

Regulation der endothelialen Permeabilität durch Bradykinin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Farbod Khosravani

aus Teheran

Düsseldorf, April 2018

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Georg Kojda
2. Prof. Dr. Stephanie Läer

Tag der mündlichen Prüfung:
11.10.2018

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Das nicht allergische Angioödem	9
1.1.1 Pathophysiologie und Klassifizierung des Angioödems	9
1.1.2 Inzidenz und Risikofaktoren der ACE-H – induzierten Angioödeme.....	11
1.1.3 Mechanismen der Entstehung ACE-H – vermittelter Angioödeme	12
1.1.4 Behandlung des ACE-Hemmer induzierten Angioödems	13
1.1.4.1 C1-INH Ersatztherapie	14
1.1.4.2 Neuere therapeutische Ansätze	15
1.2 Das Kallikrein Kinin System (KKS)	16
1.2.1 Bradykinin.....	19
1.2.1.1 Die Entdeckung von Bradykinin	19
1.2.1.2 Der Abbau von Bradykinin.....	20
1.2.2 Bradykinin Rezeptoren	21
1.2.2.1 Bradykinin-B1-Rezeptor	22
1.2.2.2 Bradykinin-B2-Rezeptor	23
1.2.2.3 Durch B1 und B2 vermittelte Signalwege	26
1.2.2.4 Genetische Polymorphismen von B1 und B2	29
1.2.3 Physiologische Funktionen von Bradykinin und Bradykinin-Rezeptoren	31
1.2.3.1 Vasodilatatorische und vasokonstriktorische Wirkung.....	31
1.2.3.2 Antioxidative Wirkung.....	32
1.2.3.3 Inflammatorische und anti-inflammatorische Wirkung	33
1.2.3.4 Weitere Wirkungen	35
1.2.4 Die Bedeutung von Bradykinin und Bradykinin-Rezeptoren in Physiologischen Prozessen	37
1.2.4.1 Vaskuläre Pathologien	37
1.2.4.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen	38
1.2.4.3 Nierenerkrankungen.....	39
1.2.4.4 Krebs.....	40
1.2.4.5 Asthma	41
1.3 Die endotheliale Permeabilität.....	42
1.3.1 Die endothelialen Barrieren	42
1.3.1.1 Transzelluläre Permeabilität.....	44
1.3.1.2 Parazelluläre Permeabilität	45
1.3.2 Arten der Permeabilität.....	47
1.3.2.1 Die basale Permeabilität (BP)	48
1.3.2.2 Die akute vaskuläre Hyperpermeabilität (AVH).....	48
1.3.2.3 Die chronische vaskuläre Hyperpermeabilität (CVH)	50
1.4 Regulierung der vaskulären Permeabilität	51
1.4.1 Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF	51
1.4.2 Histamin	52
1.4.3 Bradykinin.....	52
1.5 Fragestellung	53
2 Material und Methoden	55
2.1 Puffer und Lösungen.....	55
2.2 Labortiere	59
2.2.1 Mäuselinien und Tierhaltung	59
2.2.2 Fütterungsversuche.....	60
2.2.2.1 Organisches Nitrat PETN	60
2.2.2.2 N ^w -nitro-L-Arginin	61

2.2.3	Injektionsversuche.....	61
2.2.4	Genotypisierung der transgenen Tiere	61
2.2.4.1	Isolierung von genomischer DNA aus Biopsien der Maus.....	61
2.2.4.2	Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR	62
2.3	Zellkulturen und Inkubation.....	64
2.3.1	Isolierung von porvinen Aortenendothelzellen.....	64
2.3.2	Bestimmung der Reaktivität des Endothels	65
2.4	Präparation und Analyse von Proteinen.....	65
2.4.1	Proteinisolierung.....	65
2.4.1.1	Isolierung von Proteinen aus Geweben der Maus.....	66
2.4.1.2	Isolierung von Proteinen aus bEnd.3 Zellen.....	66
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	66
2.4.3	Western-Blot.....	67
2.4.3.1	Detektion der PVDF-Membran auf einem Röntgenfilm	69
2.4.3.2	Detektion der Nitrocellulose-Membran mit dem Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner	69
2.5	Präparation und Analyse der RNA	69
2.5.1	Isolierung der RNA	70
2.5.1.1	Tierische Gewebe	70
2.5.1.2	Porvine Aortenendothelzellen (PAEC) und bEND.3 Zellen	70
2.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	71
2.5.3	cDNA-Synthese	71
2.5.4	Realtime-PCR	71
2.5.4.1	Grundlagen der Realtime-RT-PCR.....	71
2.5.4.2	Realtime-RT-PCR der B2 mRNA Expression.....	74
2.5.4.3	Relative Quantifizierung der mRNA Expression nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	74
2.6	Miles Assay	75
2.6.1	Theoretische Grundlagen.....	75
2.6.2	Durchführung.....	76
2.6.3	Standardkurve	78
2.7	Deglykosylierung.....	79
2.8	Calcium-Assay.....	79
2.9	Zwei-Photonen Mikroskopie	81
2.10	Statistik.....	83
3	Ergebnisse	85
3.1	Regulation des B2-Rezeptors durch NO.....	85
3.1.1	Validierung verschiedener anti-B2-Antikörper	85
3.1.2	Der Einfluss von NO auf die endotheliale B2 Expression in kultivierten Zellen	88
3.1.2.1	Untersuchungen in porvinen Endothelzellen aus der Aorta (PAEC)	88
3.1.2.2	Untersuchungen in zerebralen Endothelzellen (bEND.3).....	89
3.1.2.3	Untersuchungen an Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs).....	92
3.1.3	Effekt von NO auf die B2 -induzierte Ca^{2+} Signalisierung.....	93
3.1.3.1	Bradykin induzierte Ca^{2+} - Freisetzung.....	93
3.1.3.2	Hemmung des B2 Rezeptors durch Icatibant.....	94
3.1.3.3	Effekt von DEA/NO auf die durch Bradykin induzierte Ca^{2+} -Freisetzung	95
3.1.4	Effekt der vaskulären NO Bioverfügbarkeit auf die B2-Protein-Expression <i>in vivo</i>	96
3.1.5	Wirkung von endogenem vaskulärem Bradykinin auf die B2 Proteinexpression <i>in vivo</i>	98
3.1.6	Bestimmung der vaskulären Bradykinin-Aktivität an der Maus-Aorta	100
3.2	Veränderungen der vaskulären Permeabilität in der dorsalen Haut von C57BL/6 Mäusen	102
3.2.1	Validierung der PBS-Kontrolle.....	102

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2	Bradykinin-induzierte Vaskuläre Permeabilität	103
3.2.3	Labradimil-induzierte vaskuläre Permeabilität	106
3.2.4	Icatibant hemmt die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität	108
3.2.5	Diclofenac hemmt die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität	110
3.2.6	L-NAME hat keine Wirkung auf die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität 112	
3.3	eNOS^{-/-} Mäuse zeigen keine Veränderte Vaskuläre Permeabilität durch Behandlung mit Bradykinin oder Labradimil.....	113
3.4	Vaskulärer oxidativer Stress hat keinen Einfluss auf die durch Bradykinin und Labradimil bedingte vaskuläre Permeabilität	115
3.5	Charakterisierung eines neuen transgenen Mausmodells mit endothelialer Überexpression des Bradykinin-B2-Rezeptors.....	116
3.5.1	Die Überexpression des Bradykinin-2-Rezeptors erhöht die durch Bradykinin verursachte vaskuläre Permeabilität.....	117
3.5.2	Reduktion der Vaskulären Permeabilität durch Icatibant in der Mauslinie B2 ^{tg}	118
3.6	Physiologische Extravasation im Ohrmodell der Maus	120
4	Diskussion	122
4.1	Wirkung von NO, Bradykinin, C1-INH oder Icatibant auf die Proteinexpression und Aktivität des B2 123	
4.1.1	Validierung verschiedener anti-B2-Antikörper	123
4.1.2	Der Einfluss von NO auf die endotheliale B2 Expression in kultivierten Zellen	126
4.1.3	Effekt von NO auf die B2 -induzierte Ca ²⁺ Signalgebung	132
4.1.4	Effekt der vaskulären NO Bioverfügbarkeit auf die B2-Protein-Expression <i>in vivo</i>	134
4.1.5	Wirkung von endogenem vaskulärem Bradykinin auf die B2 Proteinexpression <i>in vivo</i>	137
4.1.6	Bestimmung der vaskulären Bradykinin-Aktivität an der Maus-Aorta	140
4.2	Veränderungen der vaskulären Permeabilität in der dorsalen Haut von C57BL/6 Mäusen	142
4.2.1	Bradykinin- und Labradimil-induzierte Vaskuläre Permeabilität.....	142
4.2.2	Die Wirkung von Icatibant und Diclofenac auf die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität.....	144
4.2.3	Die Wirkung einer veränderten NO-Bioverfügbarkeit auf die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität	145
4.2.4	Die Wirkung von vaskulärem oxidativem Stress und der erhöhten B2 Expression auf die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität	147
5	Zusammenfassung.....	149
6	Summary	151
7	Bibliografie.....	153
Publikationen		180
Originalarbeiten		180
Abstracts		181
Lebenslauf.....		182
Danksagung		183
VERSICHERUNG AN EIDES STATT		184

