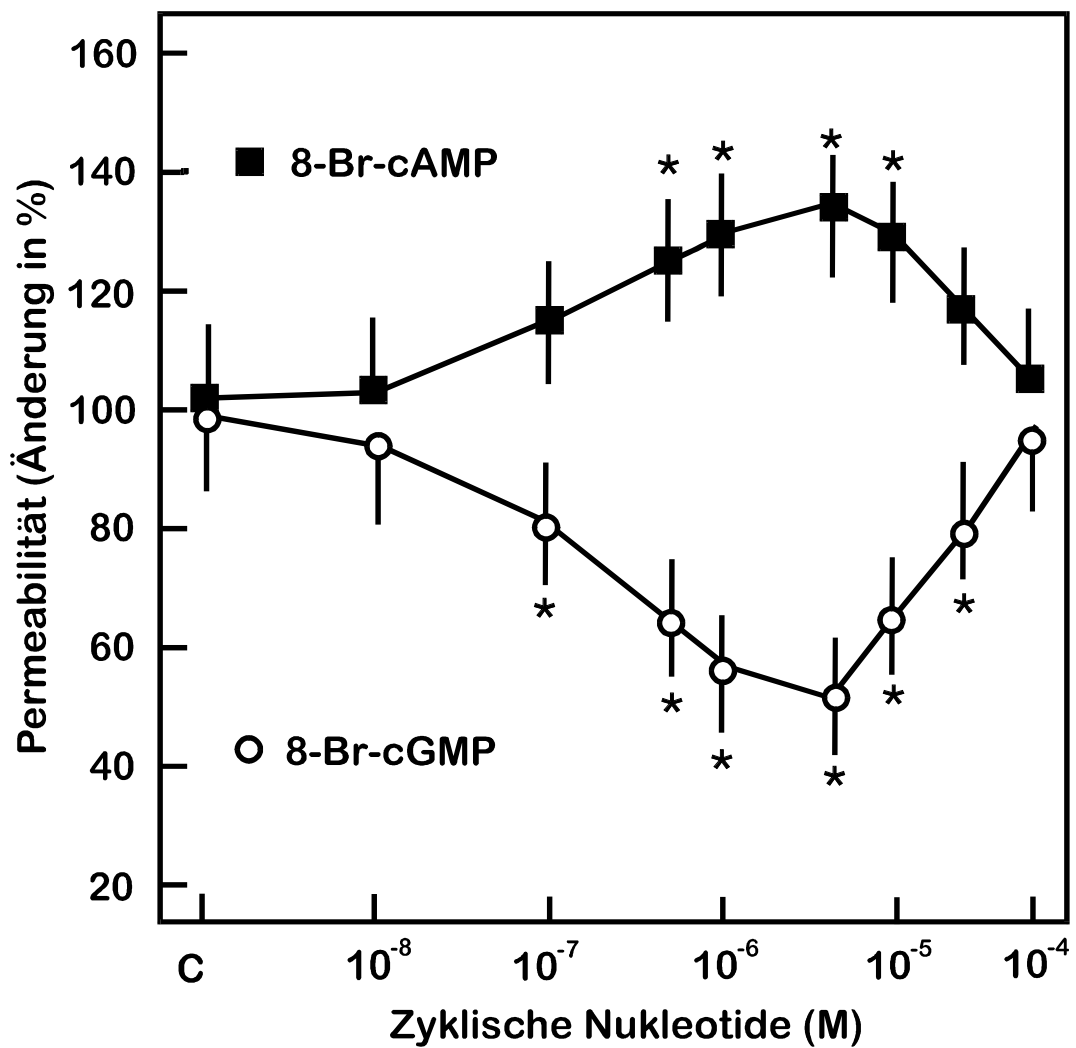


Abb.1: Konzentrationsabhängige Einflüsse von 8-Br-cGMP und 8-Br-cAMP auf die koronar-endotheliale Permeabilität. Jeweils 30. Minute nach Zugabe. Die Ausgangspermeabilität betrug $5,45 \times 10^{-6}$ cm/s und wurde als 100% gewählt. Bei 5×10^{-6} M ergaben sich jeweils optimale Wirkungskonzentrationen. CEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.1.1.3 Zeitverlauf der 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP-Wirkung

Abbildung 2 zeigt den Zeitverlauf der Permeabilität über 100 Minuten nach Zugabe von 8-Br-cAMP bzw. 8-Br-cGMP mit der jeweils am stärksten die Permeabilität beeinflussenden Konzentration von jeweils $5 \times 10^{-6} \text{M}$ (vergleiche Abb. 1). Sie erreichte sowohl für 8-Br-cAMP als auch für 8-Br-cGMP jeweils nach 30 min ein Optimum von $38\% \pm 5\%$ bzw. $-49\% \pm 5\%$ (Abb.2).

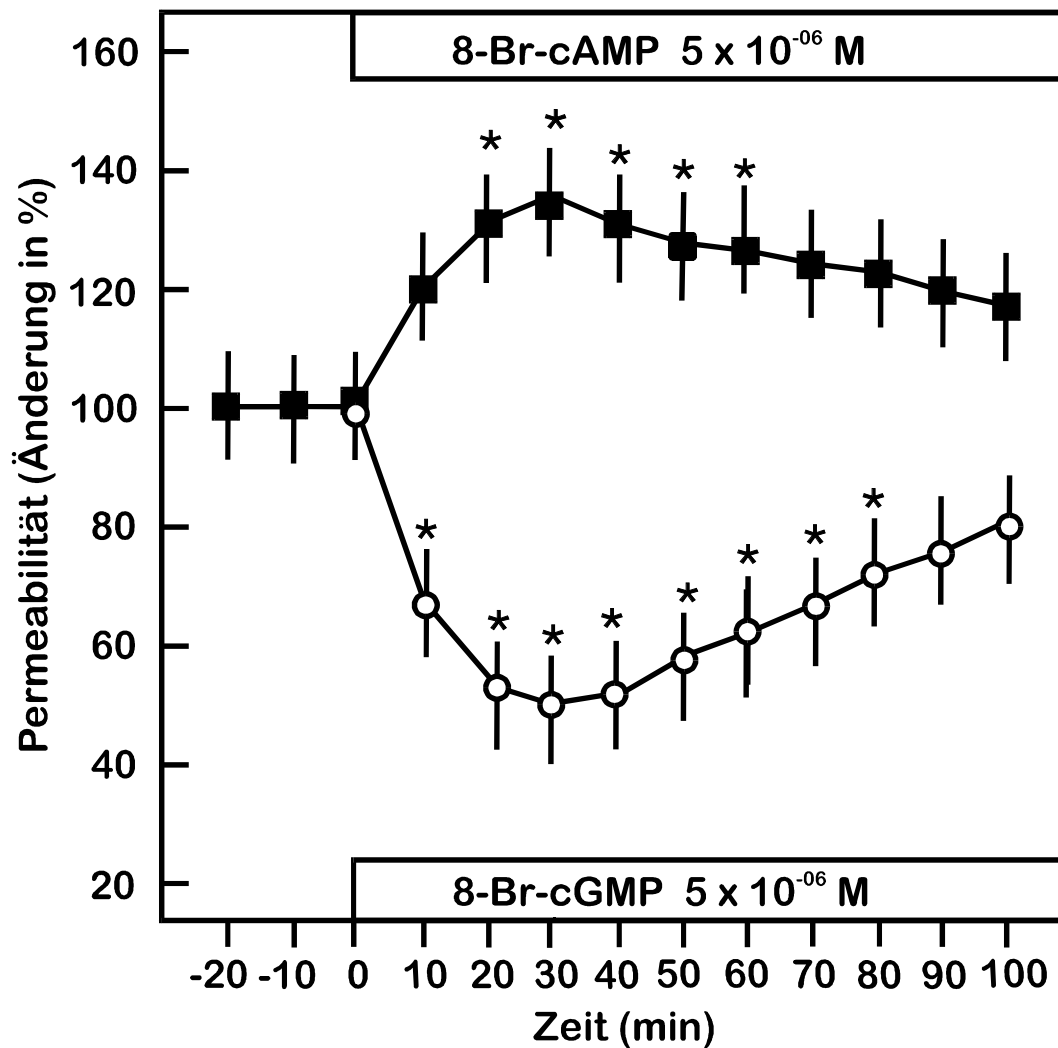


Abb.2: 100 Minuten Zeitverlauf der Permeabilität nach Zugabe von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP (je $5 \times 10^{-6} \text{M}$) in CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ unabhängige Experimente, $*p < 0,05$ vs. Kontrolle C.

4.1.2 Wirkung von ANP

4.1.2.1 Einfluß von ANP auf die zellulären Nukleotidspiegel

4.1.2.1.1 cAMP-Spiegel

ANP (100nM) senkte den cAMP-Spiegel in koronaren Endothelmonolayern ab. Der basale cAMP-Spiegel - gleichgesetzt mit 100% - betrug 1700 fmol/mg Protein. Die Gegenwart von ANP bewirkte innerhalb von 10 Minuten eine Abnahme der zellulären cAMP-Spiegel, die bei einer ANP-Konzentration von 100nM mit $55\% \pm 8\%$ ein Optimum erreichte (Abb.3a).

4.1.2.1.2 cGMP-Spiegel

Es wurde der cGMP-Spiegel bei optimaler Wirkung von ANP auf die Permeabilität in koronaren Endothelmonolayern gemessen. ANP bewirkte eine 4,5-fache Zunahme des basalen cGMP-Spiegels von 400 (100%) auf 1800 fmol/mg Protein ($450\% \pm 15\%$) (Abb.3b).

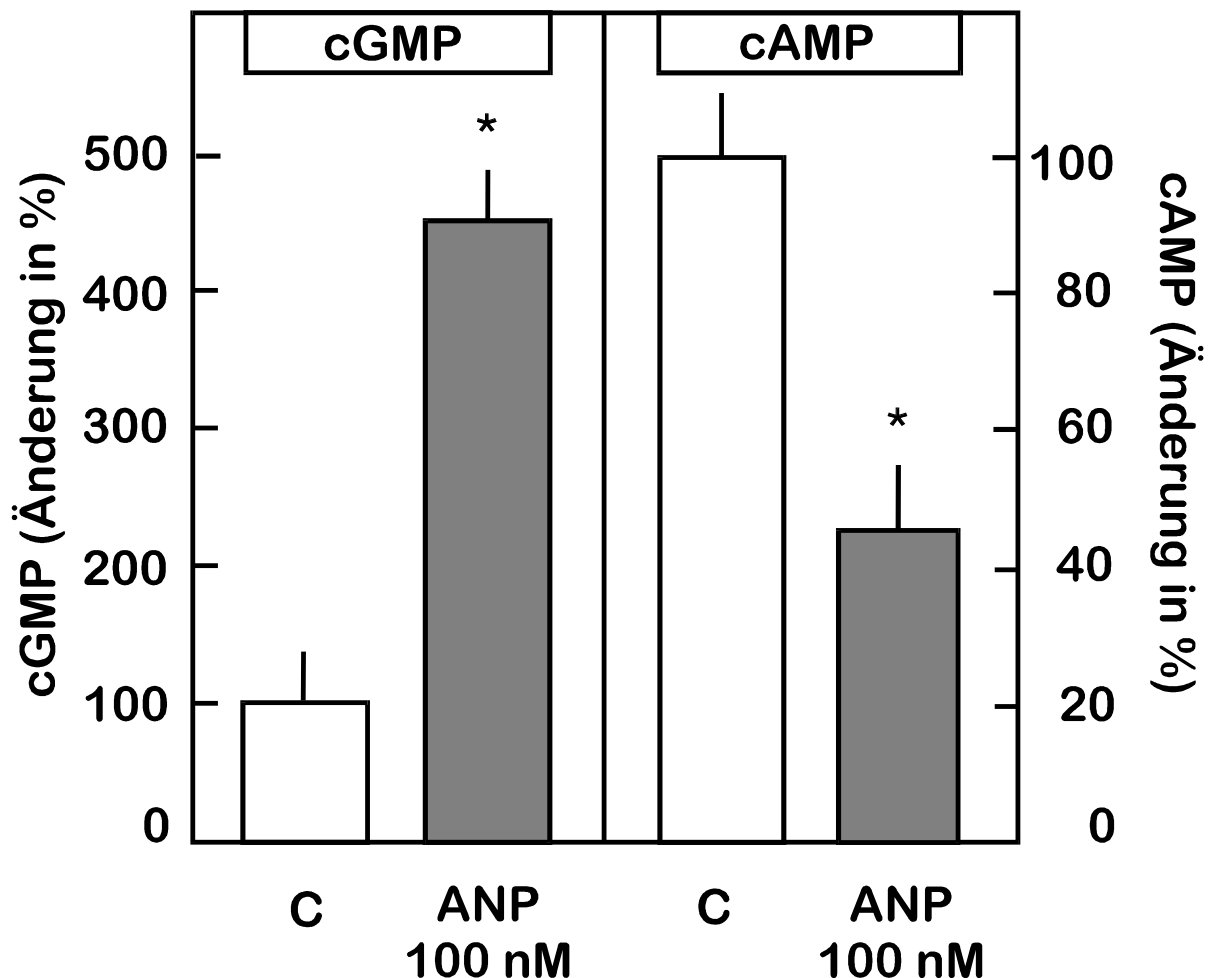


Abb.3 a/b: Einfluß von ANP (100nM) auf die zellulären cGMP- (3a) bzw. cAMP- (3b) Spiegel in CEC. Der basale Gehalt der Kontrollen betrug für cAMP 1700 fmol/mg Protein und für cGMP 400 fmol/mg Protein. CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C.

4.1.2.2 Einfluß von ANP auf die Permeabilität

4.1.2.2.1 Konzentrationsreihe

ANP führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Permeabilität (Abb.4). Die Permeabilitätsabnahme war ab einer Konzentration von 10nM bis 100nM signifikant und erreichte bei einer Konzentration von 100nM mit einer Abnahme von 48% +/- 7% ein Optimum. Dieses wurde wiederum in der 30. Minute nach Zugabe erreicht und deshalb dieser Zeitpunkt für die vergleichende Darstellung der Permeabilitäten verwendet. Geringere ANP-Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Permeabilität.

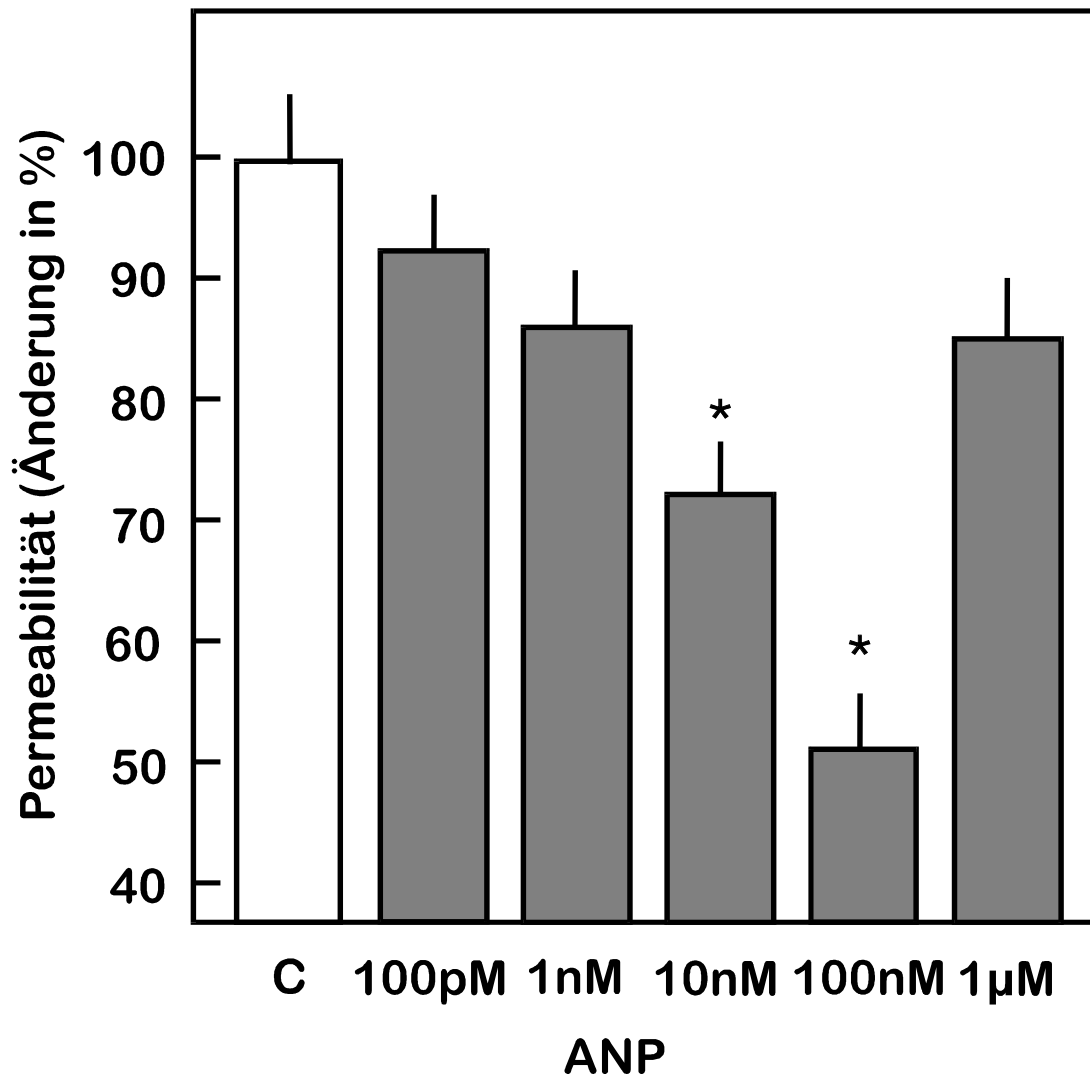


Abb.4: Konzentrationsabhängiger Einfluß von ANP (100nM) auf die Albuminpermeabilität. CEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs.Kontrolle C.