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a.u.	willkürliche Einheiten (arbitrary units)
AAÖ	Allergisches Angioödem
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (Angiotensin Converting Enzyme)
ACE-H	Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms
ACEi	durch ACE induziert
AJ	Adherens Junctions
Anti-B2_K	Antikörper gegen den Bradykinin-2-Rezeptor (Quelle: Kaninchen)
Anti-B2_M	Antikörper gegen den Bradykinin-2-Rezeptor (Quelle: Maus)
Anti-B2_MH	Antikörper gegen den Bradykinin-2-Rezeptor (Quelle: Maus/Human)
AÖ	Angioödem
APP	Aminopeptidase P
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATII	Angiotensin II
AVH	<i>Akute vaskuläre Permeabilität</i>
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
B2 ^{tg}	Mäuselinie mit endothelspezifischer Überexpression des humanen Bradykinin-2-Rezeptors B2 (entspricht Mäuselinie BK ⁺⁺)
bEnd.3	Murine cerebrale Endothelzelllinie
BK	Bradykinin
BK ⁺⁺	Mäuselinie mit endothelspezifischer Überexpression des humanen Bradykinin-2-Rezeptors B2 (entspricht Mäuselinie B2 ^{tg})
B1	Bradykinin-1-Rezeptor
B2	Bradykinin-2-Rezeptor
B2 ⁿ	Transgen-negatives Geschwistertiere der Mäuselinie BK ^{tg} (entspricht Mäuselinie BK ⁿ)
BP	Basale Permeabilität
BSA	Bovines Serumalbumin
C101A-eNOS-tg	Transgene Mauslinie mit gefäßspezifischer Expression des bovinen eNOS cDNA-Fragmentes (entspricht Mäuselinie Mu ⁺⁺)
C101A-eNOS-n	Transgen-negatives Geschwistertiere der Mäuselinie C101A-eNOS-tg
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
CaM	Calmodulin
CBP	CREB-Bindeprotein
CCL2	CC-Chemokinligand 2
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPM	Carboxypeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N
CREB	cAMP response element binding protein
C _t	Threshold-Cycle = Zyklus, bei dem eine bestimmte Fluoreszenz-Signalstärke überschritten wird
CVH	Chronische vaskuläre Permeabilität
DEA/NO	2-(-Diethylamino)-diazemat-2-oxid/Stickstoffmonoxid

DETA/NO	Diethylentriamin/Stickstoffmonoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPPIV	Dipeptidyl-Peptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS III)
eNOS ^{-/-}	transgene eNOS Knockout Maus
eNOS ⁿ	nicht transgenes Geschwistertier
eNOS ^{tg}	transgene eNOS-überexprimierende Maus
ERK	Protein des MAP-Kinase-Signalwegs (ERK1/ERK2 Kaskade)
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GA	Guanylatzyklase A
GC	Guanylatzyklase C
GFP	grün fluoreszierendem Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GK	Gewebskallikrein
GMP	Glomeruläre mikrovaskuläre Proliferationen (glomeruloid microvascular proliferations)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
H ₂ O UP	Ultrareines Wasser
HAE	Hereditäres Angiödem
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMWK	Hochmolekulares Kininogen (high molecular weight kininogen)
hprt1	Gen, welches für Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase kodiert
HUVECs	Endothelzellen der Nabelschnurvene (<i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
i.d.	intradermal
i.v.	intravenös
I/D	Insertion/Deletion
iCa	intrazelluläres Calcium
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS II)
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kD	Kilodalton
kg KG d ⁻¹	Kilogramm Körpergewicht pro Tag
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheiten
KHP	Krebs-HEPES- Puffer
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LMWK	Niedermolekulares Kininogen (<i>low molecular weight kininogen</i>)
L-NA	N _ω -Nitro-L-Arginin
L-NAME	L-Nitroarginin-methylester
Lys-BK	Lysin-Bradykinin
M	Molar
MAP- Kinase-Weg	(englisch Mitogen-Activated Protein)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
min	Minuten

MLKK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
Mu ⁺⁺	Transgene Mauslinie mit gefäßspezifischer Expression des bovinen eNOS cDNA-Fragmentes (entspricht Mäuselinie C101A-eNOS-tg)
MW	Molekülmasse
NEP	neutrale Endopeptidase
NEP	Neutrale Endopeptidase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS I)
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Ipegal
OG	Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green
PAEC	Porvine Aortenendothelzellen; <i>porcine aortic endothelial cells</i>
PBS	Saliner Phosphat-Puffer (Phosphate buffer saline)
PETN	Pentaerythryltetranitrat (NO-Donator)
PG	Prostaglandin
PK	Plasmakallikrein
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A2
PLC β	Phospholipase beta
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotation pro Minute
RT	Reverse Transkription
RTp	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of the mean)
Ser	Serin
TAMRA	Tetra-methylrhodamin
Thr	Threonin
TJ	Tight junctions
TPLSM	Two-Photon Laser Scanning Microscope
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick and labeling
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monooleat
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VE-cadherin	Vaskuläres endotheliales Cadherin (vascular endothelial cadherin)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Endothelwachstumsfaktor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
VVO	Vesikuläre vakuoläre Organellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 DAS NICHT ALLERGISCHE ANGIOÖDEM

Das Angioödem (AÖ), auch Quincke, ist eine Schwellung der Schleimhaut und/oder Submukosa der Haut, die die Atmung beeinträchtigen kann und potentiell lebensbedrohlich ist (Bas, Hoffmann and Kojda, 2006). Manifestationsorgane sind vor allem Rachen, Kehlkopf und die Zunge, was häufig eine Notfallbehandlung und mehrtägige Krankenhausaufenthalte erforderlich macht. Zu den charakteristischen Symptomen gehören Atemnot, Fremdkörper- und Engegefühle im Hals, Stridor, Speichelfluss und Schluckbeschwerden sowie Schwierigkeiten beim Sprechen. Die Schwellung der Atemwege kommt selten vor, ist aber potenziell lebensbedrohlich und erfordert eine anti-ödematöse Notfalltherapie. Von den Schwellungen können aber auch andere Körperteile betroffen sein, z.B. die Haut, der Magen-Darm-Trakt und in seltenen Fällen Extremitäten oder Weichteilorgane. Abdominale Schmerzen und Durchfall können auch auftreten (Bas, Hoffmann, *et al.*, 2007; Banerji, 2010; Bork, 2010; Bork *et al.*, 2012).

1.1.1 PATHOPHYSIOLOGIE UND KLASSIFIZIERUNG DES ANGIOÖDEMS

Bei der Einteilung von AÖ wird unterschieden zwischen dem allergisch bedingten AÖ, welches über Mastzellen und Immunglobulin E (IgE) vermittelt ist, sowie der nicht-allergischen Form, die gewöhnlich über Bradykinin vermittelt ist (Bas, Adams, *et al.*, 2007).

Allergische AÖ treten als Ödeme der Subkutis auf, und stellen somit ein Teilbild oder Äquivalent einer Urtikaria dar, wobei die Urticaria-charakteristischen Quaddeln als Ödeme des Coriums zu betrachten sind. Somit handelt es sich bei beiden Krankheitsbildern um einen gemeinsamen Histamin-vermittelten pathologischen Mechanismus, der sich in unterschiedlichen Gewebearten manifestiert.

Beim dem rezidivierenden AÖ handelt es sich hingegen um Erkrankung, deren Pathophysiologie und klinisches Bild ursächlich durch erhöhte Plasma- / Gewebespiegel von

Bradykinin induziert werden und daher auch als kininvermittelte Angioödeme bezeichnet werden (Agostoni and Cicardi, 2001). Eine solche Erhöhung kann das Ergebnis einer Überproduktion von Bradykinin sein, beispielsweise beim angeborenen oder erworbenen Angioödem als Reaktion auf einen funktionellen C1-INH Mangel. Das hereditäre Angioödem (HAE) wird durch einem ererbten C1-Inhibitor-Mangel verursacht. C1-INH gilt als wichtigster Regulator des Kallikrein-Kinin-Systems, das die Inhibition des plasmatischen Kallikreins und des Faktor XIIa steuert. Kommt es zu einer akuten Attacke beim HAE, wird Kallikrein durch den C1-Inhibitor-Mangel nicht ausreichend gehemmt und es entsteht lokal vermehrt Bradykinin, was letztendlich die Schwellungen verursacht. Bei dem HAE wird zwischen verschiedenen Untergruppen unterschieden (Lunn and Banta, 2011; Busse and Buckland, 2013):

- **Typ I** 80-85 % der Fälle
geringe C1-INH-Konzentrationen
- **Typ II** 15-20 % der Fälle
Normale C1-INH-Konzentration, Funktion eingeschränkt
- **Typ III** Glykosylierung von FXII
wegen Funktionsdefekt (Björkqvist *et al.*, 2015)

Bei dem erworbenen AÖ durch C1-INH-Mangel ist differenzialdiagnostisch keine familiäre Häufung feststellbar. Teilweise sind Autoantikörper gegen C1-INH nachweisbar und die plasmatische Konzentration der Bindungskomponente C1q von IgG und IgM Globulinen ist oft vermindert (Bas, Hoffmann, *et al.*, 2007; Banerji, 2010; Bork, 2010; Bork *et al.*, 2012).

Als zweite wichtige und wesentlich häufigere Form muss das ACE-Hemmer (ACE-H) induzierte Angioödem genannt werden (Bas, Adams, *et al.*, 2007; Bas, Hoffmann, *et al.*, 2007). Hierbei handelt es sich um eine medikamentös induzierte Störung des natürlichen Abbaus von Bradykinin. ACE-Hemmer sind weit verbreitete, wirksame und gut verträgliche Antihypertensiva. Sie aktivieren metabolische und zelluläre Mechanismen, die nicht nur den Blutdruck senken, sondern auch das Endothel, das Herz, die Nieren und das Gehirn schützen, als Zielorgane eines erhöhten Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Der therapeutische Nutzen dieser Arzneistoffe liegt in der Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse und der Verbesserung der Lebensqualität bzw. des Überlebens von Patienten (Regoli, Plante and Gobeil, 2012). Eine Hyperkaliämie und erhöhte vaskuläre Permeabilität sind bisher als Nebenwirkungen bekannt (Kaplan, 2010a). Bei etwa 5% bis 35% der Patienten kommt es zu trockenem Husten, (Bas, Hoffmann, *et al.*, 2007; Bezalel *et al.*, 2015). Generell treten in 0,7% der Fälle die Symptome eines AÖ erstmalig nach einer unkomplizierten therapeutischen Anwendungsdauer von 2 bis 3 Jahren auf (Makani *et al.*, 2012). Heute kommt es nur sehr selten zu Todesfällen durch diese Krankheit (Kim *et al.*, 2014), wobei Patienten am meisten

gefährdet sind, bei denen das Ödem völlig unerwartet und in den oberen Luftwegen auftritt. Die Todesursache ist stets die Erstickung durch ein Larynxödem.

Insofern wäre zu erwarten, dass sich die auf Bradykinin beruhenden Erkrankungsbilder sehr ähneln. Dies ist jedoch nicht der Fall. So besteht nach klinischen Erfahrungen bislang kein Zusammenhang zwischen der Aktivität von C1-INH im Plasma und der Frequenz und Schwere der Attacken (Kelemen *et al.*, 2010). Ebenfalls bleibt bisher unbekannt weshalb nur 0,5 Prozent der Patienten, die mit ACE-Hemmern behandelt werden, über eine Episode von Angioödemem berichten (Solomon *et al.*, 2005). Schließlich beschreiben HAE-Patienten keinen trockenen Husten, obwohl dies eine häufige Nebenwirkung der ACE-Hemmer darstellt, die – wie Angioödeme – durch Bradykinin verursacht wird (Fox *et al.*, 1996). Darüber hinaus kommt es in einigen Fällen durch wiederholte und langfristige Pharmakotherapie mit C1-INH bei HAE-Patienten zu einer erhöhten Frequenz von Anfällen (Bork and Hardt, 2009). Dies belegt, dass die an der Bradykinin-Aktivität beteiligten Mechanismen noch unzureichend verstanden werden, was entsprechende Probleme bei der Erkennung und Behandlung der Erkrankung mit sich bringt. Es wird erwartet, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit das Verständnis des pathophysiologischen Potentials der B2 Stimulation und die Wirkung und Nebenwirkung zugelassener Arzneimittel erweitern.

1.1.2 INZIDENZ UND RISIKOFAKTOREN DER ACE-H – INDUZIERTEN ANGIOÖDEME

Zahlreiche Studien bezüglich der durch ACE induzierten AÖ sind retrospektiv, wobei es möglicherweise zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Inzidenz kam. Bei einer vergleichenden randomisierten und doppelt verblindeten Studie zur Wirkung von Enalapril mit Omapatrilat wurde eine Inzidenz von 6,8 AÖ pro 1000 Patienten berichtet, die über einen Zeitraum von 24 Wochen Enalapril erhielten (Kostis *et al.*, 2005). Mehrere Studien haben auch gezeigt, dass unter bestimmten Bevölkerungsgruppen, darunter Frauen und Afro-Amerikaner, ein signifikant erhöhtes Risiko besteht, an einem ACE induzierten AÖ zu erkranken. Die überwiegende Anzahl der Studien belegen, dass mehr als die Hälfte dieser AÖ in den ersten 90 Tagen der Behandlung mit einem ACE Inhibitor (ACE-H) auftreten. Ein erhöhtes Risiko bleibt auch nach einjähriger Einnahme bestehen (Brown *et al.*, 1996; Kostis *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2008).

Die größte Beobachtungsstudie bezüglich durch Arzneimittel induzierter AÖ wurde von Miller *et al.* durchgeführt (Miller *et al.*, 2008), mit 595.081 Kriegsveteranen die durch das amerikanische Gesundheitssystem für Kriegsveteranen versorgt wurden. Die Häufigkeit der

durch ACE-H verursachten AÖ war höher bei Älteren, sowie bei Veteranen die an chronischer Herzinsuffizienz oder koronarer Herzerkrankungen litten. Bei Diabetikern war das Risiko eher geringer, an einem durch ACE-H verursachten AÖ zu erkranken. Kostis et al. (2005) berichtete, dass auch jahreszeitlich bedingte Allergien und mehrfache Hautausschläge als zusätzliche Risikofaktoren zum ACE induzierten AÖ beitragen.

Weitere Studien belegen, dass etwa 30-40% aller AÖ die in einer Notaufnahme behandelt wurden, Verdachtsfälle von ACE induzierten AÖ waren, die somit die häufigste Ursache der nicht-allergischen AÖ darstellten (Megerian, Arnold and Berger, 1992; Pigman and Scott, 1993; Gabb *et al.*, 1996; Banerji *et al.*, 2008; Bluestein *et al.*, 2009; Kaplan, 2010b)

1.1.3 MECHANISMEN DER ENTSTEHUNG ACE-H – VERMITTELTER ANGIOÖDEME

ACE-Hemmer blockieren das Angiotensin Converting Enzyme (ACE, Kininase II), ein Enzym das überwiegend in der Lunge vorkommt und die Umsetzung des schwach vasokonstriktorischen Angiotensin I in Angiotensin II katalysiert. Folglich entsteht weniger Angiotensin II, was sich auf das kardiovaskuläre System und die Nieren auswirkt. ACE-Hemmer senken den Blutdruck und verringern somit die Nachlast für die Herzarbeit. Daher sind ACE-Hemmer auch sehr gut zur Behandlung der Herzinsuffizienz geeignet und haben auch prognostisch günstige Auswirkungen bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung (Garg, 1995; Yusuf *et al.*, 2000).

Durch die ACE-Hemmung kommt es zwar zunächst zu einer Abnahme von Angiotensin II, später steigen jedoch die Werte wieder an, da Angiotensin II durch alternative Synthesewege gebildet wird (Hoover *et al.*, 2010). Obwohl neben der ACE noch weitere Peptidasen (vor allem Aminopeptidase P) am Bradykinin-Abbau beteiligt sind (s. auch 1.2.1.2), ist die Hemmung der ACE ausreichend um eine Vasodilatation zu verursachen (Gainer *et al.*, 1998), die durch erhöhte Bradykinin-Konzentrationen vermittelt wird. Gleichzeitig kommt es zur erhöhten Gefäßpermeabilität in den postkapillären Venolen, was zur Bildung von Ödemen führt (Agostoni *et al.*, 2004; Kaplan, 2010a).

Bei der ursächlichen Analyse des ACE-H induzierten AÖ stellt sich auch die Frage, weshalb AÖ nur bei einer kleineren Gruppe von Patienten nach ACE-Behandlung auftreten. Es gibt Hinweise darauf, dass ACE-H induzierte Angioödeme vor allem bei Patienten auftreten, deren Aminopeptidase oder neutrale Peptidase eine eingeschränkte Funktion aufweist (Molinaro, Cugno, *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass mehrere Genvarianten der sekundären Peptidasen,

die in bestimmten Bevölkerungsgruppen gehäuft auftreten, zu einer erhöhten Anfälligkeit für ACE-H bedingten Angioödem führen (Hoover *et al.*, 2010). Obwohl der biologische Mechanismus des durch ACE-H induzierte AÖ sich vom HAE unterscheidet, kommt es in beiden Fällen zu einem erhöhten Bradykinin-Serumspiegel (Cugno *et al.*, 2003; Kaplan and Ghebrehiwet, 2010). So zielt die Behandlung von AÖ darauf ab, die Bradykinin-Konzentration zu senken, entweder durch eine Verringerung der BK-Produktion, Erhöhung des BK-Abbaus oder die Blockade der Wirkung von BK am Rezeptor. Derartige Strategien wären erfolgversprechend bei der Behandlung der beiden Formen des AÖ.

1.1.4 BEHANDLUNG DES ACE-HEMMER INDUZIERTEN ANGIOÖDEMS

Grundsätzlich müssen Patienten mit einem akuten durch ACE-H induzierten AÖ des Kopf-Hals-Bereichs stationär überwacht werden, mit vorhandener Tracheotomie-Bereitschaft. Sobald der ätiologische Zusammenhang zum AÖ nachgewiesen ist, muss der ACE-H abgesetzt und durch andere Antihypertensiva ersetzt werden, aufgrund der Gefahr weiterer Angioödem-Rezidive (Bas *et al.*, 2004; Bas, Hoffmann and Kojda, 2006). Die bestehenden therapeutischen Optionen sind unterschiedlich, gemäß den Leitlinien verschiedener Länder (Kaplan, 2014).