4.1.2.2.2 Zeitverlauf

Im Zeitverlauf über 100 Minuten erreichte ANP (100nM) ab der 10. Minute eine signifikante Abnahme der Permeabilität und erlangte in der 30. Minute mit 48% +/- 7% ein Maximum (Abb.5).

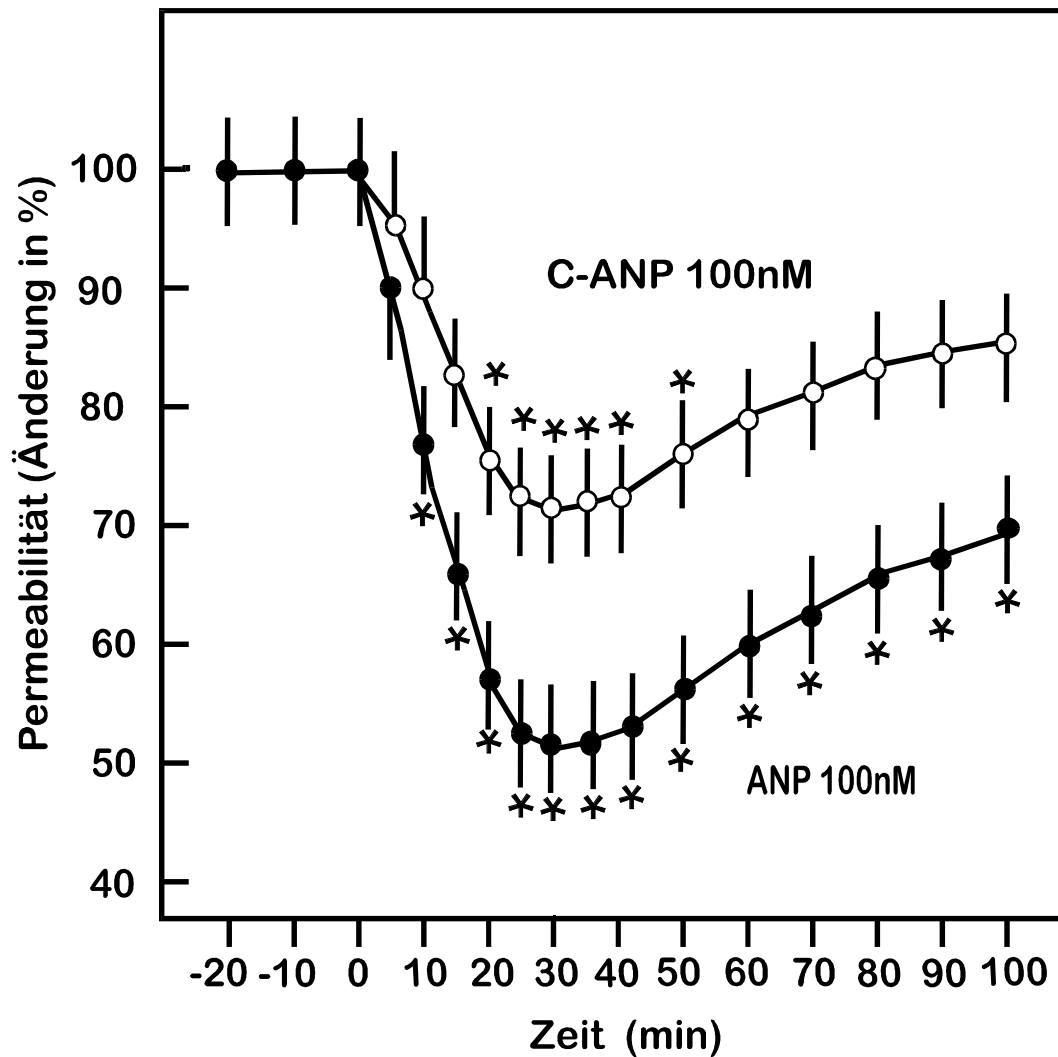


Abb.5: Zeitabhängiger Einfluß von ANP (100nM) und C-ANP (100nM) auf die Albuminpermeabilität von CEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.1.3 Wirkung von C-ANP

4.1.3.1 Einfluß von C-ANP auf die endothelialen Nukleotidspiegel

4.1.3.1.1 cAMP-Spiegel

Die Gegenwart von C-ANP bewirkte innerhalb von 10 Minuten eine Abnahme der zellulären cAMP-Spiegel um 28% +/- 7% (Abb.6b).

4.1.3.1.2 cGMP-Spiegel

C-ANP (100nM) zeigte keinen Einfluß auf die zellulären cGMP-Spiegel in koronaren Endothelzellmonolayern (Abb.6a).

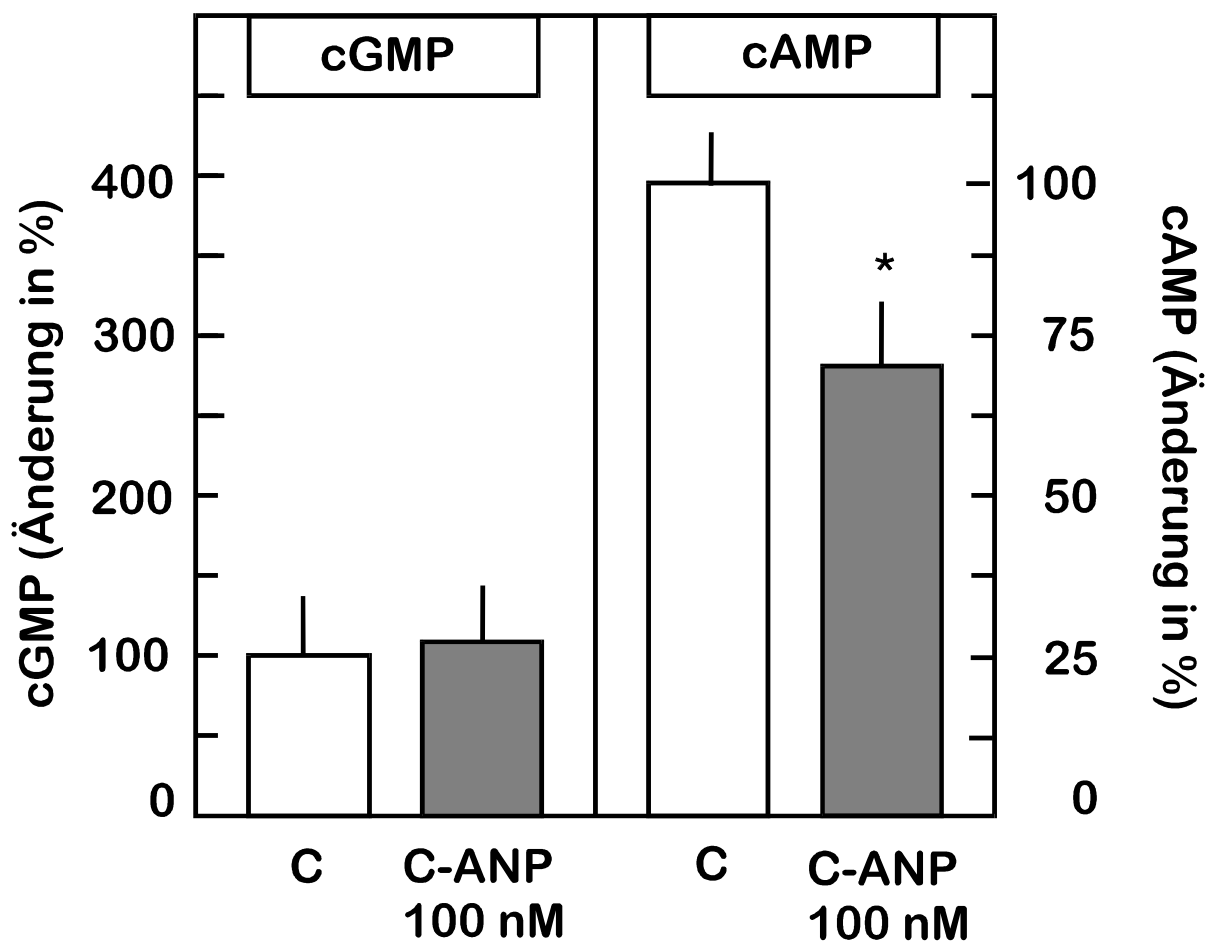


Abb.6a/b: Einfluß von C-ANP (100nM) auf die zellulären cGMP- (6a) und cAMP- (6b) Spiegel in CEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.1.3.2 Einfluß von C-ANP auf die Permeabilität

4.1.3.2.1 Konzentrationsreihe

C-ANP führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Permeabilität (Abb.7). Die Permeabilitätsabnahme war bei den Konzentrationen von 10nM und 100nM signifikant. 100nM erniedrigte die Permeabilität mit $28 \pm 6\%$ am stärksten.

Geringere bzw. höhere C-ANP-Konzentrationen zeigten im Trend zwar einen gleichgerichteten Effekt auf die endotheliale Permeabilität. Diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant. Das Optimum der Permeabilitätsänderung wurde auch unter C-ANP in der 30. Minute der Zugabe erreicht, und deshalb dieser Zeitpunkt für die vergleichende Darstellung verwendet.

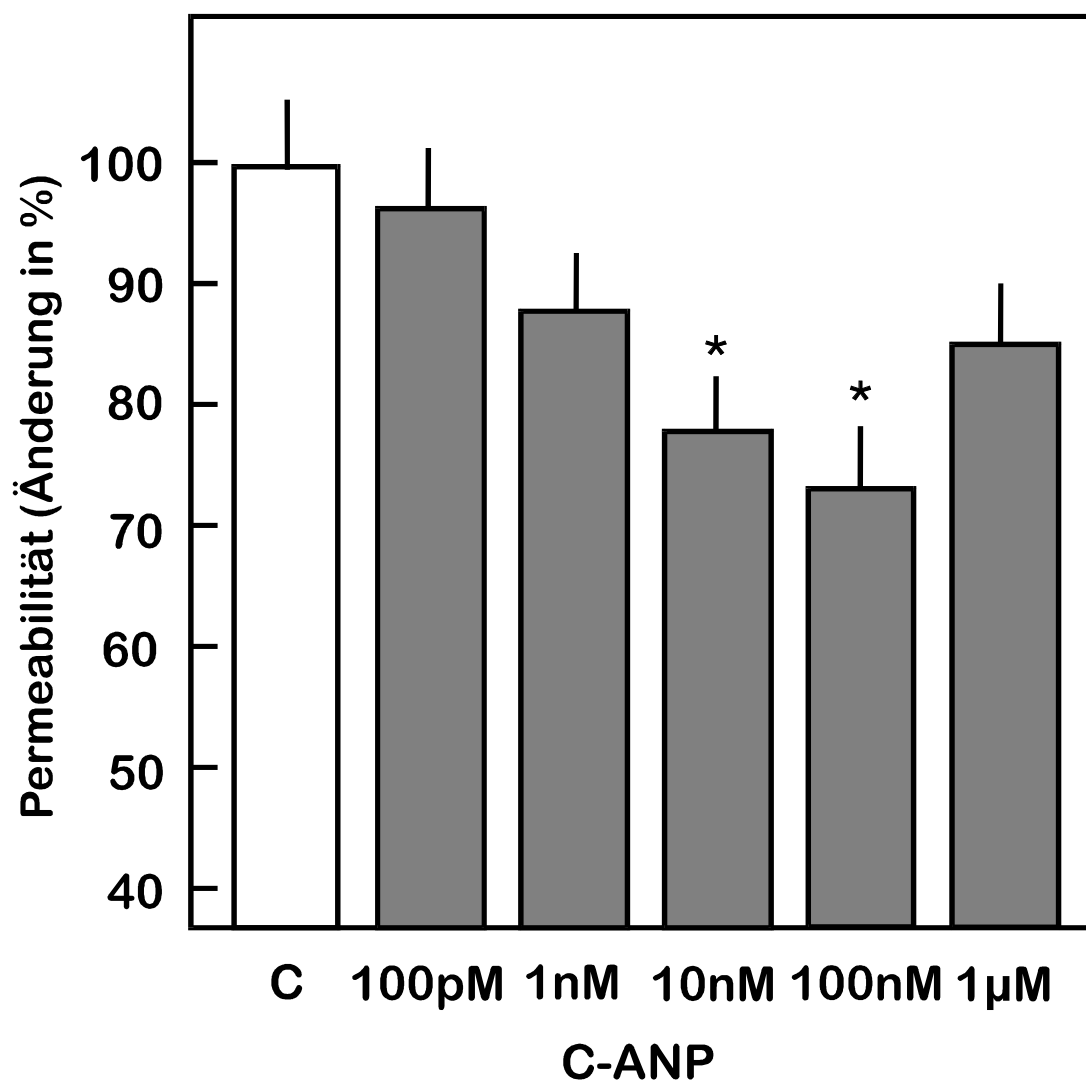


Abb.7: Konzentrationsabhängiger Einfluß von C-ANP (100nM) auf die Permeabilität. CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C.

4.1.3.2.2 Zeitverlauf

Im Zeitverlauf über 100 Minuten war die Abnahme der Permeabilität in Gegenwart von C-ANP (100nM) ab der 20. Minute signifikant und erreichte in der 30. Minute das Optimum von $28 \pm 6\%$ (Abb.5).

4.1.4 Wirkung von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin

4.1.4.1 Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität

In Gegenwart von Pertussistoxin ($1\mu\text{M}$) bewirkte ANP ebenfalls eine Abnahme der Permeabilität. Diese betrug jedoch nur $26 \pm 5\%$ (Abb.8b).

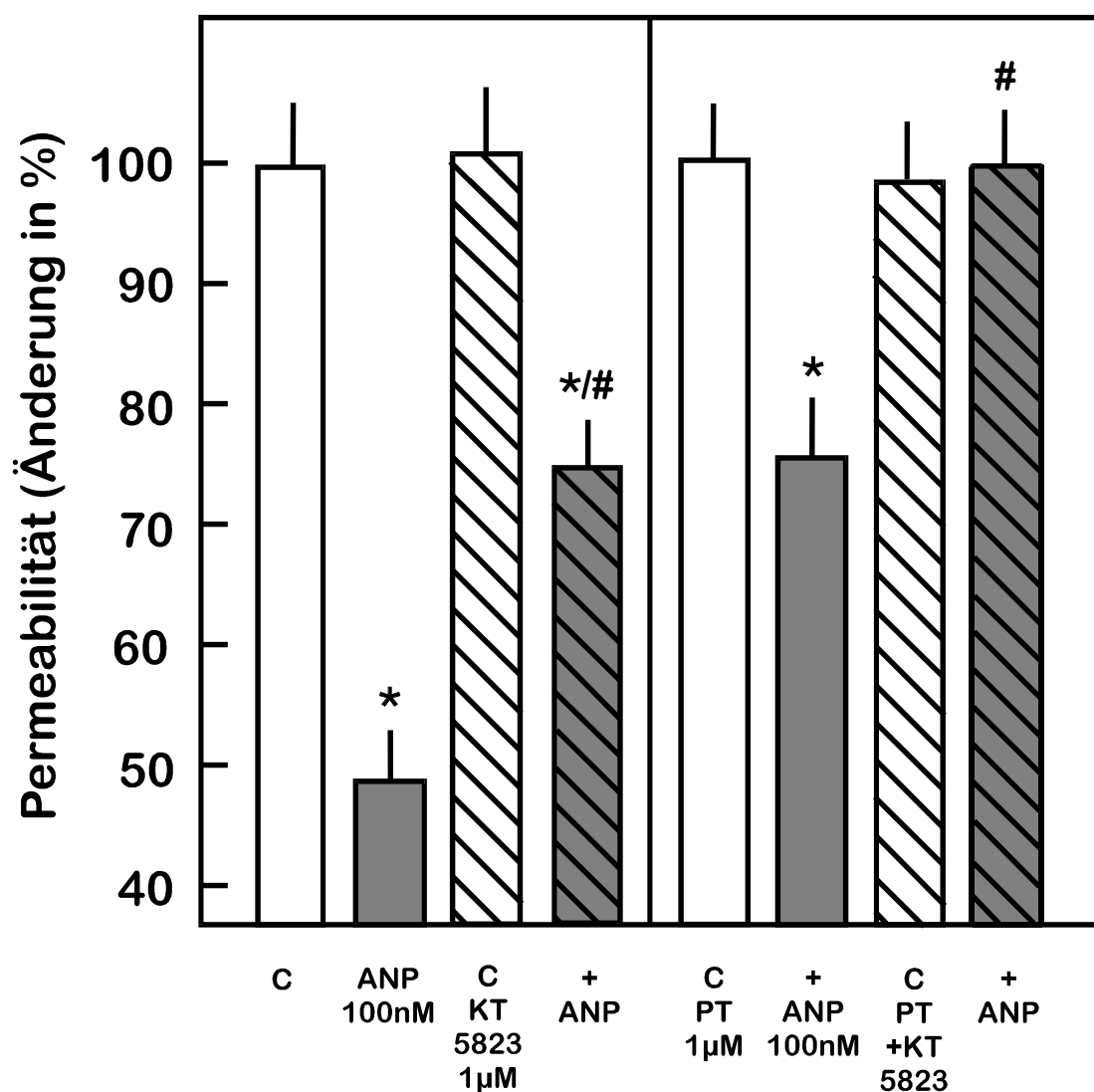


Abb.8a/b: Der permeabilitätssenkende Einfluß von ANP wird in Gegenwart des Proteinkinase G - Hemmstoffes KT 5823 ($1\mu\text{M}$) (8a) teilweise aufgehoben. In Gegenwart von Pertussistoxin – Hemmstoff des Gi-Proteins der Adenylatzyklase (= Negativkontrolle) - ist der permeabilitätssenkende Einfluß von ANP (8b) ebenfalls verringert, bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinkinase G (KT 5823 - $1\mu\text{M}$) wird die ANP-Wirkung vollständig aufgehoben. CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C, # $p < 0,05$ vs. ANP allein.