Eine anti-ödematöse Notfalltherapie mit Kortikosteroiden, Antihistaminika und ggf. Epinephrin-Inhalation sollte verabreicht werden wenn der ätiologische Hintergrund bei einem akuten Angioödem nicht geklärt ist. Bei Kinin-induzierten AÖ (hereditär oder durch ACE-H induziert) zeigt diese Behandlung jedoch keine oder nur eine geringe Wirkung (Bowen *et al.*, 2004; Bas, Hoffmann, *et al.*, 2007; Banerji, 2010; Farkas, 2013; Lewis, 2013).

Die gegenwärtigen therapeutischen Optionen für das HAE sind in Abbildung 1.1-1 dargestellt.

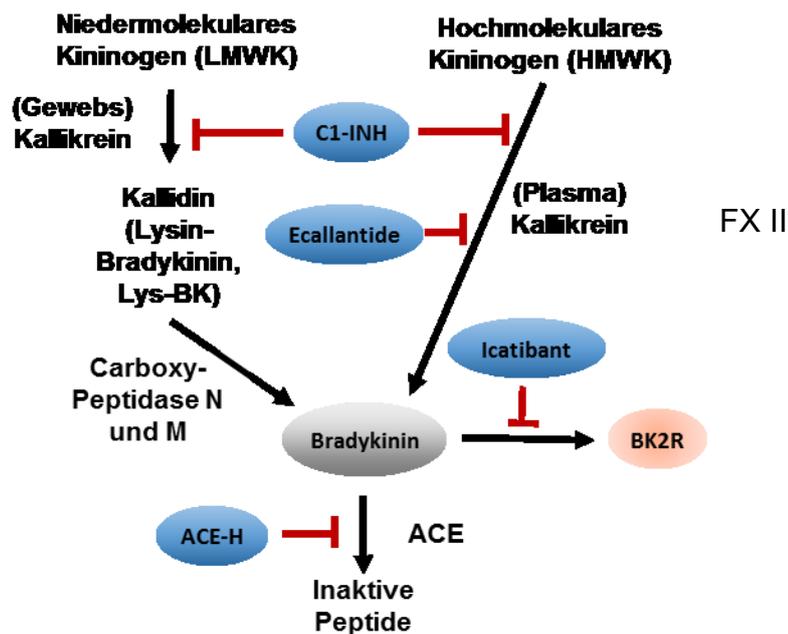


Abbildung 1.1-1 Therapeutische Interventionen des HAE. C1-INH: C1-Inhibitor; HMWK: Hochmolekulares Kininogen; BK: Bradykinin; B2: Bradykinin Rezeptor 2; FXII: Faktor 12 (Quelle: Lewis, 2013; Bas, Adams, et al. 2007).

1.1.4.1 C1-INH Ersatztherapie

Die intravenöse Gabe von C1-INH-Konzentraten, welche aus humanem Plasma gewonnen werden, stellt eine kausale Behandlungsoption zur Senkung des Bradykininspiegels dar (Bas, Hoffmann, *et al.*, 2007; Banerji, 2010).

Im Jahr 2009 erteilten die US- Zulassungsbehörden für neue Arzneimittel (FDA) die Zulassung für einen aus Plasma gewonnenem C1-INH (Berinert®, CSL Behring) zur Behandlung akuter Attacken des HAE im Gesichts- und Bauchbereich bei erwachsenen und jugendlichen Patienten (FDA, 2009). In Deutschland ist das Arzneimittel seit 30 Jahren zugelassen. Durch die erweiterte europäische Zulassung im Jahr 2013 kann Berinert® auch zur Kurzzeitprophylaxe präventiv verabreicht werden, um akute Episoden des HAE bei Patienten im Kindes- und Erwachsenenalter zu vermeiden, die sich einem medizinischen, zahnärztlichen oder operativen Eingriff unterziehen. Ruconest® (Pharming Gruppe, Leiden, NL) ist ein weiterer rekombinanter C1-INH der in Europa zugelassen ist zur Behandlung des HAE. Obwohl diese Wirkstoffe nicht zugelassen sind zur Therapie des ACE-H bedingten AÖ, kommt es mehreren Berichten zufolge zur Besserung bei Patienten die nicht auf die Behandlung mit

Kortikosteroiden und Antihistaminika ansprechen (Steinbach, Schweder and Freitag, 2001; Nielsen and Gramstad, 2006; Gelée *et al.*, 2008).

1.1.4.2 Neuere therapeutische Ansätze

Ecallantid

Ecallantid (DX-88) ist ein Kallikrein-Hemmstoff der zur Behandlung des hereditären Angioödems eingesetzt wird. Dieses rekombinante Protein aus 60 Aminosäuren wurde im Jahr 2009 von der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA zugelassen und wird dort von dem Pharmaunternehmen Dyax unter dem Markennamen Kalbitor™ vertrieben. Eine Zulassung für den europäischen Markt steht derzeit noch aus. Durch die Hemmung des Kallikreins wird das Gleichgewicht zwischen Bradykinin-Synthese und – Abbau wiederhergestellt. Bei subkutaner Anwendung dieses Biopharmazeutikums trat jedoch bei 2,7 % der Patienten innerhalb von 1 Stunde nach Administration ein anaphylaktischer Schock auf (Banerji, 2010; Lunn and Banta, 2011). Auch Ecallantid war wirksam bei der Behandlung des durch ACE-I bedingten AÖ (McDaniel, Baram and Wordell, 2011; Richards, Cohn and McDaniels, 2011; Cohn, McDaniels and Richards, 2012), und entsprechende klinische Studien wurden durchgeführt zum Nachweis der Wirksamkeit und Sicherheit dieses Wirkstoffes. (National Institute of Health, 2009, 2011), wobei derzeit noch keine verlässliche Ergebnisse vorliegen.

Icatibant

Am 11. Juli 2008 hat die Pharmafirma Jerini von der Europäischen Kommission die Zulassung für Firazyr® erhalten, einer Injektionslösung mit dem Wirkstoff Icatibant, zur Behandlung akuter Attacken des HAE. Damit wurde die erste Therapieform für die Indikation HAE in allen EU-Staaten zugelassen. Es handelt sich um einen hoch selektiven, kompetitiven und schnell wirksamen Antagonisten des Bradykinin Rezeptors B2, der aus 10 teilweise nicht proteinogenen Aminosäuren besteht und subkutan verabreicht wird (Cruden and Newby, 2008; Banerji, 2010). Die Sicherheit und Wirksamkeit von Icatibant wurde in verschiedenen klinischen Studien untersucht, wobei es zu einer signifikanten Verringerung des Zeitraums bis zum Abklingen der ödematösen Symptome kam (Cicardi *et al.*, 2010; Lumry *et al.*, 2011). Unerwünschte Wirkungen waren Fieber und erhöhte Transaminase-Werte, anaphylaktische Reaktionen wurden jedoch nicht verzeichnet. Nachdem BK eine wichtige Rolle spielt bei der

blutdrucksenkenden Wirkung von ACE-H, kommt es durch den therapeutischen Einsatz von Icatibant zu einer abgeschwächten blutdrucksenkenden Wirkung von ACE-H (Gainer *et al.*, 1998).

Icatibant wurde auch in verschiedenen Fallstudien zur Behandlung des durch ACE-H verursachten AÖ verwendet (Bas *et al.*, 2010; Schmidt, Hirschl and Trautinger, 2010; Perez *et al.*, 2011). In einer Phase 2-Studie konnte gezeigt werden dass es auch hier zu einer signifikanten Verringerung des Zeitraums bis zum vollständigen Abklingen der Ödeme kam, im Vergleich zur Kombinationstherapie aus einem Glukokortikoid und einem Antihistaminikum bestand (National Institute of Health, 2010; Bas *et al.*, 2015).

1.2 DAS KALLIKREIN KININ SYSTEM (KKS)

Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) ist ein komplexes physiologisches Regelsystem welches ein schlecht abgrenzbares System von Blut-Proteinen einschließt, die im Menschen bei der Regulierung folgender wichtiger Funktionen mitwirken (Costa-Neto *et al.*, 2008):

- Blutdruck und Natrium-Homöostase
- Inflammatorische Vorgänge
- Renale, cardiale und neurologische Funktionen
- Nozizeption
- Kontraktion der glatten Muskulatur
- Zellproliferation, Angiogenese und Migration

Das KKS-System wurde im Jahr 1909 von Abelous & Bardier beschrieben (Abelous and Bardier, 1909), nach der Entdeckung dass eine Injektion mit Urin (hochmolekulares Kininogen) Hypotonie verursachte. 1930 wurde dies Kininogen von Emil Karl Frey, Heinrich Kraut und Eugen Werle im humanen Urin nachgewiesen (Kraut, Frey and Werle, 1930).

Mediatoren des KKS sind Bradykinin und Kallidin, die als Vasodilatoren auf unterschiedliche Zellarten einwirken (Bhoola, Figueroa and Worthy, 1992). Die zentralen Elemente des KKS sind, gemäß der Abbildung 1.2-1 und der Erläuterungen im folgenden Text:

- **Kininogene** (hochmolekulares Kininogen, HMWK; niedermolekulares Kininogen, LMWK)
- **Kinine** (Bradykinin und Kallidin als wichtige vasoaktive Peptide)
- **Kininogenasen** (Kallikreine: Plasma- und Gewebe-Kallikrein)
- **Kininasen**
- **Bradykinin-Rezeptoren** (B1 und B2).

Kininogene sind saure Glykoproteine die hauptsächlich in der Leber gebildet und ins Blut abgegeben werden, wo sie als Komplex mit der Proteasevorstufe Präkallikrein zirkulieren. Beide Kininogene bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, wobei der C-terminale Bereich (6 Domänen) unterschiedlich ist, im Gegensatz zum identischen amino-terminalen Abschnitt (4 Domänen). Als Substrate von Kallikreinen und Vorläufern der Kinine kommen Kininogene vor allem in Plasma, Lymphe und interstitieller Flüssigkeit vor.

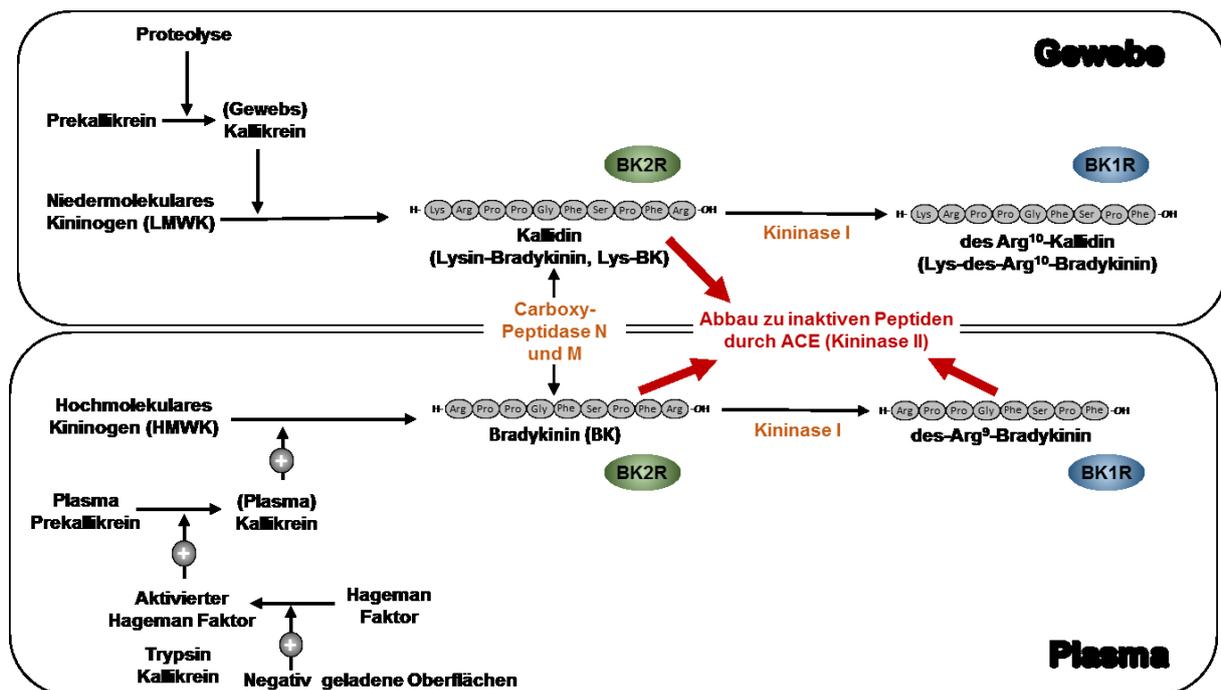


Abbildung 1.2-1 Das Kallikrein-Kinin-System (Quellen: (Sharma, 2012; Kaplan and Kusumam, 2014).

Im Plasma kommen beide Kininogene (LMWK und HMWK) vor (Miles, 1969), wobei etwa 15-20% des gesamten Plasma-Kininogens als HMWK vorliegt und sich als Bestandteil der intrinsischen Gerinnungskaskade an der Aktivierung des Faktors XI zum Faktor XIa beteiligt.

LMWK wird zudem noch in verschiedenen Körpergeweben gebildet und beteiligt sich an inflammatorischen Prozessen, wie z.B. bei Gewebeerletzungen (Yousef and Diamandis, 2001). Als kleineres Protein tritt LMWK durch die Kapillarwände und ist somit ein Substrat für Gewebe-Kallikrein, während HMWK nur in der Blutbahn vorkommt und als Substrat des Plasma-Kallikreins zu Bradykinin umgesetzt wird. Gewebe-Kininogen wurde zudem als molekularer Marker der Arteriogenese identifiziert, mit hoher Expression in wachsenden kollateralen Gefäßen der Ratte (Hillmeister *et al.*, 2008).

Kallikreine sind Kininogenasen, die aus Kininogen aktive Kinine durch Proteolyse freisetzen. Sie werden aus inaktiven Vorstufen (Präkallikreine) gebildet und werden in Gewebekallikrein (GK) und Plasmakallikrein (PK) unterteilt, die sich in Bezug auf Molekulargewicht, Substratspezifität und immunologischer Merkmale voneinander unterscheiden. Humanes Gewebe-Kallikrein umfasst eine Genfamilie auf dem chromosomalen Locus (19q13.4), die aus mindestens 15 Genen besteht, mit ähnlicher genomischer Organisation und signifikanter Homologie, sowohl auf Nukleotid- als auch auf der Protein-Ebene. Alle Gene sind putative Serin-Proteasen, die in verschiedenen Organen synthetisiert werden (Niere, Pankreas, Speicheldrüsen, Gefäßsystem, Skelettmuskeln) und die meisten von ihnen werden von Steroidhormonen reguliert (Yousef and Diamandis, 2001). Plasmatisches Kallikrein wird von einem einzigen Gen (*KLB1*) kodiert, in der Region q34-q35 des langen Armes von Chromosom 4 (Beaubien *et al.*, 1991; Murray, Chao and Chao, 1992). Dabei synthetisieren Hepatozyten zunächst das Präkallikrein, welches im Plasma als heterodimerer Komplex zirkuliert, wobei über 80 - 90% an HMWK gebunden vorliegt, im Verhältnis 1:1. Als ein einkettiges α -Globulin kommt Präkallikrein im humanen und tierischen Plasma in einer Konzentration von 35 - 50 $\mu\text{g/mL}$ vor (Mandle, Colman and Kaplan, 1976; Reddigari and Kaplan, 1989). Sobald es durch eine Entzündung zur erhöhten vaskulären Permeabilität kommt, treten Kininogen, Präkallikrein und Hageman-Faktor aus den Blutgefäßen. Durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen außerhalb der Blutgefäße (z.B. Kollagen, aber auch bakterielle Lipopolysaccharide) aktiviert sich der Hageman-Faktor (Faktor XII der Blutgerinnungskaskade) zum Faktor XIIa, welcher plasmatisches Prekallikrein zu Kallikrein umsetzt; dies setzt dann Bradykinin aus HMWK frei (Cochrane and Revak, 1980).

Weniger bedeutende Mechanismen zur Aktivierung des KKS verlaufen über den Kontakt des HMWK mit den Membranen endothelialer Zellen, was zur Aktivierung von Prekallikrein zu Kallikrein führt, mit nachfolgender Bradykinin-Freisetzung (Nishikawa *et al.*, 1992; Hasan, Zisman and Schmaier, 1998; Motta *et al.*, 1998). Die in der Blutbahn als inaktive Plasminogene vorkommenden Proenzyme aus der Gruppe der Fibrinolysefaktoren können nach Aktivierung zu Plasminen, sowohl BK als auch Des-Arg⁹-BK aus HMWK bilden (Molinaro *et al.* 2002). Faktor XIIa, XIa und Kallikrein konvertieren *in vitro* Plasminogen zu Plasmin, eine mögliche Bedeutung dieses Weges *in vivo* ist jedoch noch unklar.

Kinine sind biologisch aktive Oligopeptide die über zwei Stoffwechselwege erzeugt werden, dem plasmatischen und komplexeren System, welches durch die Aktivierung des endogenen Gerinnungssystem aktiviert wird. Am zweiten und einfacheren Weg ist das niedermolekulare Kininogen als Substrat des (Gewebs)-Kallikrein beteiligt. Kinine werden den Gewebshormonen zugeordnet und umfassen eine Gruppe von strukturell ähnlichen Peptiden. Dabei wird das Dekapeptid Kallidin aus LMWK von GK abgespalten, während das Nonapeptid

Bradykinin aus HMWK durch PK gebildet wird. Kallidin unterscheidet sich von Bradykinin nur durch ein zusätzliches Lysin am N-Terminus und kann durch die Carboxypeptidasen N oder M in Bradykinin umgewandelt werden. Kinine werden sehr schnell metabolisiert und inaktiviert (Halbwertszeit <15 Sekunden) durch unspezifische Exo- und Endopeptidasen, die üblicherweise als Kininasen bezeichnet werden (Sharma, 2009). Die in der Leber synthetisierte Carboxypeptidase (Kininase I), spaltet die C-terminale Aminosäure beider Peptide ab und führt aus Bradykinin und Kallidin jeweils zur Entstehung von des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin als aktive Metaboliten (Bhoola, Figueroa and Worthy, 1992). Diese entfalten, genauso wie ihre Präkursoren, starke und unterschiedliche agonistische Wirkungen an den Bradykinin Rezeptoren.