4.1.4.2 Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf cAMP-Spiegel

ANP bewirkte auch in Gegenwart von Pertussistoxin ($1\mu\text{M}$) eine Abnahme der endothelialen cAMP-Spiegels. Dieser war jedoch nur bei einer ANP-Konzentration von 100nM signifikant und mit $23\% \pm 5\%$ deutlich geringer als die cAMP-Abnahme ohne Beeinflussung von Pertussistoxin (Abb.9a).

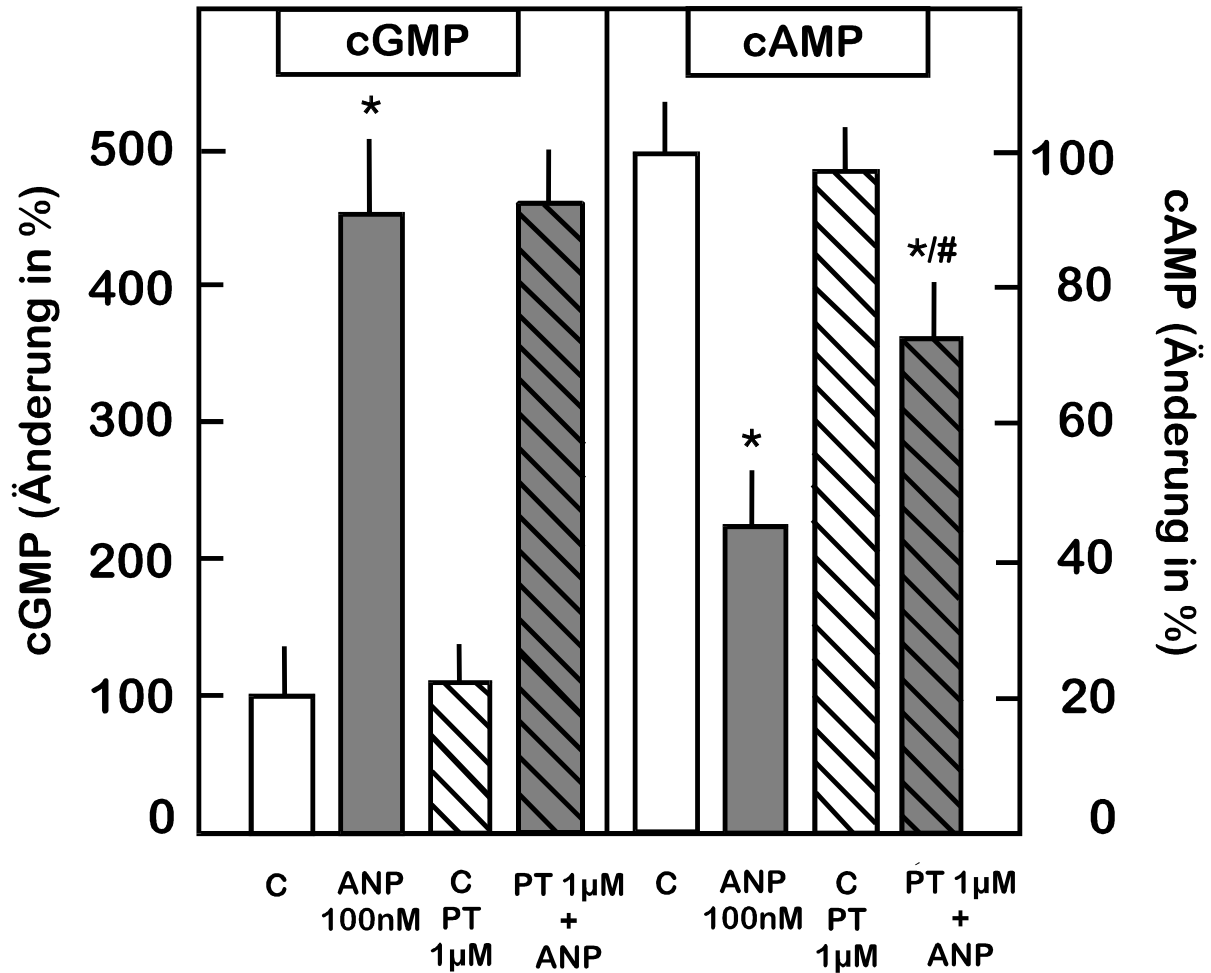


Abb.9a: Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die zellulären Spiegel von cGMP und cAMP. CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C, # $p < 0,05$ vs. ANP allein.

4.1.5 Wirkung von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin

4.1.5.1 Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität

In Gegenwart von Pertussistoxin ($1\mu\text{M}$) wurde der permeabilitätsabsenkende Effekt von C-ANP (100nM) aufgehoben (Abb.10b). Auch höhere oder geringere C-ANP-Konzentrationen zeigten keinen Einfluß auf die Permeabilität.

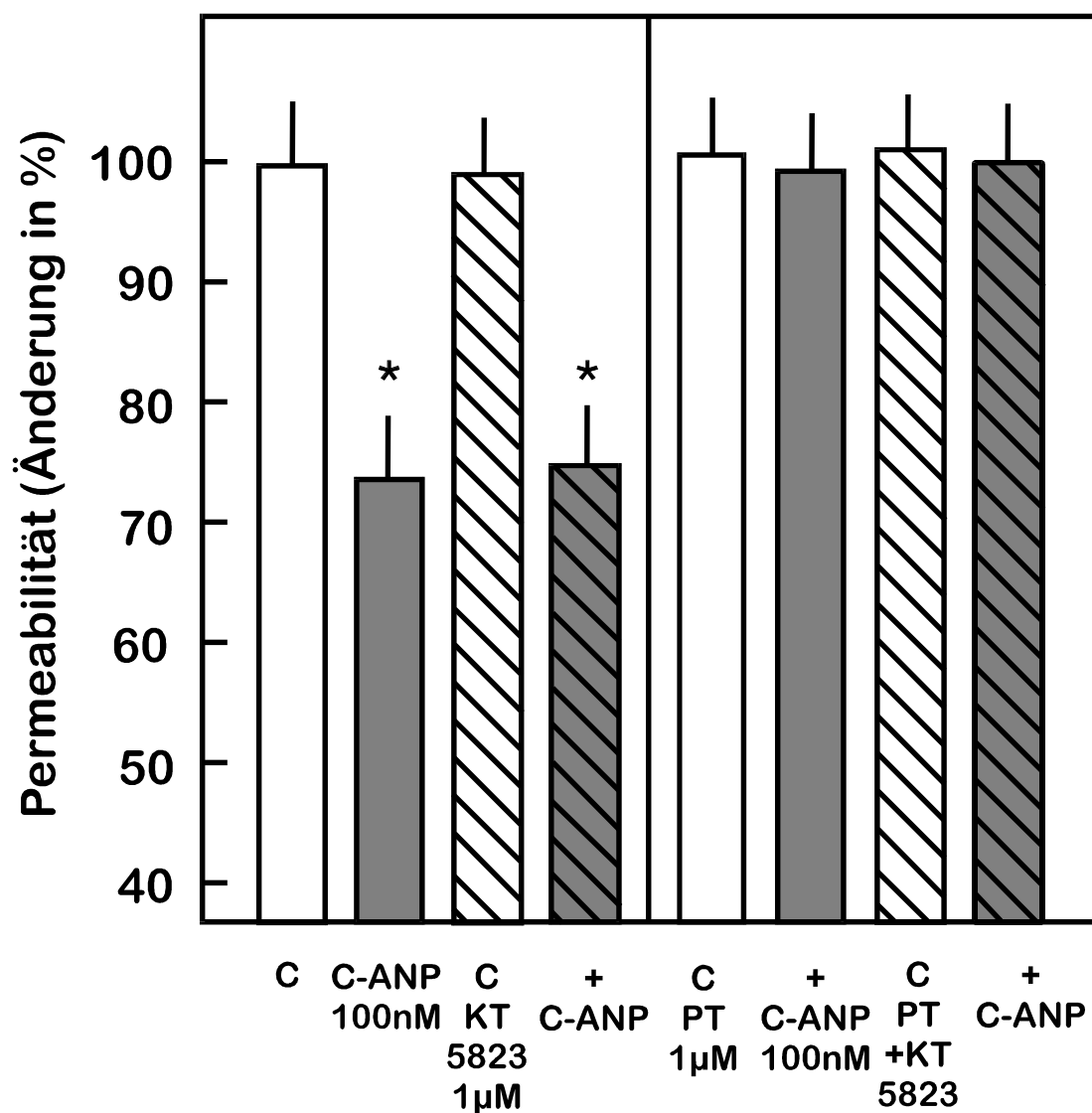


Abb.10a/b: Der permeabilitätssenkende Einfluß von C-ANP (100nM) wird von KT 5823 ($1\mu\text{M}$) (10a) nicht beeinflusst. Pertussistoxin ($1\mu\text{M}$) hebt den permeabilitätssenkenden Einfluß von C-ANP (100nM) auf (10b). KT 5823 ($1\mu\text{M}$) bleibt ohne Effekt. CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C.

4.1.5.2 Einfluß von C-ANP in Gegenwart Pertussistoxin auf die cAMP-Spiegel

Der cAMP-absenkende Effekt von C-ANP wurde in Gegenwart von Pertussistoxin (1 μ M) aufgehoben (Abb.9b).

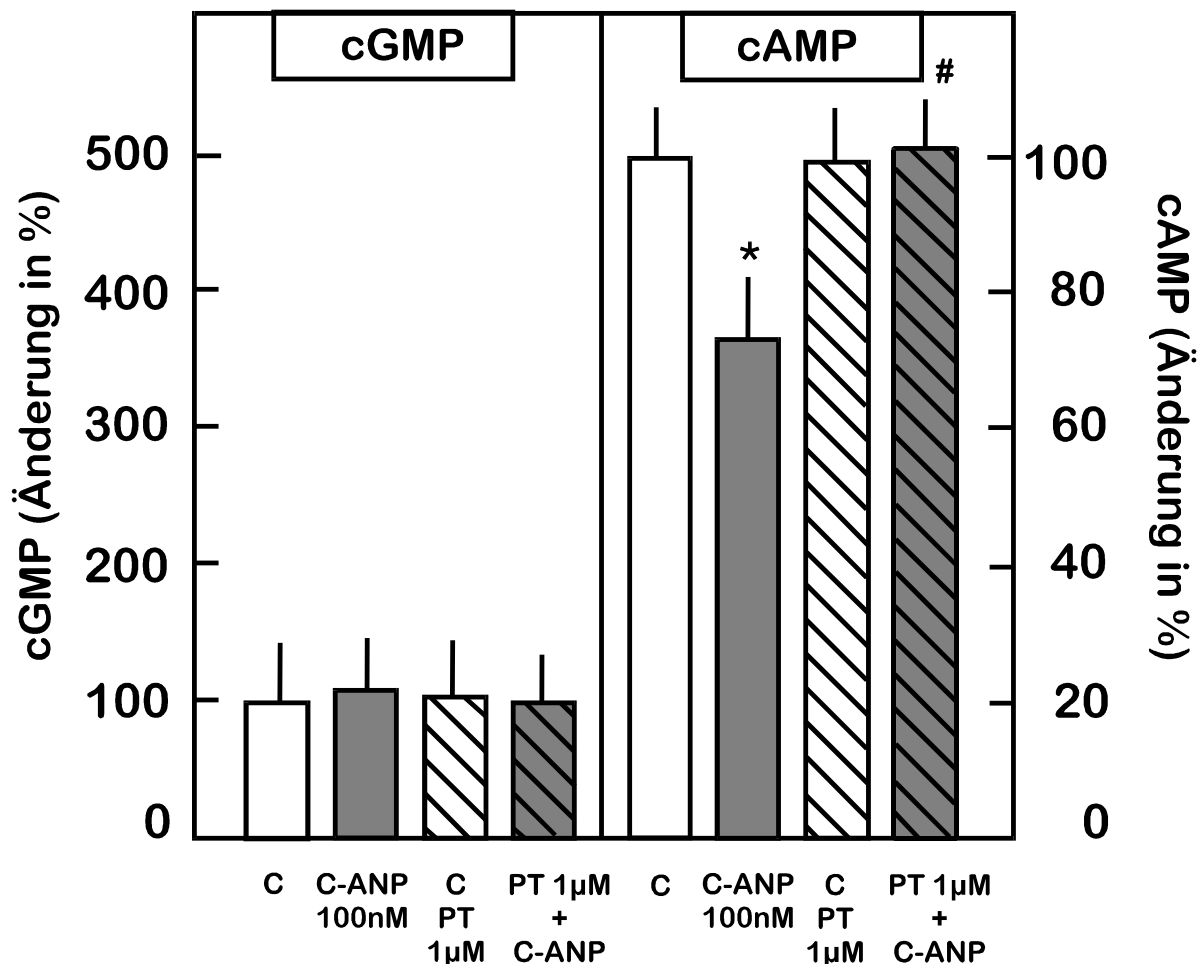


Abb.9b: Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die zellulären Spiegel von cGMP und cAMP. CEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C, # p<0,05 vs. ANP allein.

4.1.6 Wirkung von ANP auf die Permeabilität in Gegenwart von KT 5823

Der permeabilitätsabsenkende Einfluß von ANP (100nM) wurde in Gegenwart von KT 5823 (1 μ M) vermindert. Er betrug nur noch $25\% \pm 5\%$ gegenüber $48 \pm 7\%$ in Gegenwart von ANP (100nM) allein (Abb.8a).

4.1.7 Wirkung von C-ANP auf die Permeabilität in Gegenwart von KT 5823

Der permeabilitätsabsenkende Effekt von C-ANP (100nM) wurde durch die Gegenwart von KT 5823 nicht beeinflusst (Abb.10a).

4.1.8 Wirkung von ANP auf die Permeabilität in Gegenwart von Pertussistoxin und KT 5823

Bei gleichzeitigem Einsatz von Pertussistoxin (1 μ M) und KT 5823 (1 μ M) wurde der Einfluß von ANP (100nM) auf die Permeabilität aufgehoben (Abb.8b).

4.2 Makrovaskuläre Endothelzellen

4.2.1 Wirkung von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP auf die Permeabilität

4.2.1.1 Konzentrationsreihe mit 8-Br-cAMP

8-Br-cAMP (Abb.11) führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Permeabilität in aortalen Endothelmonolayern. Die Ausgangspermeabilität gleichgesetzt mit 100% betrug $5,5 \times 10^{-6}$ cm/s. Ab einer Konzentration von 1×10^{-7} M bis 5×10^{-5} M war die Permeabilitätsabnahme signifikant und erreichte bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M in der 30. Minute mit einer Abnahme von $41\% \pm 5\%$ ein Optimum. Auch in allen folgenden Abbildungen wurde die 30. Minute für den Vergleich der Permeabilität herangezogen. Geringere bzw. höhere 8-Br-cAMP-Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Permeabilität.

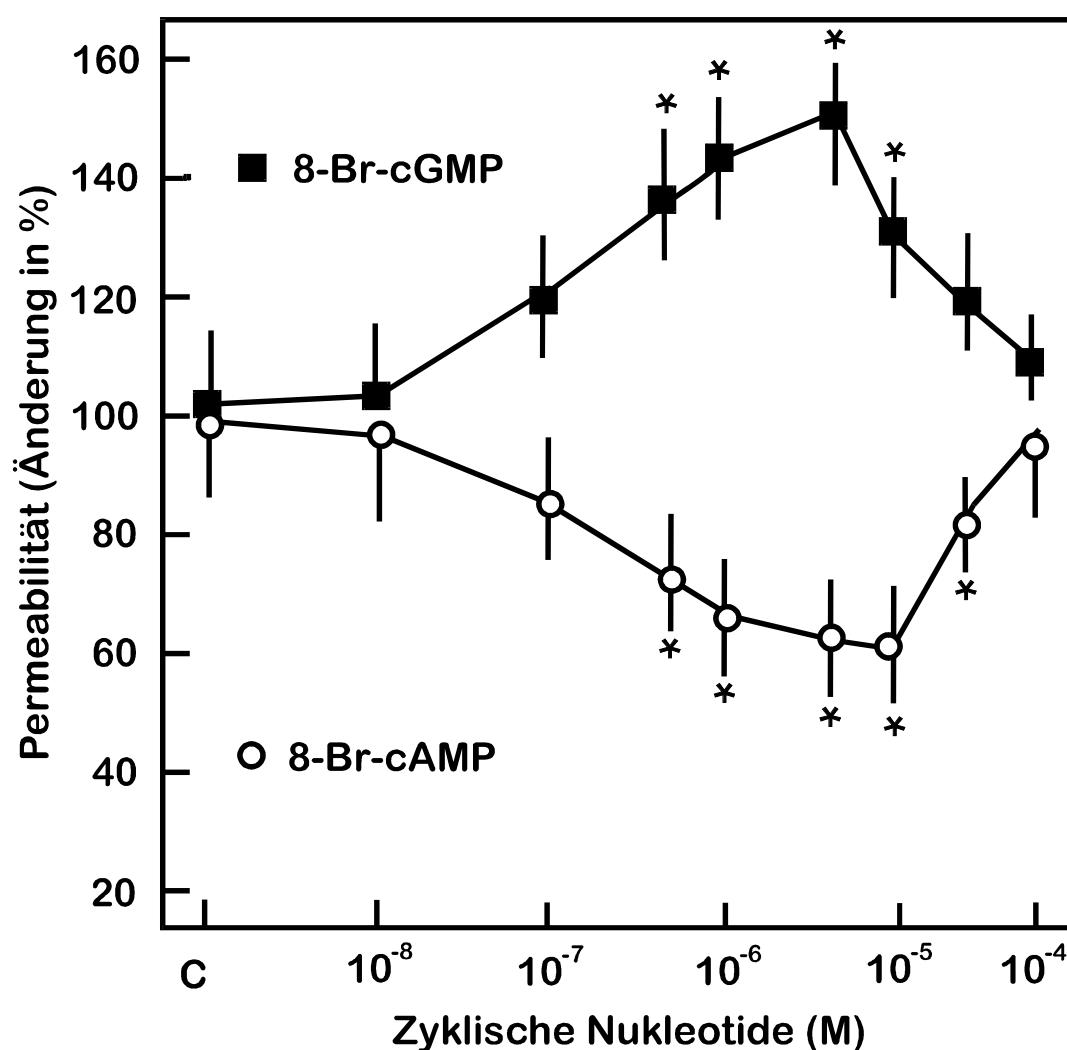


Abb.11: Konzentrationsabhängige Einflüsse von 8-Br-cGMP und 8-Br-cAMP auf die aortalendotheliale Permeabilität. 30. Minute nach Zugabe. Die Ausgangspermeabilität betrug $5,5 \times 10^{-6}$ cm/s und wurde gleich 100% gesetzt. Bei 5×10^{-6} M ergaben sich jeweils optimale Wirkungskonzentrationen. AEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p < 0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.1.2 Konzentrationsreihe mit 8-Br-cGMP

8-Br-cGMP (Abb.11) führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Permeabilität. Sie war ab einer Konzentration von 1×10^{-7} bis 5×10^{-5} M signifikant und erreichte bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M mit einer Zunahme von $49\% \pm 5\%$ ein Maximum.

Geringere bzw. höhere 8-Br-cGMP-Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluß auf die Permeabilität.

4.2.1.3 Zeitverlauf der 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP- Wirkung

Abbildung 12 zeigt den Zeitverlauf der AEC – Permeabilitätswerte über 100 Minuten nach Zugabe von 8-Br-cAMP- bzw. 8-Br-cGMP, in der jeweils optimalen Konzentration von 5×10^{-6}

M. Sie erreichten sowohl für 8-Br-cAMP als auch für 8-Br-cGMP jeweils in der 30. Minute Optima von $-41\% \pm 5\%$ bzw. $49\% \pm 5\%$ (Abb.12) und näherten sich bis zur 90. Minute der Ausgangspermeabilität an, ohne sie jedoch ganz zu erreichen.

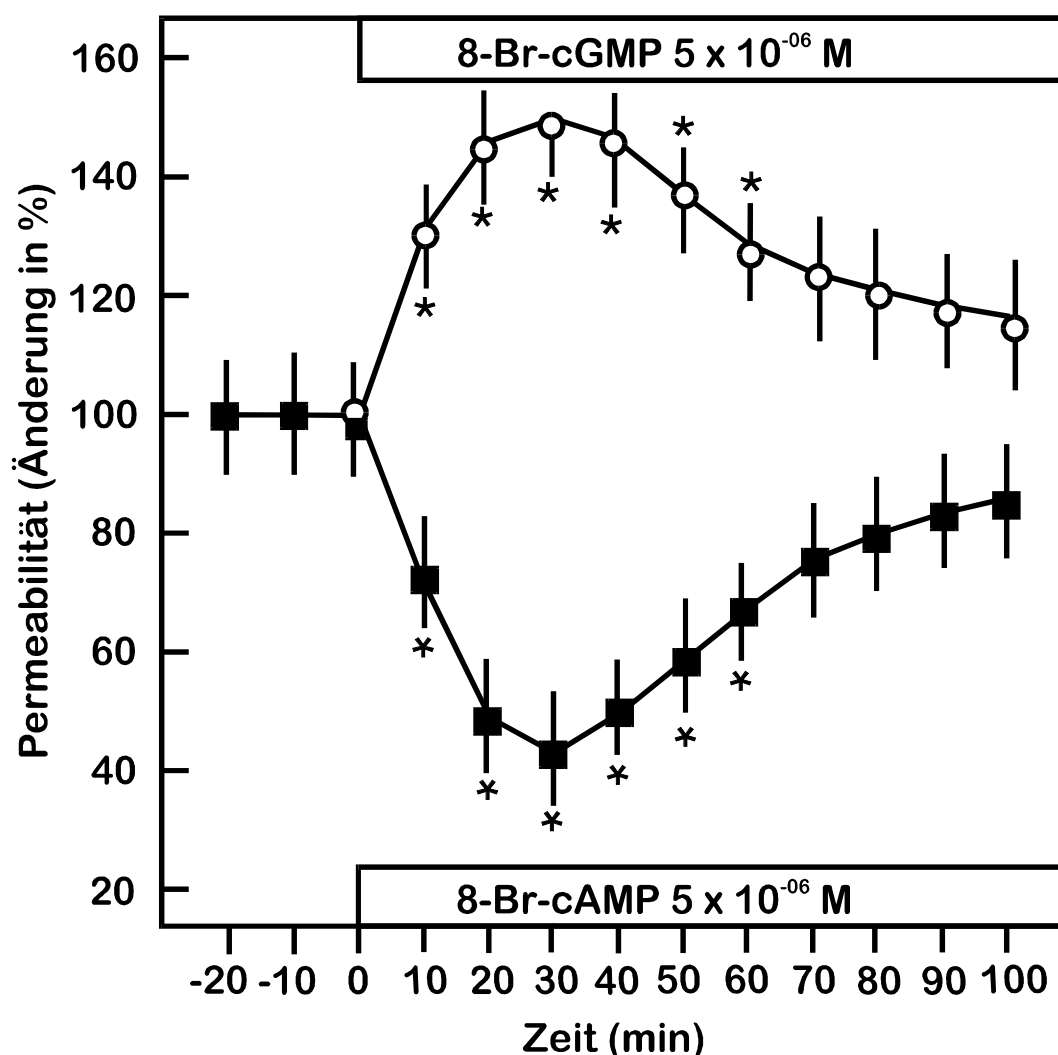


Abb.12: 100 Minuten Zeitverlauf der Permeabilität nach Zugabe von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP (je 5×10^{-6} M) in AEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.2 Wirkung von ANP

4.2.2.1 Einfluß von ANP auf die endothelialen Nukleotidspiegel

4.2.2.1.1 cAMP-Spiegel

ANP (100nM) senkte den cAMP-Spiegel in aortalen Endothelmonolayern. Der basale cAMP-Spiegel gleichgesetzt mit 100% betrug 1550 fmol/mg Protein. Die Gegenwart von ANP bewirkte innerhalb von 10 Minuten eine Abnahme der zellulären cAMP-Spiegel, die bei einer ANP-Konzentration von 100nM mit $55\% \pm 8\%$ ein Optimum erreichte (Abb.13b).

4.2.2.1.2 cGMP-Spiegel

Es wurde der cGMP-Spiegel bei optimaler Wirkung von ANP auf die Permeabilität in aortalen Endothelmonolayern gemessen. ANP (100nM) bewirkte eine 4,8-fache Zunahme des basalen cGMP-Spiegels von 370 (100%) auf 1776 fmol/mg Protein ($480\% \pm 15\%$) (Abb 13a).

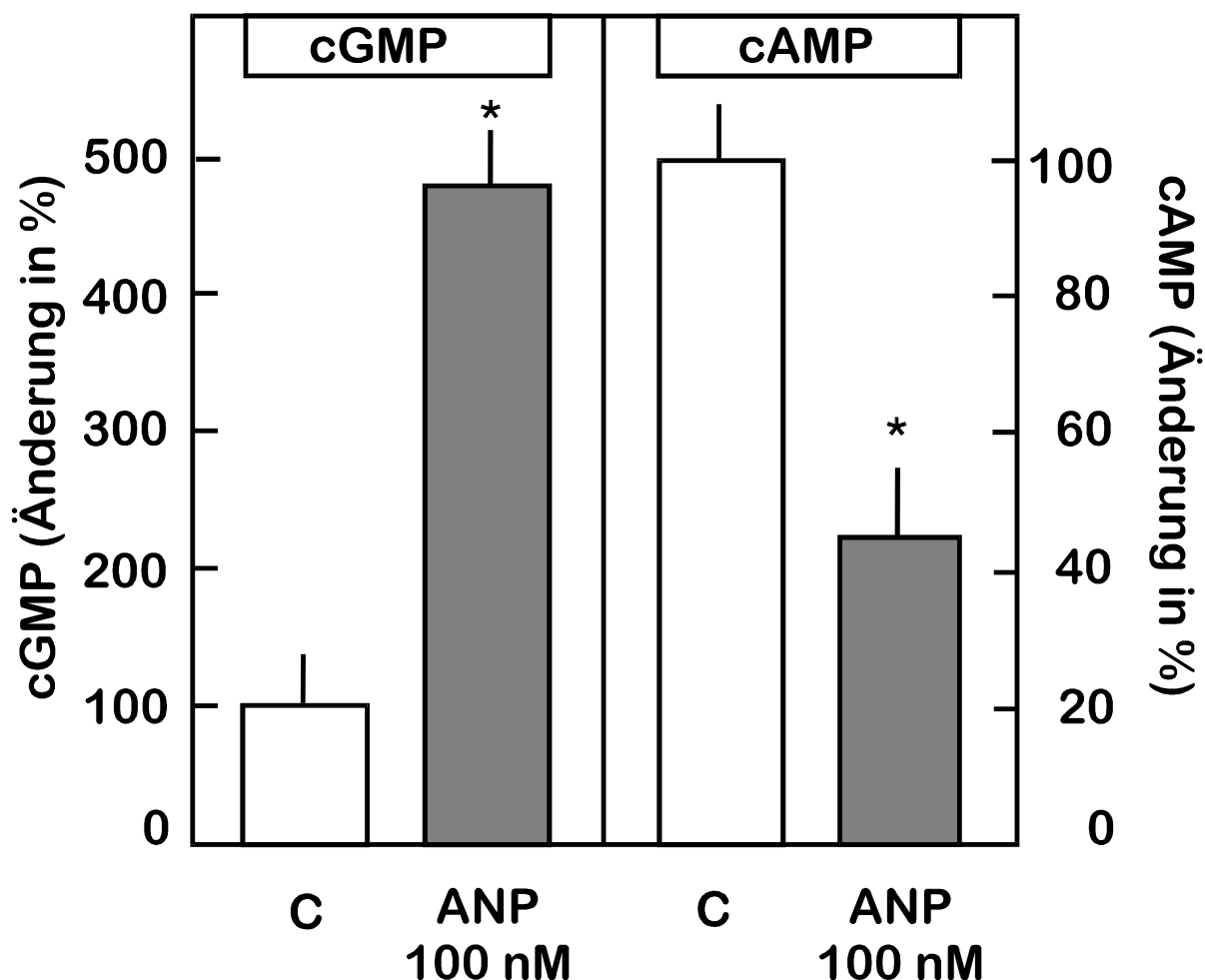


Abb.13 a/b: Einfluß von ANP (100nM) auf die zellulären cGMP- (13a) und cAMP- (13b) Spiegel in AEC. Der basale Gehalt der Kontrollen betrug für cAMP 1550 fmol/mg Protein und für cGMP 370 fmol/mg Protein. AEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C.

4.2.2.2 Einfluß von ANP auf die Permeabilität

4.2.2.2.1 Konzentrationsreihe

ANP bewirkte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Permeabilität (Abb.14). Die Permeabilitätserhöhung war ab einer Konzentration von 10nM signifikant und erlangte bei einer Konzentration von 100nM mit 49% +/- 8% ein Maximum. Die verwendete höhere ANP-Konzentration von 1µM zeigte wiederum einen geringeren Einfluß auf die Permeabilität .

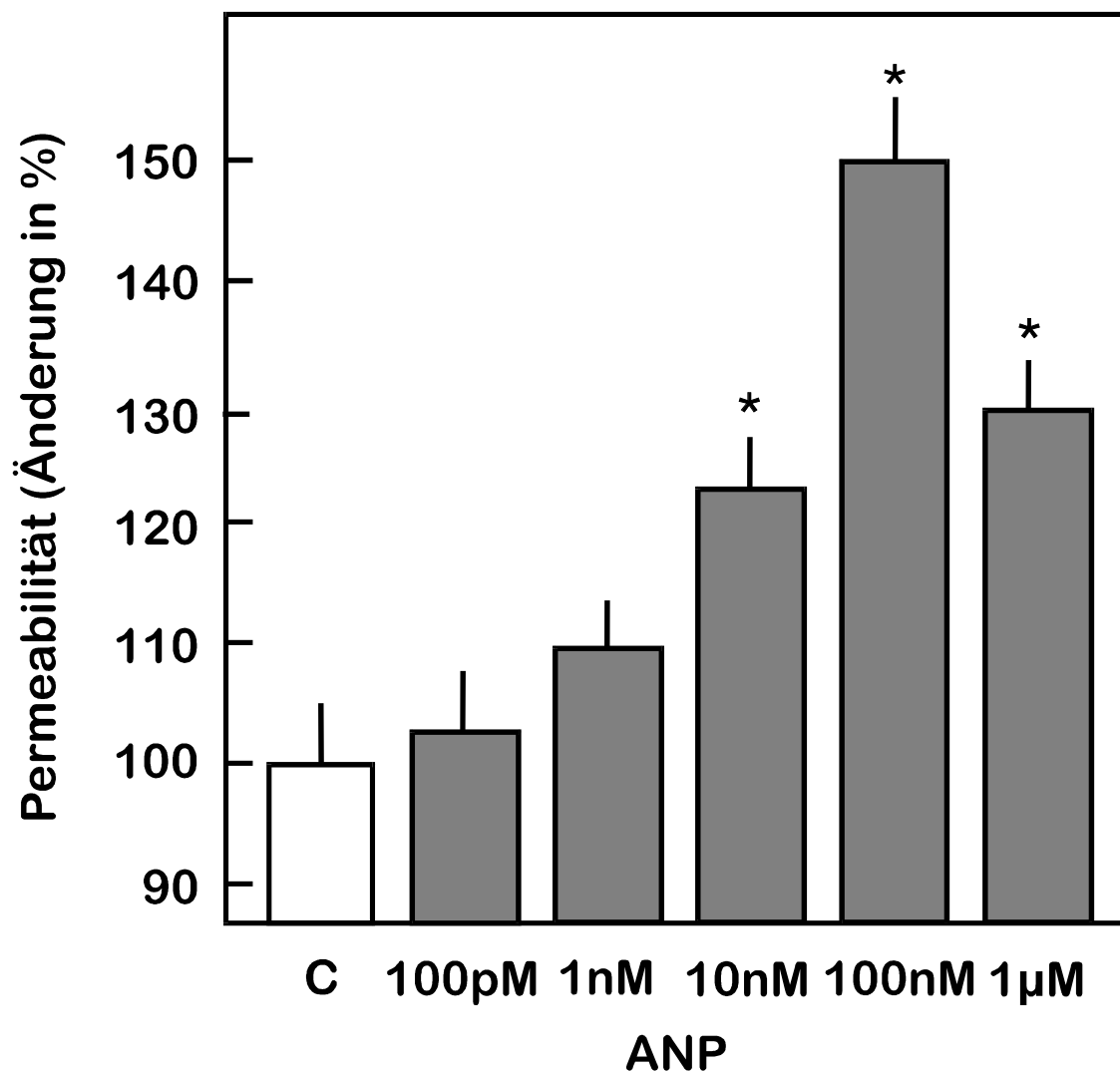


Abb.14: Konzentrationsabhängiger Einfluß von ANP (100nM) auf die Albuminpermeabilität. AEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.2.2.2 Zeitverlauf

Im 100-minütigen Zeitverlauf erlangte die ANP-Zugabe (100nM) innerhalb von 10 Minuten eine signifikante Erhöhung der Permeabilität und in der 30. Minute ein Maximum von 49% +/- 9% (Abb.15). Die Permeabilität näherte sich im weiteren Verlauf der Ausgangspermeabilität an, ohne sie jedoch zu erreichen.