Es besteht eine enge funktionelle Kopplung zwischen dem Kallikrein-Kinin-System und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), denn das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), konvertiert nicht nur Angiotensin I zu Angiotensin II, was für die Aufrechterhaltung des Blutdruckes und der Regelung des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes von großer Bedeutung ist, sondern inaktiviert auch Bradykinin unter Bildung inaktiver Peptide. Somit wirkt das KKS in antagonistischer Weise auf das RAAS, was besonders für die Pathogenese verschiedener Erkrankungen von Bedeutung ist, wie in folgenden Abschnitten dargestellt (Tschöpe, Schultheiss and Walther, 2002).

1.2.1 BRADYKININ

1.2.1.1 Die Entdeckung von Bradykinin

Zusammen mit seinen Kollegen Wilson Teixeira Beraldo und Gastão Rosenfeld entdeckte Maurício Rocha das Bradykinin im Plasma von Tieren nach der Zugabe von Trypsin oder des Giftes der brasilianischen Lanzenotter-Schlange (*Bothrops jararaca*). Am isolierten Meerschweinchen-Ileum verursachte Bradykinin, im Vergleich zu Histamin und Acetylcholin, eine langsamere Verzögerung der Kontraktionen. Die Bezeichnung „brady“ (griech.: langsam) und „kinin“ (griech.: Bewegung) brachte diese Eigenschaft der gefundenen Substanz zum Ausdruck (Rocha e Silva, Beraldo and Rosenfeld, 1949).

Die AS-Sequenz des Nonapeptids Bradykinin ist in Abbildung 1.2-1 dargestellt, die Abbildung 1.2-2 zeigt die entsprechende Strukturformel (Summenformel: C₅₀H₇₃N₁₅O₁₁).

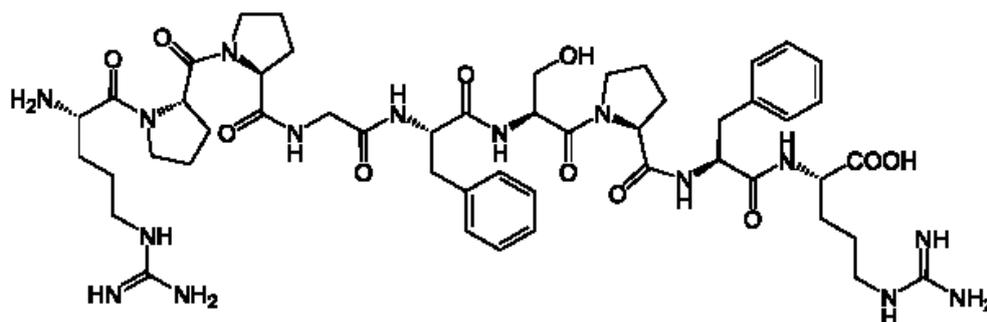
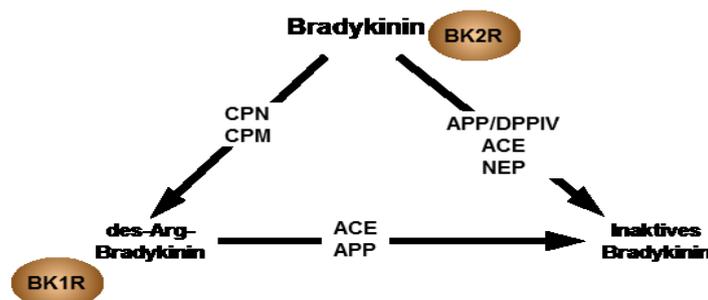


Abbildung 1.2-2 Strukturformel von Bradykinin

Bradykinin hat nur eine kurze Plasmahalbwertszeit von 15 s, und die plasmatischen Konzentrationen sind in der Regel sehr gering (0,2 – 7,1 pM) (Moreau *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Der Abbau von Bradykinin

Aus den des-Arg-Metaboliten von Bradykinin und Kallidin entstehen über die Kininase II, die mit dem Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE) identisch ist, verschiedene inaktive Metaboliten wie in Abbildung 1.2-3 gezeigt wird.



Bradykinin - Abbau

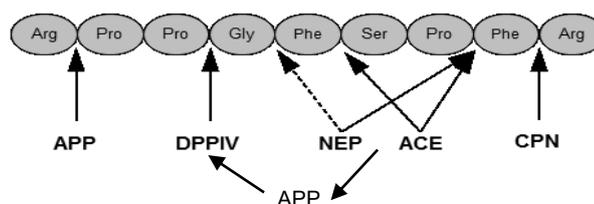


Abbildung 1.2-3 Abbau von Bradykinin. APP: Aminopeptidase P; DPPIV: Dipeptidyl-Peptidase IV; NEP: neutrale Endopeptidase; ACE: Angiotensin-konvertierendes Enzym; CPN: Carboxypeptidase N. (Quelle: (Kaplan, 2014) Die Aktivität von DPPIV nur nach Spaltung durch APP möglich, d.h. DPPIV spaltet inaktiven BK-Metabolit.

ACE entfernt von Bradykinin zunächst die beiden C-terminalen Aminosäuren Phe und Arg, gefolgt von einer anschließend Abspaltung von Ser und Pro, was zur Inaktivierung führt (Sheikh and Kaplan, 1989). ACE ist an die luminalen Oberfläche von Endothelzellen gebunden und kommt vor allem in der Lunge vor. In der gleichen Weise werden vom inaktiven Peptid Angiotensin I zwei C-terminalen Reste abgespalten, wodurch das vasokonstriktorisch wirksame Peptid Angiotensin II entsteht. Somit hat dieses Enzym eine doppelte Funktion, indem das gefäßerweiternde Bradykinin inaktiviert wird, und ein vasokonstriktorisch wirksames Peptid synthetisiert werden kann. Kinine werden auch von weniger spezifischen Kininasen inaktiviert, z.B. CPN (plasmatisch) und CPM (endothelial), welche die C-terminale Aminosäure Arginin von Bradykinin entfernen, wodurch des-Arg⁹-BK entsteht, ein spezifischer Agonist des B1, der jedoch B2 kaum aktivieren kann (Kuoppala *et al.*, 2000). ACE spaltet auch das Tripeptid Ser-Pro-Phe² von des-Arg⁹-BK, wodurch dieses Peptid seine Aktivität verliert und nicht mehr an B1 binden kann (Kaplan, 2014). Aminopeptidase P (APP), die neutrale Endopeptidase (NEP) und die Dipeptidyl-Peptidase IV (DPPIV) sind weitere Peptidasen die an dem Abbau von BK beteiligt sind. Ihre spezifischen Schnittstellen sind in der Abbildung 1.2-3 angegeben. Interessanterweise sind diese Peptidasen membrangebundene Glykoproteine (außer CPN, einem löslichen tetrameren Glykoprotein) und zugleich auch Metallopeptidasen mit Zink im katalytischen Zentrum. In biologischen Flüssigkeiten kommen sie in löslicher Form vor. Dabei ist ihre Bedeutung abhängig von der Tierart, dem analytischen Ansatz, dem biologischen Milieu und dem pathophysiologischen Zusammenhang (Moreau *et al.*, 2005; Kaplan, 2014).

1.2.2 BRADYKININ REZEPTOREN

Bradykinin entfaltet seine biologischen Wirkungen hauptsächlich über zwei Rezeptoren, den Bradykinin 1- und Bradykinin 2- Rezeptoren (B1 und B2) (Yousef and Diamandis, 2001; Hillmeister *et al.*, 2008). Beide Rezeptoren gehören zu der Superfamilie der G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (Yousef and Diamandis, 2001), die eine entscheidende Rolle spielen bei Entzündungsprozessen, Endo- und Exozytose, sowie bei der Verarbeitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen.

Die Entdeckung der BK- Rezeptoren begann mit den Untersuchungen von Regoli *et al.*, (Regoli, Barabé and Park, 1977), wobei zunächst B1 in der isolierten Kaninchen-Aorta entdeckt wurde, als Vermittler des kontraktiven Effektes. B2 wurde drei Jahre später von der

gleichen Arbeitsgruppe beschrieben, als ein Rezeptor der in den meisten Gewebearten konstitutiv exprimiert wird (Regoli and Barabé, 1980). Im Gegensatz dazu wies B1 in der Regel eine nur sehr geringe oder gar keine Expression auf unter physiologischen Bedingungen (Coelho *et al.*, 1997).

Die für B1 und B2 kodierenden Gene wurden den chromosomalen Regionen 14q32 (Chai *et al.*, 1996) und 14q32.1-14q32.2 (Ma *et al.*, 1994) zugeordnet. Die AS-Sequenzhomologie von B1 und B2 beträgt nur 36% (Menke *et al.*, 1994; Bachvarov *et al.*, 1996).

Spezifische Liganden von B2 sind Bradykinin und Kallidin (Lys-Bradykinin), während des-Arg⁹-Bradykinin und Lys-des-Arg¹⁰-Bradykinin die Agonisten von B1 sind (s. Abbildung 1.2-1). Dabei handelt es sich um die natürlichen Metaboliten von Bradykinin und Kallidin, welche durch die Carboxypeptidasen N und M gebildet werden (Regoli and Barabé, 1980).