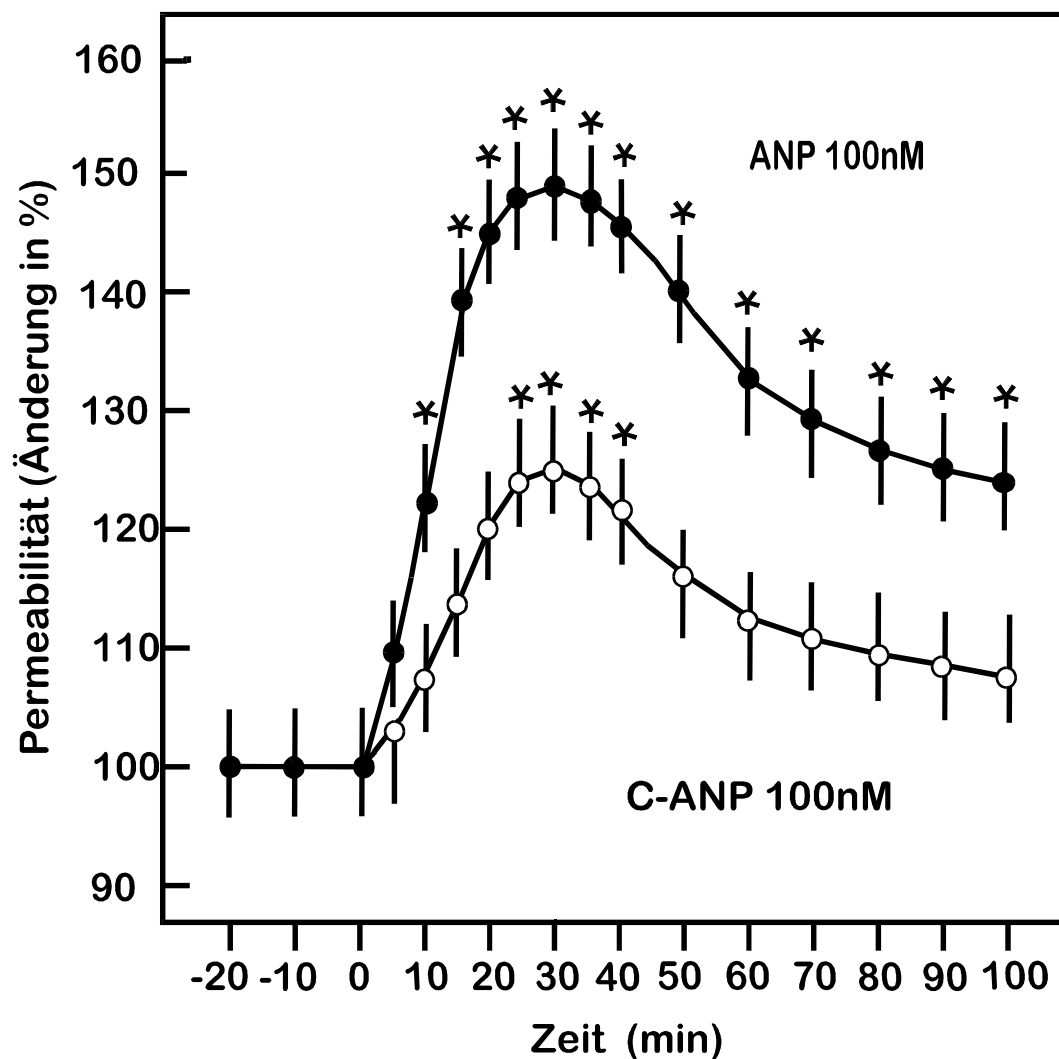


Abb.15: Zeitabhängiger Einfluß von ANP (100nM) und C-ANP (100nM) auf die Albuminpermeabilität von Monolayern in AEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.3 Wirkung von C-ANP

4.2.3.1 Einfluß von C-ANP auf die endothelialen Nukleotidspiegel

4.2.3.1.1 cAMP-Spiegel

Die Gegenwart von C-ANP (100nM) bewirkte innerhalb von 10 Minuten eine Abnahme des cAMP-Spiegel, der bei einer C-ANP -Konzentration von 100nM mit 35% +/-7% ein Maximum erreichte(Abb.16b).

4.2.3.1.2 cGMP-Spiegel

Die cGMP-Spiegel blieben nach Zugabe von C-ANP (100nM) unbeeinflusst (Abb.16a).

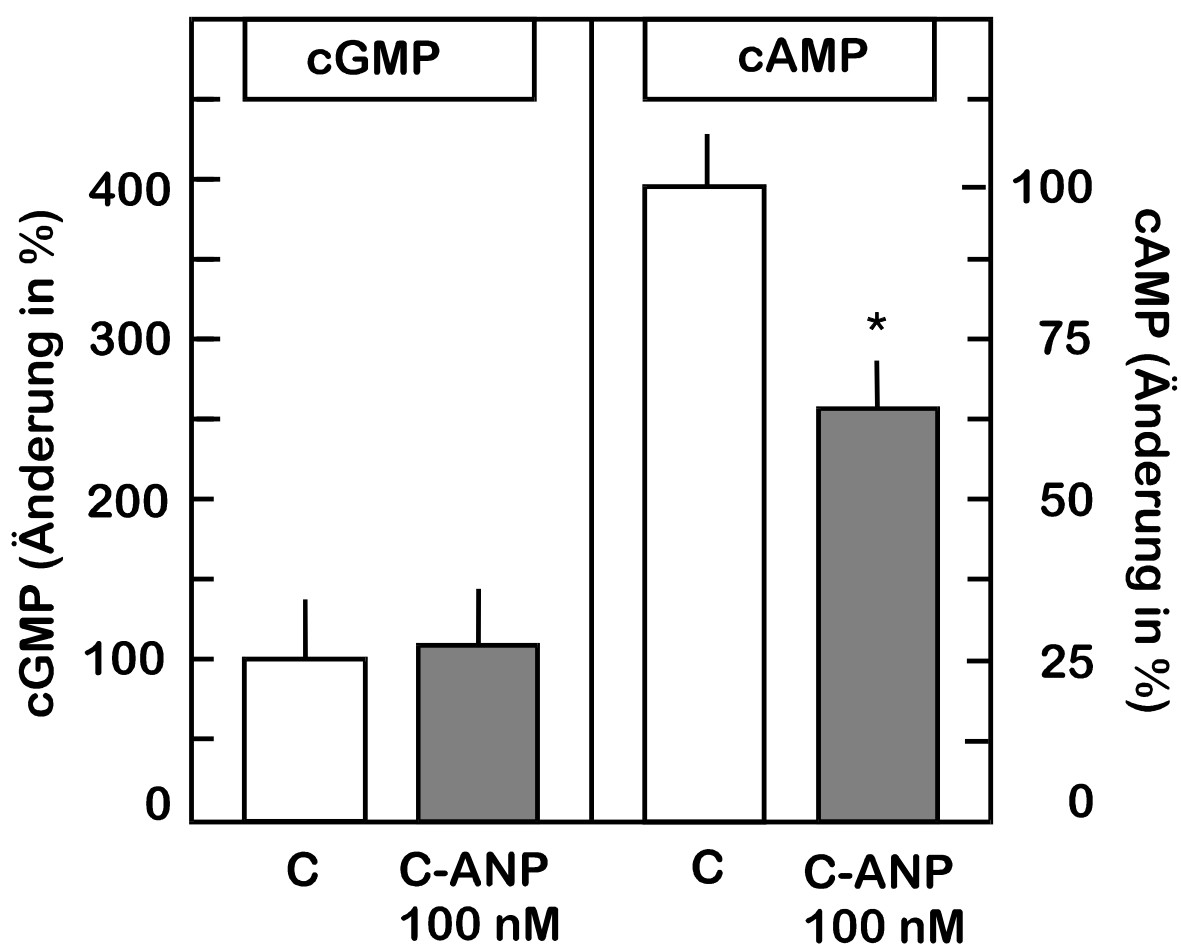


Abb.16a/b: Einfluß von C-ANP (100nM) auf die zellulären cGMP- (16b) und cAMP- (16a) Spiegel in AEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.3.2 Einfluß von C-ANP auf die Permeabilität

4.2.3.2.1 Konzentrationsreihe

C-ANP führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Permeabilität (Abb.17). Die Permeabilitätszunahme erreicht bei einer Konzentration von 100nM signifikant und erreichte mit einer Zunahme von 25% +/- 4% ein Maximum. Geringere bzw. höhere C-ANP-Konzentrationen zeigten im Trend zwar einen gleichgerichteten Effekt auf die Permeabilität, waren jedoch nicht signifikant.

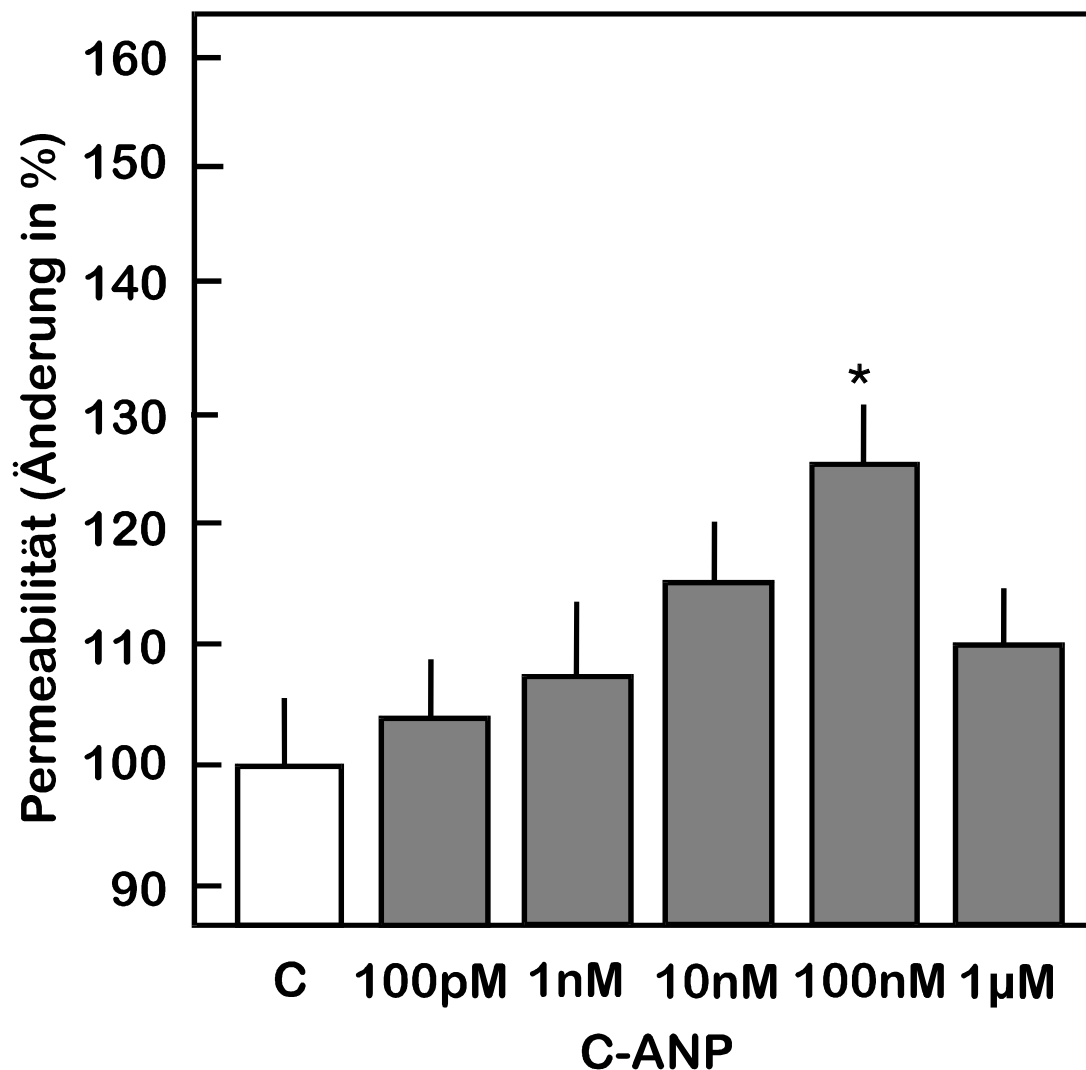


Abb.17: Konzentrationsabhängiger Einfluß von C-ANP (100nM) auf die Permeabilität. AEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.3.2.2 Zeitverlauf

Im Zeitverlauf über 100 Minuten erreichte C-ANP (100nM) ab der 20. Minute eine signifikante Permeabilitätserhöhung und in der 30. Minute ein Maximum von 25% +/- 7% (Abb.15).

4.2.4 Wirkung von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin

4.2.4.1 Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität

ANP (100nM) führte auch unter dem Einfluß von Pertussistoxin (1µM) zu einem Anstieg der Permeabilität . Dieser betrug jedoch nur 21% +/- 5%(Abb.18b).

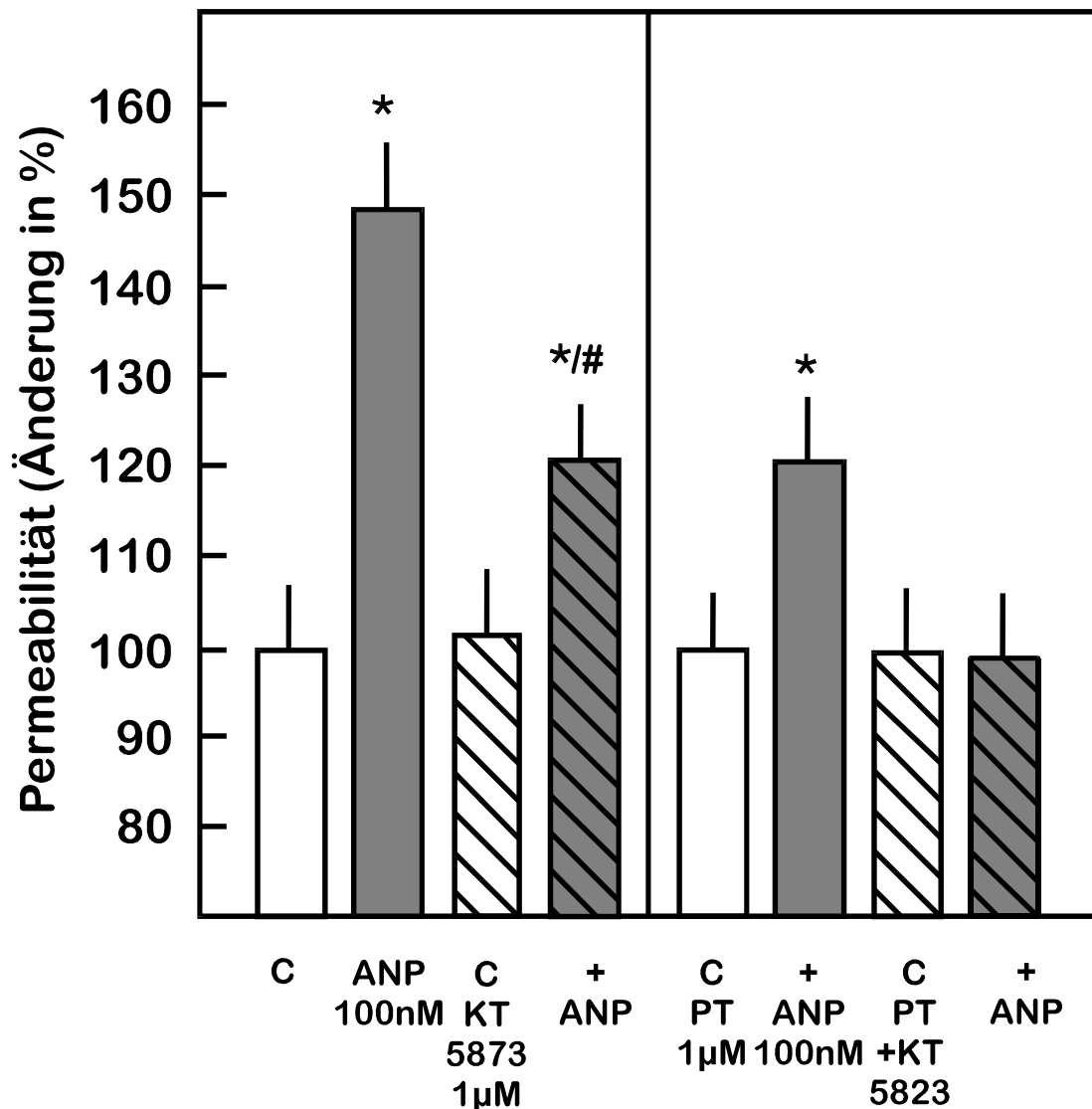


Abb.18 a/b: Der permeabilitätssteigernde Einfluß von ANP wird in Gegenwart des Proteinkinase G - Hemmstoffes KT 5823 (1µM) (18a) teilweise aufgehoben. In Gegenwart von Pertussistoxin (= Negativkontrolle) ist der permeabilitätssteigernde Einfluß von ANP verringert (18b), bei gleichzeitiger Hemmung der Proteinkinase G (KT 5823 - 1µM) wird die ANP-Wirkung vollständig aufgehoben. AEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C, # p<0,05 vs. ANP allein.

4.2.4.2 Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf cAMP-Spiegel

ANP bewirkte auch in Gegenwart von Pertussistoxin ($1\mu\text{M}$) eine Abnahme des cAMP-Spiegels. Dieser betrug $23\% \pm 6\%$ und war deutlich geringer als die cAMP-Abnahme ohne Beeinflussung von Pertussistoxin (Abb.19a).

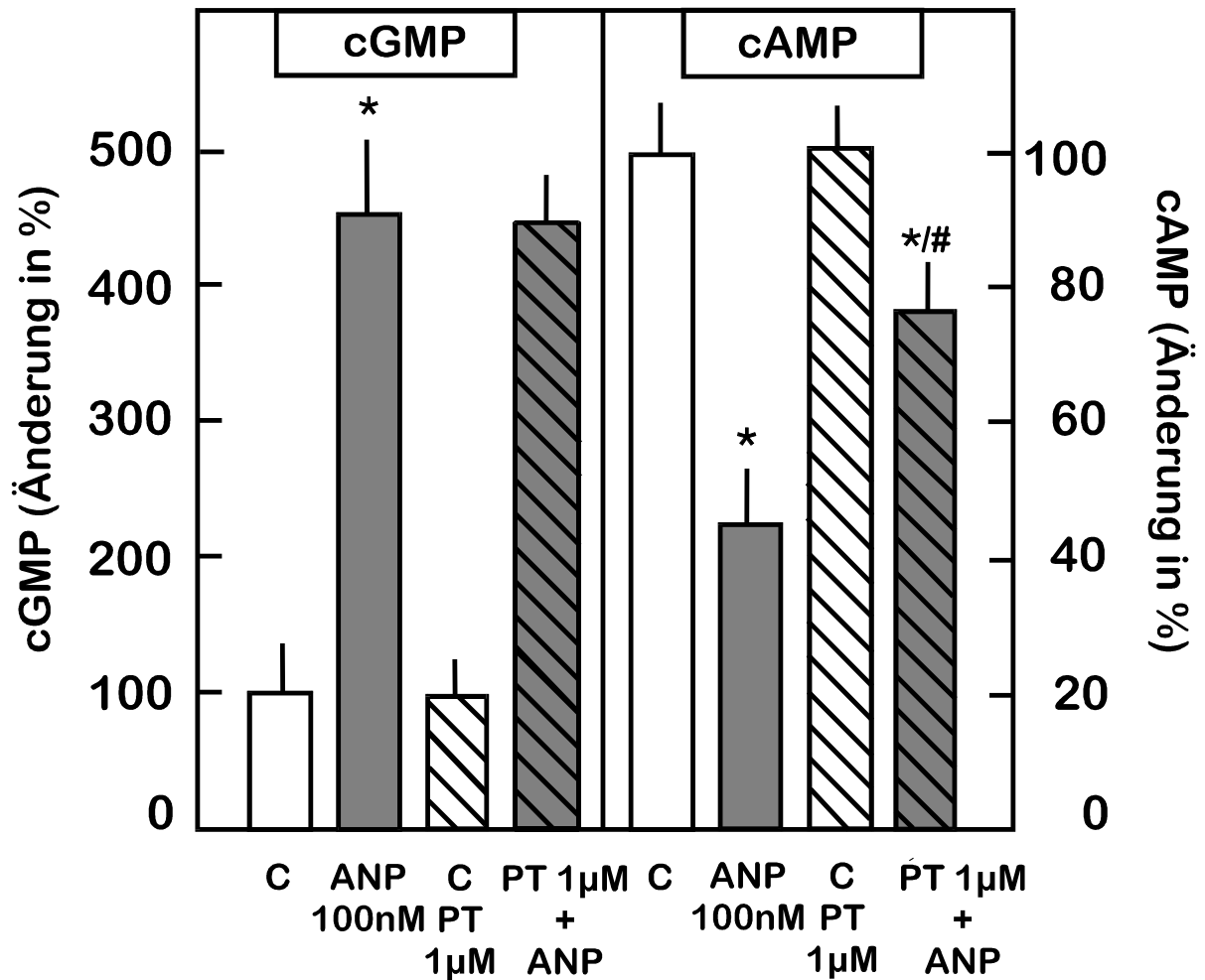


Abb.19 a: Einfluß von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die zellulären Spiegel von cGMP und cAMP. AEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, $n = 6$ unabhängige Experimente, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle C, # $p < 0,05$ vs. ANP allein.