1.2.2.1 Bradykinin-B1-Rezeptor

Der humane B1 ist aus 353 Aminosäuren (40,4 kDa) aufgebaut und es besteht etwa 70% genomische Homologie zur Sequenz des entsprechenden Gens von Maus und Ratte. Die Proteinsequenz wird ausschließlich von Exon 3 codiert (Bachvarov *et al.*, 1996; Yang and Polgar, 1996). Rezeptor-Epitope für die Bindung von G-Proteinen kommen an mehreren intrazellulären Domänen vor und bilden eine gemeinsame Bindungsstelle (Leeb-Lundberg, Mathis and Herzig, 1994). B1 hat als GPCR (Gαq und Gαi) eine charakteristische heptahelicale Struktur mit drei Konsensusstellen in extrazellulären Domänen für N-gebundene Glycosylierung, mit entsprechenden DRY (Asp-Arg-Tyr) und NPXXY (Asn-Pro-Tyr-XX) Motiven. Putative Stellen für die Phosphorylierung und Acylierung wurden auch beschrieben (Marceau, 1995).

Das Expressionsniveau von B1 im gesunden Gewebe ist sehr niedrig. Zu einer starken und schnellen Expression innerhalb weniger Stunden kommt es vor allem durch Verletzungen, inflammatorische und oxidative Stressbedingungen in Immunzellen oder anderen Gewebearten, die durch verschiedene proinflammatorische Zytokine (z.B. Interleukin-1β) sowie durch TNF-α vermittelt werden (Medeiros *et al.*, 2004). B1 wird daher eher eine strategische Rolle bei der chronischen Phase von entzündlichen immunbedingten Erkrankungen zugeordnet (Diabetes, Asthma, rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose). Der nukleäre Faktor kappa B (NF-κB) ist ein wichtiger Aktivator des B1 (Schanstra *et al.*, 1998), wodurch die verschiedenen Phasen des Leukozyten-Rekrutierungsprozesses (Zell Rolling, Adhäsion und Migration) induziert werden (McLean, Perretti and Ahluwalia, 2000). Dabei kommt es zu einer B1-induzierten Aktivierung von Leukozyten-Rezeptoren, wodurch die

Produktion pro-inflammatorischer Moleküle und auch die Leukozytenmigration induziert werden. Die Reaktionskaskade führt zur gesteigerten Synthese von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene, Hydroxyeicosatetraensäure und dem Thrombozyten-aktivierende Faktor (PAF), kennzeichnend für die typischen pathophysiologischen Effekte der Kinine (Böckmann and Paegelow, 2000).

In einer Studie von Su et al. (Su *et al.*, 2000) wurde gezeigt, dass die Stimulation von B1 über die NO-Synthese bei der Vasodilatation und der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist. Bei intrakoronarer Infusion von des-Arg⁹-Bradykinin kam es zu einer dosis-abhängigen Vasodilatation von Koronararterien, die nur von NOS-Inhibitoren abgeschwächt werden konnte, nicht jedoch von B2 Antagonisten (Lamontagne *et al.*, 1996).

B1 kann auch eine eher kompensatorische Rolle für einen fehlenden B2 übernehmen, wobei die Hochregulation während der Gewebeschädigung einen sinnvollen Mechanismus der Immunabwehr darstellt (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Unterschiedliche Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass der B1 auch bei kardiovaskulären Erkrankungen an der Regulation von Vasodilatation und Inflammation beteiligt ist. Dabei handelt es sich um Prozesse der Modulation der kardiovaskulären Funktion die ursprünglich dem B2 zugeordnet wurden (Dendorfer, Wolfrum and Dominiak, 1999; McLean, Perretti and Ahluwalia, 2000).

Pesquero et al (Pesquero *et al.*, 2000) erzeugte das erste transgene B1 *Knockout* Modell (B1^{-/-}) der Maus, wobei das B1R Gen mit der kodierenden Region eines Neomycin Resistenzgens in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ersetzt wurde. Die transgenen B1^{-/-} Mäuse entwickelten sich wie der parentale Stamm. Im Vergleich zu B2^{-/-} Mäusen hatten B1^{-/-} Mäuse zwar einen normalen Blutdruck, waren aber hyperalgetisch durch die reduzierte Reizschwelle bei chemischer und thermischer Nozizeption. In dieser transgenen Mauslinie wurde zudem eine verminderte Leukozyten-Akkumulation in entzündetem Gewebe beobachtet, als Reaktion auf pro-inflammatorische Reize.

1.2.2.2 Bradykinin-B2-Rezeptor

Der B2 wurde in den meisten Gewebearten identifiziert und kommt vor allem auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Mesangialzellen, einigen Neuronen, Astrozyten und polynukleären Neutrophilen vor (Couture *et al.*, 2001), wobei die Expression des B2 konstitutiv ist. Das humane B2 kodierende Gen befindet sich wie das B1 kodierende Gen auf Chromosom 14 (152), etwa 12 kb aufwärts von BDKRB1 (153) und besteht aus 3 Exons. Die Homologie entsprechender B2-Gensequenzen zwischen Mensch und Maus

beträgt etwa 80% (Moreau *et al.*, 2005). Aus den codierenden Sequenzen der Exons 2 und 3 wird ein Protein mit 391 Aminosäuren synthetisiert (Hess *et al.*, 1994).

Die Expression des B2 wird nicht durch BK selbst geregelt (Khosravani *et al.*, 2015), sondern durch cAMP und Phorbol ester (Pesquero *et al.*, 1996). Weitere potentielle Bindungsstellen wurden im B2-Promotor identifiziert, z.B. für Östrogene, GATA-1, CCAAT displacement protein (CDP), E2F, EGR2, IL-6 aktivierende Proteine, NF- κ B und p53 (Baptista *et al.*, 2002). IL-1 β erhöht die Expression des B2 durch einen Prostanoid- und cAMP-abhängigen Signalweg (Schmidlin *et al.*, 1998).

Bradykinin und Kallidin sind die Agonisten des B2 von den B1-Agonisten Lys-des-Arg¹⁰-BK und des-Arg⁹-BK nicht aktiviert wird (Bhoola, Figueroa and Worthy, 1992; Goodfellow *et al.*, 1996; Faussner, Bathon and Proud, 1999). Die B2 haben verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Gewebearten, regeln die bronchiale Konstriktion, Reaktionen auf akute Entzündungen, Schmerz und Schmerzempfindlichkeit durch Aktivierung der sensorischen Nervenenden. Im kardiovaskulären System regulieren sie die lokale Durchblutung durch Vasokonstriktion oder Vasodilatation der Gefäße, und im Tiermodell wurde gezeigt dass endogenes Bradykinin zu kardioprotektiven Effekten nach ischämischer Vorbehandlung führt (Wall, Sheehy and Hartman, 1994). Außerdem sind B2 an einer antiarrhythmischen Wirkung im Herzen beteiligt (Vegh, Papp and Parratt, 1994). Bei der Aktivierung der zellulären Komponente von Entzündungsreaktion, wie die Leukozyten-Rekrutierung spielen B2 jedoch eine eher untergeordnete Rolle (McLean, Perretti and Ahluwalia, 2000) siehe auch Abschnitt 1.2.3.

Zur funktionellen Analyse des B2 wurde vor etwa 20 Jahren die erste B2 *Knockout* Maus (B2^{-/-}) generiert (Borkowski *et al.*, 1995). Diese Tiere waren hypertensiv und reagierten auf Angiotensin II mit einem verstärkten Blutdruckanstieg oder einem hohen Verzehr von Nahrungssalz und entwickelten Herzinsuffizienz im Laufe des Alters. Somit wurde erstmals der Beitrag eines dysfunktionalen B2 Signalwegs zur Pathogenese von Hypertonie und Herzinsuffizienz gezeigt. Die B2 *Knockout* (B2^{-/-}) Mäuse zeigten keine morphologischen Veränderungen und waren fruchtbar.

Internalisierung und Trafficking des B2

Die Aktivierung des B2 durch Ligandenbindung mit Bradykinin führt zu einer schnellen Internalisierung des Rezeptors durch Endozytose und Desensibilisierung des B2, wobei dies für B1 nicht beobachtet wurde (Austin *et al.*, 1997). Dieses unterschiedliche Verhalten der BK-Rezeptoren ist ein weiterer Hinweis für die Hypothese, dass B2 eher in der akuten Phase

der Inflammation und Schmerzreaktion von Bedeutung ist, während B1 eher im Zusammenhang mit chronischen Entzündungsprozessen stehen (Dray and Perkins, 1993).

In der Abbildung 1.2-4 ist die zelluläre und nukleäre Lokalisierung des B2 dargestellt.