4.2.5 Wirkung von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin

4.2.5.1 Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die Permeabilität

Der permeabilitätssteigernde Effekt von C-ANP wurde in Gegenwart von Pertussistoxin (1 μ M) aufgehoben (Abb.20b). Auch höhere oder geringere C-ANP-Konzentrationen zeigten keinen Einfluß auf die Permeabilität.

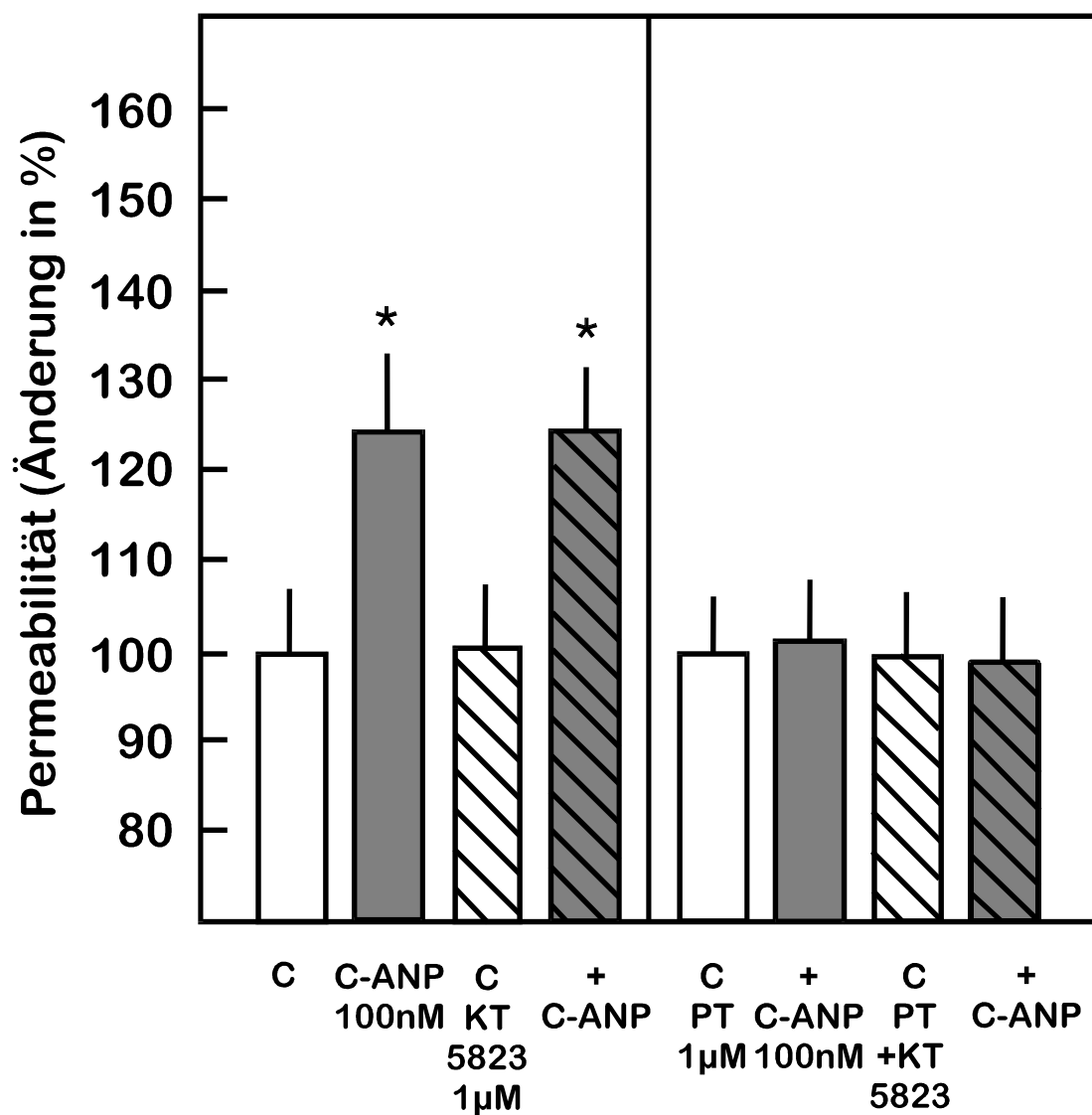


Abb.20a/b: Der permeabilitätssenkende Einfluß von C-ANP (100nM) wird von KT5823 (1 μ M) (20b) nicht beeinflusst. Pertussistoxin (1 μ M) (20a) hebt den permeabilitätssteigernden Einfluß von C-ANP (100nM) auf. KT 5823 (1 μ M) bleibt ohne weiteren Effekt. AEC, Angaben als Mittelwerte \pm SD, n = 6 unabhängige Experimente, * p <0,05 vs. Kontrolle C.

4.2.5.2 Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die cAMP-Spiegel

In Gegenwart von Pertussistoxin ließ sich durch C-ANP-Gabe (100nM) kein cAMP-absenkender Effekt mehr nachweisen (Abb.19b).

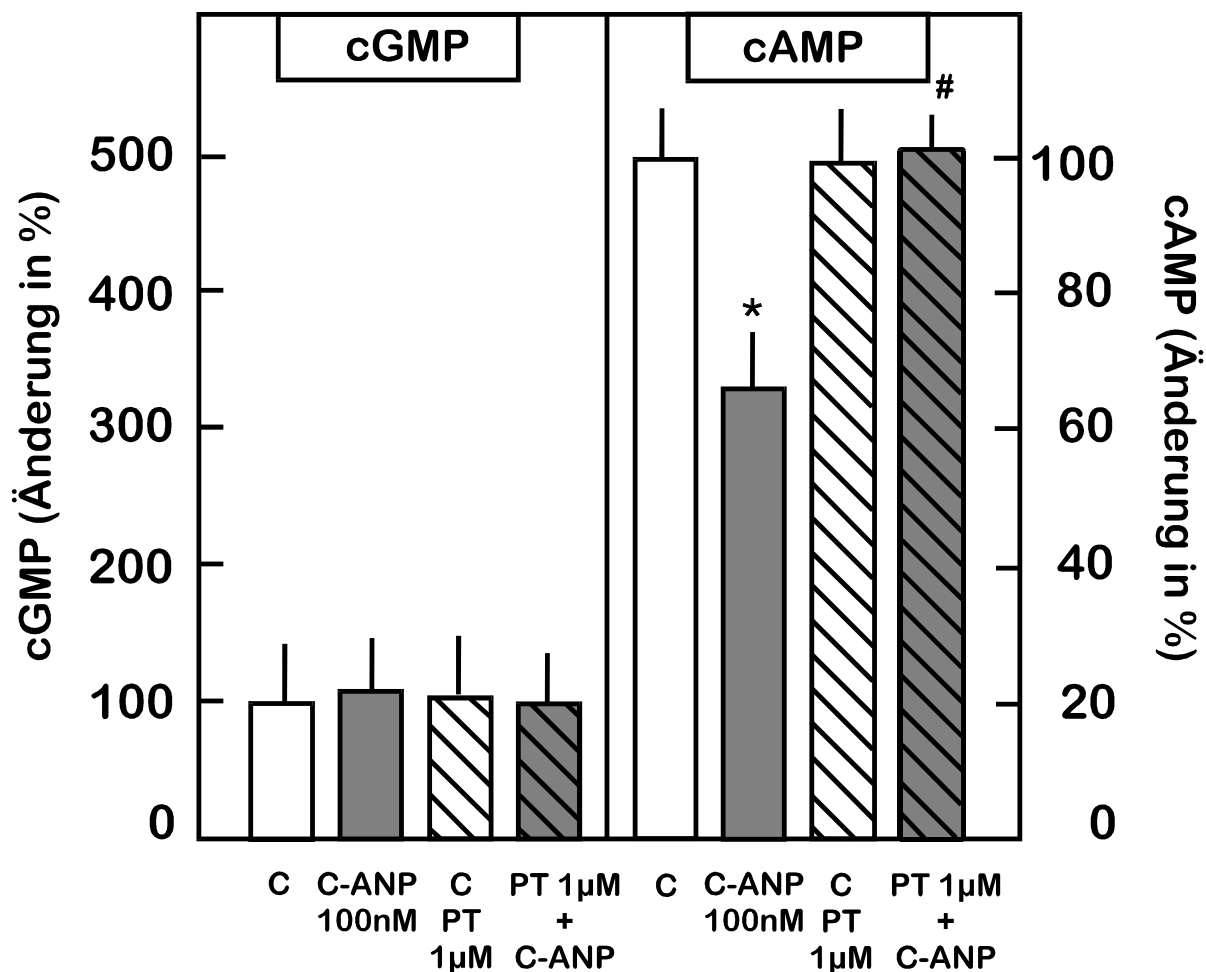


Abb.19 b: Einfluß von C-ANP in Gegenwart von Pertussistoxin auf die zellulären Spiegel von cGMP und cAMP. AEC, Angaben als Mittelwerte +/- SD, n = 6 unabhängige Experimente, *p<0,05 vs. Kontrolle C, # p<0,05 vs. ANP allein.

4.2.6 Wirkung von ANP in Gegenwart von KT 5823 auf die Permeabilität

Der permeabilitätssteigernde Einfluß von ANP wurde in Gegenwart von KT 5823 (1µM) vermindert. Er betrug nur noch 20% +/- 6% gegenüber 49%+/-% in Gegenwart von ANP allein (Abb.18a).

4.2.7 Wirkung von C-ANP in Gegenwart von KT 5823 auf die Permeabilität

Der permeabilitätssteigernde Effekt von C-ANP (100nM) um 25% +/- 6% wurde durch die Gegenwart von KT 5823 (1µM) nicht beeinflusst (Abb. 20a).

4.2.8 Wirkung von ANP in Gegenwart von Pertussistoxin und KT 5823 auf die Permeabilität

Bei gleichzeitigem Einsatz von Pertussistoxin ($1\mu\text{M}$) und KT 5823 ($1\mu\text{M}$) konnte ANP keine Änderung der Permeabilität erzielen (Abb.18b).

5 Diskussion

5.1 Zentrales Ergebnis

ANP besitzt eine regiospezifische, permeabilitätsmodulierende Wirkung am Endothel. An koronaren Zellen wird die Permeabilität vermindert, an aortalen Zellen erhöht (Abb.4,5,14,15,B). Diese Wirkung wird durch die Signaltransduktionswege der Adenylatzyklase und der Guanylatzyklase vermittelt. Die endothelialen cAMP-Spiegel werden vermindert und die cGMP-Spiegel erhöht (Abb.3,13,B). Beide Nukleotide wirken hierbei synergistisch auf die endotheliale Permeabilität. Dieser Mechanismus ist in den beiden untersuchten Endothelarten identisch.

Der ANP-C-Rezeptor übernimmt eine funktionelle Rolle in der Regulation der Permeabilität (Abb.8ab,18ab). Über ihn wird die Abnahme des zellulären cAMP-Spiegels über eine Pertussistoxin (PT) sensible Hemmung der AC vermittelt (Abb.9a,19a).

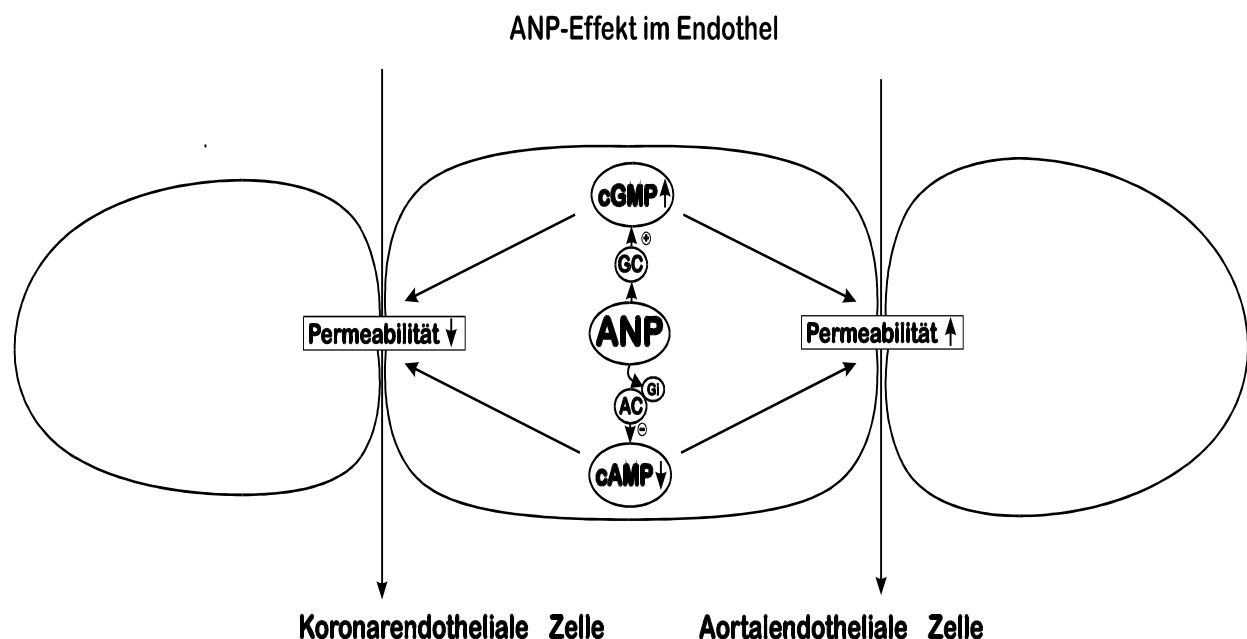


Abb.B: ANP-Wirkung in koronaren und aortalen Endothelzellen.

5.2 Regulation der Nukleotide

Der cGMP erhöhende Einfluss von ANP (Abb.3,13) war bisher der einzige Weg, der hinsichtlich der intrazellulären Vermittlung des ANP-Effektes auf die endotheliale Permeabilität beschrieben wurde. Er beruhte auf einer Kopplung der ANP-A- und ANP-B-Rezeptoren mit der partikulären GC und wurde bisher in allen Endothelprovinzen einheitlich nachgewiesen (13-18,21,22,33,34).

Eine Abnahme des cAMP-Spiegel im Endothel (Abb.3,13) jedoch konnte durch den Einsatz von ANP bisher nicht beschrieben werden. Wohl aber in anderen Geweben wie glatten Gefäßmuskelzellen, in Thrombozyten, im Myokard, Hirn (Striatum und Hypophysenvorderlappen) und Nebenniere (29,30,31,40,41), wo Anand-Srivastavas et al. bereits diesen ANP-Effekt mit dem Einsatz von Pertussistoxin zeigen konnte.

Pertussistoxin (35) zeigt als Bakterientoxin Einfluss auf eine bestimmte Untereinheit der AC Einfluss, auf das Gi-Protein. Die G-Proteine (35) wirken als aktivierende (Gs-Protein) bzw. inhibierende (Gi-Protein) Vermittler zwischen dem Hormon-besetzten Rezeptor und der

katalytischen Untereinheit, die auf ein Signal hin aus ATP cAMP produziert. Pertussistoxin hemmt das inhibierende G-Protein und dessen bremsende Wirkung auf die Aktivität der AC.

Da Pertussistoxin den cAMP-senkenden Effekt von ANP (30,31) aufhob, schloss Anand-Srivastavas, dass die ANP-Wirkung über diese G_i -Protein-abhängige Hemmung der Adenylatzyklase vermittelt wird. Weiterhin zeigte er, dass dieser PT-sensible ANP-Effekt an den ANP-C-Rezeptors gekoppelt war (30,31). Am Endothel konnte Noll (38) die Existenz einer solchen PT-sensiblen Kopplung der AC bisher am Neuropeptid Y-Rezeptor zeigen. Sie führte ebenfalls zu einer Absenkung des cAMP-Gehaltes der Zellen.

Dem endothelialen ANP-C-Rezeptor allerdings, der sowohl im koronaren (26) wie auch im aortalen (25) Endothel exprimiert wird und in bovinen, aortalen Endothelzellen (BAEC) eine Dominanz von > 94% der ANP-Rezeptoren besitzt (25), konnte bisher keine solche Funktion der Signaltransduktion zugewiesen werden.

Die ihm bisher zugeschriebene Aufgabe bestand in einer Clearance-Funktion, die durch Bindung an den Rezeptor und Internalisierung des Komplexes zur Absenkung des ANP-Plasmaspiegels führte (27,28).

Durch den Einsatz von C-ANP, einem verkürzten ANP-Analogen, das ausschließlich an den ANP-C-Rezeptor bindet (29), konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass C-ANP in beiden untersuchten Zelltypen die cAMP-Spiegel (Abb.6,16) absenkte, die Permeabilität veränderte (Abb.5,7, 15,17) und durch PT (Abb.9b,10b,19b,20b) hinsichtlich des Nukleotidspiegels und der Permeabilitätsänderung komplett antagonisierbar war.

Eine Funktion des ANP-C-Rezeptors in der Signaltransduktion der Permeabilität konnte somit im Endothel nachgewiesen werden.

Auch der Einsatz des Vollpeptids ANP führte in beiden untersuchten Zellsystemen zu einer Absenkung des cAMP-Spiegels; allerdings erfolgte die Absenkung auf eine andere Weise. Einerseits war die cAMP-absenkende Intensität von ANP (Abb.3,13) fast doppelt so stark wie die von C-ANP (Abb.6,16), andererseits konnte PT die cAMP-Absenkung nicht komplett, sondern nur partiell um etwa 2/3 (Abb.9a,19a) antagonisieren. Diese gefundenen Daten ließen mindestens zwei zelluläre Mechanismen zur cAMP-Absenkung annehmen.

2/3 der Absenkung des cAMPs stellte sich auch hier als PT-sensibel dar und ließ sich wie oben über die Kopplung der PT-sensiblen AC am ANP-C-Rezeptor erklären.

Ein zweiter, kleinerer Teil der cAMP-Absenkung war jedoch nicht PT-sensibel. Eine Erklärung könnte in einer unterschiedlichen Affinität von ANP und C-ANP zum ANP-C-Rezeptor vermutet werden, wobei die AC-Aktivität durch verschieden starke Bindung unterschiedlich inhibiert würde. Gegen diese Überlegung sprachen die Daten aus der Arbeitsgruppe von Maak (27,28), demnach C-ANP mit >90% der ANP-Affinität an den ANP-C-Rezeptoren band.

Naheliegender erscheint uns jedoch, dass eine gesteigerte Aktivität von Phosphodiesterasen (PDE) zu einem vermehrten Abbau von cAMP führt. So konnte bereits in Glomerulosazellen boviner Nebennieren (42) gezeigt werden, dass ANP über zwei cAMP-reduzierende Wege auf die Aldosteronsekretion einwirkte. Die Senkung der cAMP-Spiegel war abhängig einerseits von der uns bereits bekannten PT-sensiblen Inhibierung der AC, andererseits von einer cGMP-abhängigen PDE, der Phosphodiesterase II (PDE II), deren Existenz auch im Endothel nachgewiesen wurde (43,44). Der PDE II-Effekt konnte aber in vorliegender Arbeit wegen Fehlens spezifischer PDE II - Hemmstoffe nicht erfasst werden.

Mit dieser These wäre die schwächere cAMP-absenkende Wirkung von C-ANP gut erklärbar, da C-ANP im Gegensatz zu ANP nicht auf die GC wirkt und so auch nicht die cGMP-abhängige PDE II zusätzlich aktivieren kann.

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass ANP unabhängig vom endothelialen Ursprung einerseits über eine Aktivierung der GC zur Erhöhung der cGMP-Spiegel als auch andererseits über eine Inhibition der AC und vermutlich über die PDE II zur Absenkung der cAMP-Spiegel führt (Abb.B).

5.3 Antagonistische Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität

Die Vorversuche mit den membrangängigen Nukleotiden 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP demonstrierten das antagonistische Wirken der beiden Nukleotide auf die Permeabilität in den verschiedenen Zelltypen (Abb.1,2,11,12).

So bestätigten die vorliegenden Daten aus koronaren Endothelien (Abb.1,2) die Ergebnisse von Watanabe (37), Noll (38) und Hempel (20). cAMP- steigernde Substanzen und 8-Br-cAMP erhöhten die Permeabilität in koronaren Endothelzellen. cGMP-steigernde Substanzen und 8-Br-cGMP (20) erniedrigten diese. Hempel (20) leitete hieraus den funktionellen Antagonismus der Nukleotide in der Feinmodulation koronarer Permeabilität ab.

Für aortale Endothelzellen (Abb.11,12) gelten analog die gleichen antagonistischen Mechanismen, die später diskutiert werden (Kapitel 5.6).

5.4 Synergistische Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität

Der funktionelle Antagonismus der Nukleotide entspricht der Arbeitsweise einer Waage. Bei gleichzeitiger Synthese beider „second messenger“ gleichen sich die permeabilitätserhöhenden und -senkenden Kräfte aus. Kommt das Gleichgewicht aber aus dem Lot durch einseitige Synthese oder Abbau eines Nukleotids, resultiert daraus ein Überwiegen der stärkeren, permeabilitätsverändernden Kraft. Beide Seiten der Waage können sogar bei gleichzeitiger einseitiger Synthese und gegenseitiger Absenkung synergistisch die permeabilitätsverändernde Kraft verstärken.

Ein solches synergistisches Modell der Nukleotide fand Levin (39) in den Glomerulosazellen der Nebennierenrinde. Dort inhibierte ANP die Aldosteronsekretion synergistisch durch eine cGMP-Spiegelerhöhung und eine gleichzeitige cAMP-Spiegelverminderung.

Analog zeigte sich auch in den untersuchten koronaren und aortalen Endothelzellen, dass die cGMP-steigernden und die cAMP-senkenden Effekte von ANP synergistisch auf die Permeabilität wirkten. Die beiden Messengersysteme wurden jeweils mit PT (Abb. 9a,19a) oder mit KT 5823, dem Inhibitor der PK G, gehemmt, woraufhin ANP jeweils nur noch die Hälfte seiner ursprünglichen, permeabilitätsverändernden Wirkung entfalten konnte (Abb. 8ab,18ab).

Beide Nukleotide besitzen demnach eine eigene, unabhängige Wirkung auf die Permeabilität. Bei gleichzeitigem Einsatz beider Hemmsubstanzen konnte demgegenüber der ANP-Effekt komplett verhindert werden (Abb.8ab,18ab). Kein weiterer Transduktionsmechanismus scheint demnach an der ANP-Wirkung auf die Permeabilität beteiligt zu sein.

Durch die synergistische Wirkung der Nukleotide lässt sich ebenfalls nachvollziehen, warum C-ANP, das einzig und alleine über das cAMP-Messengersystem auf die Permeabilität wirkt (Abb.9b,19b), die halbe permeabilitätsverändernde Wirkung des Vollpeptids (Abb.5,15) entfaltet. Diese Wirkung war vollständig durch PT antagonisierbar (Abb.9b,10ab,19b,20ab) und erfuhr erwartungsgemäß durch KT 5823 keine zusätzliche Veränderung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden Nukleotide in Gegenwart von ANP synergistisch auf die Permeabilität wirken.

5.5 Inverse Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität

Im Vergleich der beiden untersuchten Endothelzellsysteme fiel hinsichtlich der Daten zu 8-Br-cGMP und 8-Br-cAMP auf (Abb.1,2,11,12), daß sich die oben beschriebene, antagonistische Wirkung der Nukleotide auf die Permeabilität in Abhängigkeit vom Endothelursprung invers verhielt. Obwohl die benutzten Konzentrationen von 8-Br-cAMP und 8-Br-cGMP in beiden Zellsystemen dieselben waren, erzielte 8-Br-cAMP im koronaren Monolayern einen erhöhenden (Abb.1,2) und im aortalen einen erniedrigenden Effekt (Abb.11,12), während der Gegenspieler 8-Br-cGMP genau entgegengesetzte Effekte bewirkte.

Eine solche Inversität der Permeabilität im mikro- und makrovaskulären Zellen zeigte Watanabe (37) bereits für den cAMP-Transduktionsweg. cAMP-erhöhende Substanzen führten in koronaren Endothelzellen zu einer Zunahme der Permeabilität dagegen in aortalen Zellen zu einer Abnahme. Die zahlreichen Daten über die Einzelwirkung von cAMP in koronarem (20,37,38) und aortalen Zellen (16,17,18,37,45,46) bestätigten die oben gewonnenen Daten.

Durch die vorliegende Untersuchung kann die regiospezifische, inverse Wirkung ebenfalls für das cGMP-System erweitert werden.

Allerdings liegen in der Literatur unterschiedliche Daten über die Wirkungsweise von 8-Br-cGMP im aortalen Endothel vor und werden im folgenden Kapitel diskutiert.

5.6 Inverse Wirkung von ANP auf die Permeabilität

Die Permeabilität der Endothelzellverbände ist demnach im arteriellen Gefäßbaum des Körpers nicht an jeder Stelle gleich, sondern zeigt regiospezifische Unterschiede.

Nach den vorliegenden Daten führte ANP im koronarem Endothel zu einer Abnahme der Permeabilität (Abb.4,5) und in aortalen Zellen zu einer Zunahme (Abb.14,15). Die C-ANP-Wirkung war entsprechend (Abb.5,7,15,17).

Während die permeabilitätssenkende Wirkung von ANP in koronarem Endothel (Abb.4,5) eine neue Beobachtung war (20), lagen über die Wirkungsweise von ANP und 8-Br-cGMP im aortalen Endothel (Abb.14,15) in der Literatur unterschiedliche Daten vor:

Unsere Beobachtung der ANP- bzw. 8-Br-cGMP-abhängigen Zunahme der Permeabilität (Abb.14,15) beobachteten ebenfalls Yonemaru (19) und in Versuchen über Wasserpermeabilität Battle (47). Allen drei Arbeiten war die Verwendung von „ruhenden“, nicht vorbehandelten, makrovaskulären Endothelverbänden gemeinsam.

Andere Arbeitsgruppen (13-18) beobachteten nur unter dem Einsatz vorstimulierender Substanzen wie Thrombin und Oxidantien (z.B. Glukoseoxidase), die in Situationen wie z.B. einer Entzündung freigesetzt werden, ANP- oder 8-Br-cGMP-abhängige Permeabilitätsveränderungen. Sie hielten den durch die Vorstimulation induzierten Einstrom von Ca-Ionen für den wesentlichen Faktor der endothelialen Kontraktion und des Anstieges der Permeabilität. Der anschließende Einsatz von ANP bzw. von 8-Br-cGMP verstärkte den Ca-Rücktransport in die zytoplasmatischen Ca-Speicher, senkte den intrazellulären Ca-Gehalt und führte zur Abnahme der Permeabilität. Diese Permeabilitätsbewegungen waren allerdings unserer Beobachtung an ruhenden Zellen genau entgegengesetzt.

Hempel et al. (20) konnten zeigen, daß in „ruhenden“ Endothelmonolayern die Regulation der Permeabilität Ca-unabhängig funktioniert. cAMP- und cGMP-Erhöhen an ruhenden

Endothelien besaßen hierbei keinen Einfluss auf den Ca-Spiegel in den Zellen. Ebenfalls blieben unter extrazellulären Ca-freien Bedingungen die Permeabilitätseffekte von ANP unverändert nachweisbar. Demnach unterscheiden sich ruhende und stimulierte Endothelzellen hinsichtlich der überwiegenden, intrazellulären Signalübertragung und der resultierenden Permeabilitätsbewegung.

Ein weiterer methodischer Unterschied zu den Vergleichsarbeiten lag darin, daß jene Endothelmonolayer in Zelllinien 10-ter bis 20-ter Passage verwandten, wogegen Draijer (48) eine kontinuierliche Abnahme der GC-Aktivität in steigender Passagezahl bis zum Verschwinden der Aktivität in der achten Passage nachwies. Die von uns benutzten Endothelverbände wurden nicht als Zelllinien sondern als Primärkulturen in erster Passage zur Messung verwandt.

Zusammenfassend verhält sich die Wirkung von ANP und C-ANP in koronaren und aortalen Endothelmonolayern regiospezifisch und invers (Abb.B).

5.7 Gefäßspezifische Differenzierung der Endothelzellen

Das Endothel differenziert sich im Laufe der embryonalen Entwicklung aus den gemeinsamen Endothelvorläuferzellen – den Angioblasten – gemäß den organspezifischen Anforderungen (59). Eine der wichtigsten Determinanten ist das lokale Umfeld. Besonders die Interaktionen mit den umgebenden Zellen durch lösliche Zytokine, Zell- Zellkontakte und den Aufbau und Bestand der Matrix, auf der die Endothelzellen wachsen, beeinflussen die Differenzierung der komplexen organspezifischen Anforderungen der Endothelzellen (59).

In den postkapillären Lymphknoten und den Peyer'schen Plaques ermöglichen die Endothelzellen kontinuierlich das Zirkulieren und Rezirkulieren von Lymphozyten aus der Blutbahn in das Gewebe und zurück. Über Oberflächenrezeptoren dienen die Endothelzellen über das „Rolling“ den Lymphozyten als „Anlegestelle“, um in das Gewebe zu immigrieren.

Im Knochenmark sind die Endothelzellen zusammen mit Fibroblasten, Osteoblasten, Retikulozyten und Monozyten verantwortlich für die Proliferation, Differenzierung und Reifung von hämopoetischen Zellen. Die Endothelzellen produzieren Zytokine, synthetisieren Matrixproteine und regulieren den Transit von Vorläufer und reifen Blutzellen in den Blutkreislauf.

In der Bluthirnschranke repräsentiert das Endothel das Bindeglied zwischen Blut und dem zentralen Nervensystems. Hier hat es besonders protektive Aufgaben. Über spezielle „tight-junctions“ regulieren die Endothelzellen die Infiltration von Plasmakomponenten und Immunzellen, über spezielle Transportsysteme transportieren sie gewünschte Stoffe wie Glukose und Aminosäuren und schützen gleichzeitig das Gehirn vor unerwünschten toxischen Substanzen, indem sie z.B. über ein „multidrug-resistance“ Proteine eine Vielzahl von niedermolekularen Molekülen aus dem Hirn heraustransportieren (59).

Trotz vieler gemeinsamer funktioneller und morphologischer Eigenschaften und Voraussetzungen erlangen die Endothelzellen durch Differenzierung eine ausgesprochen große Heterogenität.

In diese endotheliale Heterogenität reiht sich die gefäßspezifischen Differenzierung des aortal-makrovaskulären und dem coronaren-mikrovaskulären Endothels ebenfalls ein.

In der komplex organisierten Herzmuskulatur kommt dem Endothel neben dem Stofftransport aus dem Blut zur Versorgung des Myokards besonders die Aufgabe zu, paracrine Substanzen zu synthetisieren und bedarfsgerecht zu sezernieren (61,62). Es produziert NO, Endothelin I, ANP,

Angiotensin-Converting-Enzym und Angiotensin II, die maßgeblich für die Modulation der Herz-Kreislauffunktion verantwortlich sind.

Die Aufgaben des aortalen Endothels beschränken sich dagegen hauptsächlich auf die Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität.

Hinsichtlich der Barrierenfunktion konnten wie trotz der endothelialen Heterogenität gemeinsame regionenabhängige Wirkmechanismen der intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen in den beiden untersuchten mikrovaskulären - und makrovaskulären Endothelverbänden zeigen, die sowohl quantitativ wie qualitativ nach einem einheitlichen Prinzip ablaufen. ANP beeinflusst hierbei (Abb.B) den Antagonismus der beiden eng miteinander verknüpften Feinregulatoren cAMP und cGMP derartig, daß beide Second Messenger synergistisch die Permeabilität der Endothelbarriere verändern.

Der eigentliche Effekt der Signaltransduktion auf die endotheliale Barriere ist jedoch regiospezifisch an den jeweiligen Ort und dessen Bedürfnisse im Organsystem gebunden. ANP führt in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer Absenkung und in makrovaskulären Endothelzellen zu einem Anstieg der Permeabilität.

Die unterschiedlichen Spezies – Ratte und Schwein – halten wir hinsichtlich der inversen Permeabilitätseffekte für nicht entscheidend, da beide Tiermodelle einen vergleichbaren Organismus besitzen und in der Literatur langjährig untersucht und etabliert sind. Vergleichende Untersuchungen stehen jedoch bisher aus.

Gerade weil (48,59,60) bekannt ist, dass Endothelzellen schnell ihre Funktion in Zellkulturen außerhalb ihres Organverbandes verlieren, halten wir die gewonnenen Ergebnisse für echt, da die endothelialen Monolayer rasch - d.h. in erster Passage von Primärkulturen - zu den Permeabilitäts- und Nukleotidmessungen verwandt wurden, im Gegensatz zu vielen anderen Untersuchungen, deren Zellpassagen von Primärkulturen bis zur 22. Passage reichten (60).

Demnach lassen sich die prinzipiellen Aussagen zur Signaltransduktion und der Regiospezifität der Permeabilität aus dem In-Vitro-Modell wahrscheinlich in ähnlicher Weise auf den lebenden Organismus übertragen. Quantitative und funktionelle Aussagen dagegen sind aus diesem Modell nicht sicher ableitbar.

Das von den koronaren Endothelzellen und dem Myokard synthetisierte ANP besitzt vornehmlich eine kardioprotektive Wirkung. Einerseits beeinflusst es den Organismus durch antiadrenerge Effekte, andererseits reduziert es das intravasale Volumen und die myokardiale Vorlast (4,5).

So vermuteten Fluckinger (53) und Almeida (54), daß die unter dem Einfluss von ANP bei nephrektomierten Ratten beobachtete Blutdruck-, intravasale Volumenabnahme sowie der Hämato-kritanstieg auf einen erhöhten vaskulären Flüssigkeitsaustritt zurückzuführen sei. Die von uns beobachtete Erhöhung der Permeabilität in makrovaskulären Gefäßen könnte diesem entsprechen.

Darüber hinaus zeigt ANP eine protektive Wirkung auf das Endokard und Myokard in pathophysiologischen Situationen. So verhindert ANP (55) nach passagerer Ischämie die reperfusionsbedingte Hyperkontraktion und anschließenden Zelltod von Kardiomyocyten. Parallel schützt der Einsatz von ANP den koronaren Endothelverband bei und nach passagerer Energieverarmung mittels Kaliumcyanid (KCN) und 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) vor Hyperpermeabilität und Zusammenbruch der Barrierenfunktion (63, unveröffentlichte Daten). Die von uns gezeigte Absenkung der koronaren Endothelpermeabilität unter ANP könnte diesem Mechanismus zur Erhaltung der Integrität des Herzmuskels dienen.

6 Zusammenfassung

1. Unter dem Einfluss von ANP erfolgt die Regulation der zyklischen Nukleotide, cAMP und cGMP, unabhängig vom regionalen Ursprung des Endothels. ANP aktiviert die Guanylatzyklase und hemmt die Adenylatzyklase.

2. Die Einzeleffekte der beiden Nukleotide wirken synergistisch auf die endotheliale Permeabilität.

3. Die Permeabilitätsänderung ist abhängig von der Region. ANP erniedrigt die Permeabilität in koronarendothelialen und erhöht sie in aortalendothelialen Zellen.

Der ANP-C-Rezeptor ist an der Signaltransduktion funktionell beteiligt. Über ihn wird eine Pertussistoxin-sensible Hemmung der Adenylatzyklase vermittelt.

7 Literatur

1. Schmidt, Thews (1995): Physiologie des Menschen, Springer-Verlag, 26. Auflage. s.514-521.
2. Debold A.J., Borenstein H. B., Veress A.T., Sonnenberg H (1981): A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *life sci.* 28: 89-94.
3. Kurtz A., Della Brunner R., Pfeilschifter J., Taugner R., Bauer C.(1986): Atrial natriuretic Peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4769-4773.
4. Brenner B.M., Ballermann B.J., Gunning M.E., Zeidel M.L. (1990): Diverse biological actions of atrial natriuretic Peptide. *Physiol. rev.* 70: 665-699.
5. Waldman S.A., Murad F. (1987): Cyclic cGMP Synthesis and Function. *Pharmacol. Rev.* Vol 39.No.3, 163-194.
6. Naruse-M; Obana-K; Naruse-K; Yamaguchi-H; Demura-H; Inagami-T; Shizume-K (1987): Atrial natriuretic polypeptide inhibits cortisol secretion as well as aldosterone secretion in vitro from human adrenal tissue. *J-Clin-Endocrinol-Metab.*; 64(1): 10-6.
7. Anand-Srivastava-MB; Trachte-GJ (1993 Dec): Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol-Rev.*; 45(4): 455-97.
9. Walsh K.P., Williams T.D.M., Spiteri C., Pitts E., Lightman S.L., Sutton R.(1988): Role of atrial pressure and rate in release of atrial natriuretic peptide. *Am. J. Physiol.* 23: R607- R610.
10. Tang J., Webber R.J., Chang D., Chang J.k., Kiang J., Wei E.T.(1984): Depressor and natriuretic activities of several atrial peptides. *Regul. Pept.* 9:53-59.
11. Sudoh T., Kangawa K., Minamino N, Matsuo H.(1988): A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature (Lond.)* 332:78-81.
12. Sudoh T., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H.(1990): C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 863-870.
13. Baron-DA; Lofton-CE; Newman-WH; Currie-MG.(1989): Atriopeptin inhibition of thrombin-mediated changes in the morphology and permeability of endothelial monolayers. *Proc-Natl-Acad-Sci. U-S-A;* 86(9): 3394-8.
14. Lofton-CE, Newman-WH; Currie-MG.(1990): Atrial Natriuretic Regulation of Endothelial Permeability is mediated by cGMP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 172, No2:793-799.
15. Lofton-CE; Baron-DA; Heffner-JE; Currie-MG; Newman-WH.(1991): Atrial natriuretic peptide inhibits oxidant-induced increases in endothelial permeability. *J-Mol-Cell-Cardiol.* 23(8): 919-27.

16. Westendorp R.G.J., Draijer R., Meinders A.E., Hinsbergh V.W.M.(1994): Cyclic-cGMP-Mediated Decrease in Permeability of Human Umbilical and Pulmonary Artery Endothelial Cell Monolayers. *J Vasc Res*; 31:42-51.
17. Draijer R., Douwe E. Atsma, Arnoud van der Laarse, Hinsbergh V.W.M.(1995): cGMP and Nitric Oxide Modulate Thrombin-Induced Endothelial permeability, *Circ Res*; 76:199-208.
18. Buchan-KW; Martin-W.(1992 Dec): Modulation of barrier function of bovine aortic and pulmonary artery endothelial cells: dissociation from cytosolic calcium content. *Br-J-Pharmacol.* 107(4): 932-8.
19. Yonemaru-M; Ishii-K; Murad-F; Raffin-TA.(1992Sep): Atriopeptin-induced increases in endothelial cell permeability are associated with elevated cGMP levels. *Am-J-Physiol.*; 263(3 Pt 1): L363-9.
20. Hempel A., Noll T., Muhs A., Piper H.M.(1996): Functional antagonism between cAMP und cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers, *Am. J. Physiol.* 270: H 1264 - 1271,
21. Waldman S.A., Rapoport R.M., Murad F.(1984): Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylyl cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 259: 15332-14334.
22. Hamet P., Remblay j., Goldstein D.S., Zukowska-Grojec Z.(1984): Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor an cyclic GMP. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 123: 515-527.
23. Chang M., Lowe D.G., Lewis M., Hellmiss R., Chen E., Goeddel D.V.(1989): Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylyl cyclase. *Nature (Lond.)* 341: 68-71.
24. Schulz S., Green C.K., Yuen P.S.T., Garbers D.L.(1990): Gyanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63:941-948.
25. Leitman-DC; Waldman-SA; Murad-F.(1991): Identification of atrial natriuretic peptide receptors in cultured cells. *Methods-Enzymol.*195: 436-46.
26. Currie M.G., Schomer H., Lanier-Smith K.L., Baron D.A.(1989): Atrial natriuretic peptide binding sites in the mammalian heart: localization to endomural vessels. *Cell Tissue Res.* 256: 233-239.
27. Maack-T; Suzuki-M; Almeida-FA; Nussenzveig-D; Scarborough-RM; McEnroe-GA; Lewicki-JA.(1987): Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science.*238(4827): 675-8.
28. Maack-T, Okolicany J, Koh GY, Price DA.(1993): Functional properties of atrial natriuretic factor receptors. *Semin Nephrol* 13:50-60.
29. Anand-Srivastava-MB; Sairam-MR; Cantin-M.(1990): Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. *J-Biol-Chem.* 265(15): 8566-72.
30. Anand-Srivastava-MB; Srivastava-AK; Cantin-M.(1987Apr): Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate-cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *J-Biol-Chem.* 15;

- 262(11): 4931-4.
31. Anand-Srivastava-MB; Trachte-GJ.(1993Dec): Atrial natriuretic factor receptors and signal transduction mechanisms. *Pharmacol-Rev.*; 45(4): 455-97.
 32. Smyth-EM; Keenan-AK.(1994Feb): The vascular ANF-C receptor: role in atrial peptide signalling. *Cell-Signal.*; 6(2): 125-33.
 33. Leitman D.C., Murad F.(1986): Comparison of binding and cyclic GMP by atrial n. peptides in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Acta* 885:74-79.
 34. Leitman D.C.,Andresen J.W., Catalano R.M., Waldman S.A., Tuan J.J., Murad F.(1988): Atrial Natriuretic Peptide Binding ,Cross-Linking, and Stimulation of cyclic GMP Accumulation and Particulate Guanylate Cyclase Activity in Cultured Cells. *J.Biol. Chem.* 263:3720-3728.
 35. Gilman, A.G. (1987): G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals, *Annu.Rev. Biochem.* 56: 615-649.
 36. Kaslow H.R., Burns D.L.(1992): Pertussistoxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB*: 6: 2684-2690.
 37. Watanabe H., Kuhne W., Schwartz P., Piper H.M.(1992): A₂-adenosine receptor stimulation increases macromolecule permeability of coronary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 262: H1174-H1181.
 38. Noll T.,Hempel A.,Piper H.M.(1995): Neuropeptide Y reduces macromolecule permeability of coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 268(Heart Circ. Physiol. 37): H1462-70.
 39. Levin E.R.(1993Apr): Natriuretic peptide C-receptor: More than a clearance receptor. *Am-J-Physiol.* 264(4 Pt 1): E483-9.
 40. Anand-Srivastava-MB; Gutkowska-J; Cantin-M.(1991Aug15): The presence of atrial-natriuretic-factor receptors of ANF-R2 subtype in rat platelets. Coupling to adenylate cyclase/cyclic AMP signal-transduction system. *Biochem-J.*; 278 (Pt 1): 211-7.
 41. Marcil-J; Anand-Srivastava-MB.(1995Aug-Sep): Defective ANF-R2/ANP-C receptor-mediated signalling in hypertension. *Mol-Cell-Biochem.*; 149-150: 223-31.
 42. MacFarland R.T., Zelus B.D., Beavo J.A.(1991): High Concentrations of a cGMP-stimulated Phosphodiesterase Mediate ANP-induced Decrease in cAMP and Steroidogenesis in Adrenal Glomerulosa Cells. *J.Biol. Chem.* 266,1, 136-142.
 43. Lugnier C., Schini V.B(1990): Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesteras from cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacolo.* 39: 75-84.
 44. Souness J.E., Diocee B.K., Martin W., Moodie S.A.(1990): Pig aortic EC cyclic nucleotide Phosphodiesterases. Use of phosphodiesterase from cultured bovine aortic endothelial cells, *Biochem. J.* 266: 127 – 132.
 45. Zink S., Rösen P., Lemoine H.(1995): Micro- and macrovascular endothelial cells in b-adrenergic regulation of transendothelial permeability. *Am.J. Phyiol.*

38:C1209-C1218.

46. Stelzner T.J., Weil J.V., O'Brien R.F.(1989): Role of cyclic Adenosine Monophosphate in the Induction of Endothelial Barrier Properties. *J.Cell.Phys.*139:157-166.
47. Battle Th., Michel J.B., Corman B.(1992): Effect of atrial natriuretic factor on the water permeability of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 185,1,386-391.
48. Draijer-R; Vaandrager-AB; Nolte-C; de-Jonge-HR; Walter-U; van-Hinsbergh-VW.(1995Nov): Expression of cGMP-dependent protein kinase I and phosphorylation of its substrate, vasodilator-stimulated phosphoprotein, in human endothelial cells of different origin. *Circ-Res.*; 77(5): 897-905.
49. Diwan, Thompson, Lee, Strada (1994): Cyclic GMP-dependant PK activity in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 202: 728 – 735.
50. McMillan C., Murphey U., Lincoln.(1994): Identification and localisation of cGMP - dependant PK in bovine aortic EC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 531- 537.
51. Piper, H.M., R. Spahr, S. Mertens, A. Krützfeldt, and H. Watanabe: Microvascular endothelial cells from heart. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, H. M. Piper. Heidelberg: Springer, 1990, p. 158-177.
52. Piper, H.M., R. Spahr, S. Mertens, A. Krützfeldt, and H. Watanabe: Microcarrier cultures of endothelial cells. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, H. M. Piper. Heidelberg: Springer, 1990, p. 220-229.
53. Fluckinger-JP, Waeber-B, Brunner-HR.(1986Oct): Effekt of Atriopeptin III on hematokrit and volume of nephrectomized rats. *Am-J-Physiol.*; 251(4 *PT* 2): H880-3.
54. Almeida-FA, Suzuki-M, Maak-T.(1986): Atrial natriuretic factor increases hematokrit and decreases plasma volume in nephrectomized rats. *Life-Sci.* 39(13): 1193-9.
55. A. Hempel, M. Friedrich, K. D. Schlüter, W. G. Forssmann, M. Kuhn, and H. M. Piper (1997Jul): ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol*; 273 (1*Pt*2): H244-9.
56. Patterson C.E., Rodney A. Rhoades and J. G. N. Garcia.(1992): Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *Am J Physiol* 72(3):865-873.
57. J. G. N. Garcia, A. Silfinger-Birnboim, R. Bizios, P. J. Del Vecchio.(1986): Thrombin-induced Increase in Albumin Permeabilità Across the Endothelium. *J Cell Physiol* 128:96-104.
58. H. Lum and A. B. Malik.(1996): Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 787-800.
59. C. Garlanda and E. Dejana.(1997): Heterogeneity of Endothelial Cells – Specific markers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*17: 1193-1202.

60. S.M. Albelda, P.M. Sampson, F. R. Haselton.(1988): Permeability characteristics of cultured endothelial cell monolayers.64(1): 308-322.
61. A. M. Shah.(1996): Paracrine modulation of heart cell function by endothelial cells. Cardio. Vasc. Res. 31: 874-867.
62. D.L.Brutsaert, P. Fransen, L.J.Andries.(1998): Cardiac endothelium and myocardial function. Cardiovasc. Res. 38: 281-290.
63. T.Noll, A. Muhs, M. Besselmann, H. Watanabe and H. M. Piper.(1995): Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. Am. J. Physiol. 268: H1462-H1470.

Abkürzungen

Adenylatzyklase	AC
Aortale Endothelzellen	AEC
Atriales Natriuretisches Peptid	ANP
Bovine Aortale Endothelzellen	BAEC
Brom	Br
Guanin-Nukleotid-bindendes inhibitorisches Protein	G _i
Guanylatzyklase	GC
Inhibitor der PKG	KT 5823
Kalzium	Ca
Koronare Endothelzellen	CEC
Minute	min
Pertussistoxin	PT
Phosphodiesterase	PDE
Proteinkinase G	PKG
Standardabweichung	SD
Stickstoffmonoxid	NO
zyklisches Adenosinmonophosphat	cAMP
zyklisches Guanosinmonophosphat	cGMP

Danksagung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand vom Januar 1995 bis zum Oktober 1996 in der Arbeitsgruppe für endotheliale Permeabilität und Zellkultur an der Franz-Volhard-Klinik der medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.

Größten Dank richte ich an den Arbeitsgruppenleiter Dr. A. Hempel für seine intensive Betreuung und Supervision beim Entstehen dieser Dissertationsarbeit. Maßgeblich beteiligt am erfolgreichen Abschluß war die leitende Hand von Prof. Dr. H. Haller.

Weiterhin möchte ich mich bei den anderen Arbeitsgruppenmitgliedern, besonders Alena Herrmann, Sabine Funk und Holger Leschke für ihre Hilfe und Diskussion bedanken.

Lebenslauf

Name: Christoph Bach
 Wohnort: Barstraße 28
 10713 Berlin
 Tel.: 030/ 8271 88 11
 Geburtstag und -ort: 13. 02.1971 in Bobingen

Schulbildung

09.1977 - 07.1981 Grundschole Leitershofen
 09.1981 - 07.1982 St. Anna Gymnasium in Augsburg
 08.1982 - 06.1990 Gymnasium Steglitz in Berlin
 08. 06.1990 Abitur

Studium

04.1991 - 02.1993 Vorklinisches Studium/ FU/ Berlin.
 31. 03.1993 Ärztliche Vorprüfung
 04.1993 - 09.1995 Klinisches Studium/ Rudolf-Virchow-Klinik/ FU/ Berlin.
 14. 04.1994 I. Staatsexamen
 10.1995 - 02.1997 Klinisches Studium/Virchow-Klinikum/ HU/ Berlin.
 11. 04.1997 II. Staatsexamen
 19. 05. 1998 III. Staatsexamen
 09.1998 - 02.2000 Arzt im Praktikum - Klinik und Poliklinik für Neurologie des
 Universitätsklinikums Benjamin Franklin/ FU/ Berlin.
 23. 03. 2000 Approbation als Arzt.

Arzt in Weiterbildung zum FA für Neurologie

03.2000 - 05.2000 Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums
 Benjamin Franklin/ Freie Universität/ Berlin.
 07.2000 – 02.2001 Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums
 Kröllwitz/ Martin-Luther-Universität/ Halle a. d. Saale.
 seit 03.2001 Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums
 Benjamin Franklin/ Freie Universität/ Berlin.

Publikationen

Posterpräsentationen

09.1995 Herbsttagung der 'Deutschen Kardiologischen Gesellschaft' in Bielefeld.

C. Bach, A. Hempel, T. Noll, H. Haller, R. Dietz, Franz-Volhard-Klinik, Freie Universität Berlin; Institut f. Physiologie, Universität Gießen: Das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) steigert die Permeabilität aortaler Endothelzellen über zwei unabhängige nucleotidabhängige Mechanismen.

04.1996 Frühjahrestagung der 'Deutschen Kardiologischen Gesellschaft' in Mannheim.

A. Hempel, T. Noll, C. Bach, H. Haller, R. Dietz, Franz-Volhard-Klinik, Freie Universität Berlin; Max-Delbrück-Centrum f. Molekulare Medizin; Institut f. Physiologie, Universität Gießen: Funktionelle Bedeutung des C-Rezeptors bei Modulation der endothelialen Permeabilität.

Fachartikel

Hempel A., Noll T., Muhs A., Bach C., Piper H.M., Willenbrock R., Höhnel K., Haller H., Luft F.C.: Atrial natriuretic peptide clearance receptor participates in modulating endothelial permeability. *Am. J. Physiol.* 1998 Nov., 275(5 PT 2): H 1818 - 25.

Erklärung

Hiemit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertation von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben ist.

Christoph Bach.

Berlin, den 15. November 2002.