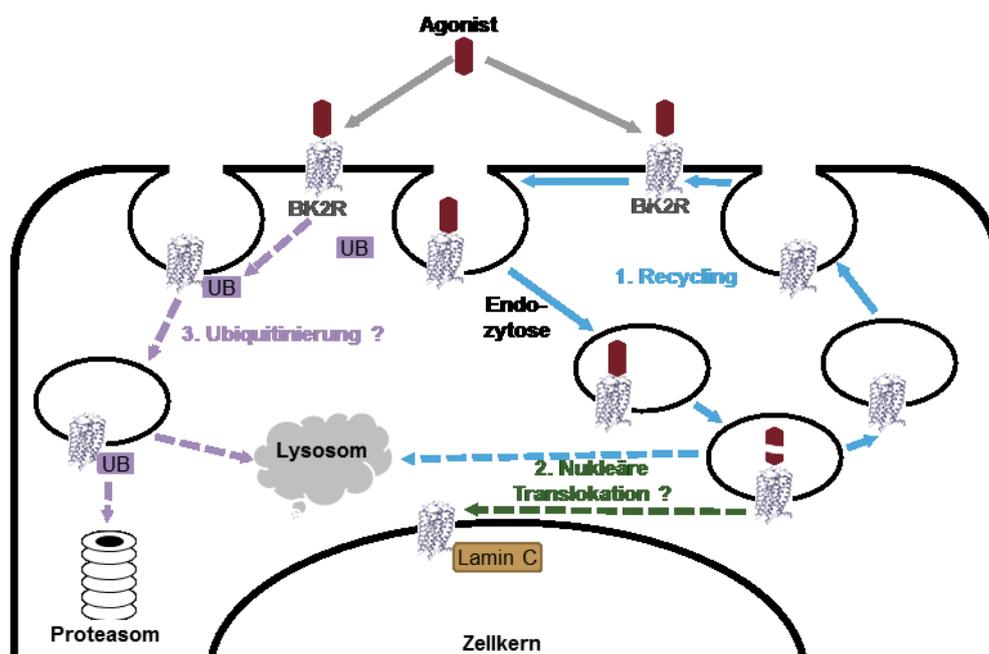


Abbildung 1.2-4 Schematische Darstellung der zellulären Translokation und nukleären Lokalisierung des B2. (1) Durch Agonisten induzierte Endozytose und Recycling des B2 zur Zelloberfläche. (2) Nach Endozytose kann B2 in den Zellkern gelangen. (3) B2 kann nach Ubiquitinierung zu Lysosomen und/oder Proteasomen geleitet werden (Quelle: (Takano and Matsuyama, 2014).

Die Internalisierung wird durch die Bindung des Agonisten eingeleitet. Dies ist auch bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Fall. Dabei kommt es zum endocytotischen Einschluss des Rezeptors in Caveolae, der möglicherweise durch einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird (Lamb, De Weerd and Leeb-Lundberg, 2001). Der Ubiquitin-vermittelte Abbau über Lysosom und/oder Proteasom sowie das intrazelluläre Recycling des B2 sind noch nicht endgültig geklärt. Der überwiegende Anteil der internalisierten B2 wird nach Stimulation durch den Agonisten aus den endosomalen Vesikeln wieder in die Zellmembran geführt. Die Eliminierung der B2 über Lysosomen ist noch nicht vollständig geklärt. Die vom Agonisten verursachte Internalisierung nicht der einzige Mechanismus welcher die Herunterregulierung des Rezeptors vermittelt. Selbst wenn der B2

dem Agonisten für mehrere Tage ausgesetzt ist, kommt es im physiologischen Zustand zu keiner wesentlichen Herunterregulierung des Rezeptors (Khosravani *et al.*, 2015), (Marceau *et al.*, 2002). Dies geschieht nur in manchen pathologischen Prozessen die mit chronisch-inflammatorischen Vorgängen einhergehen.

Der zytoplasmatische Bereich des B2 enthält ein Kernlokalisierungssignal (KRFRK) zur Migration in den Zellkern (Lee *et al.*, 2004). Mittels konfokaler Mikroskopie und Live Cell Imaging wurde jedoch in HEK 293T Zellen gezeigt, dass weder der Zusatz von Bradykinin noch das Vorhandensein des Kernlokalisierungssignals an der Translokation bzw. nukleären Lokalisierung von B2 beteiligt sind (Takano *et al.*, 2014).

Savard *et al.* (Savard *et al.*, 2008) zeigten, dass Bradykinin eine transitorische Mobilisierung von nukleoplasmatischem Ca^{2+} bewirkt, sowie eine Aktivierung/Phosphorylierung von Akt und H3 Acetylierung. Diese Autoren konnten auch zeigen, dass Bradykinin die iNOS-Expression in isolierten Leberzellen induzierte, was darauf schließen lässt, dass nukleär lokalisierter B2, nach BK-Bindung als transkriptioneller Regulator auf die Expression spezifischer Gene wirkt. Mittels des Two-Hybrid-Systems konnte gezeigt werden, dass der B2 von HEK293 Zellen mit Lamin C interagiert, einem von zahlreichen Laminen die im Zellkern eukaryotischer Zellen über membrangebundenen Proteine mit der inneren Kernmembran verankert sind. Dabei hatte weder der Zusatz von Bradykinin noch das Vorhandensein des Kernlokalisierungssignals einen Einfluss auf die nukleäre Lokalisierung bzw. Translokation von B2. Somit wurde vorgeschlagen, dass die Heterodimerisierung des B2 mit Lamin C eine wichtige Rolle spielt bei der zellulären Signalisierung und physiologischen Funktion (Takano and Matsuyama, 2014; Takano *et al.*, 2014):

1.2.2.3 Durch B1 und B2 vermittelte Signalwege

Um die vielfältigen physiologischen Funktionen der von BKR1 und BKR2 vermittelten Reaktionen zu erfassen, aus denen sich auch mögliche pharmakologische Strategien für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen ergeben könnten, ist es erforderlich die durch die beiden Rezeptoren vermittelten Signalwege näher zu betrachten (Abbildung 1.2-5).

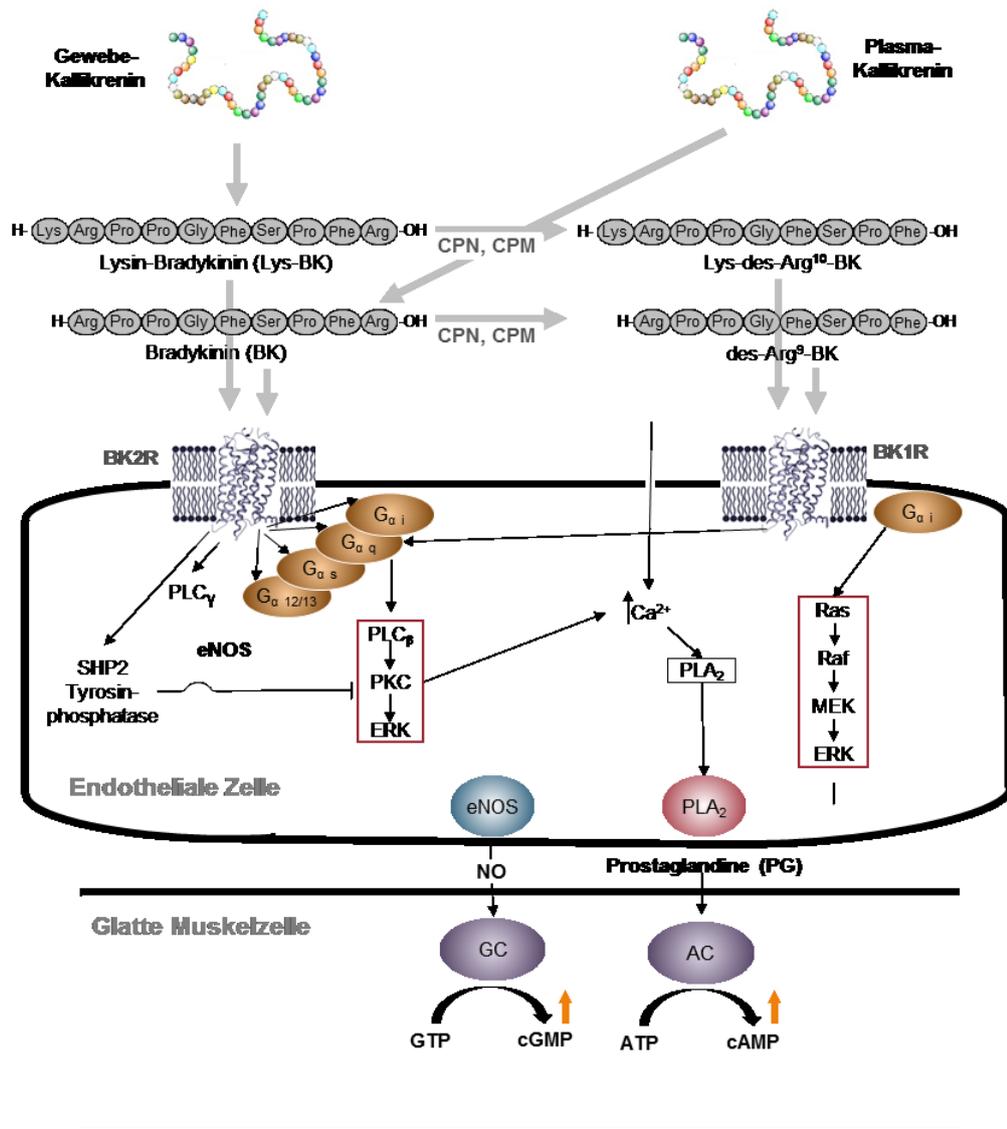


Abbildung 1.2-5 Durch B1 und B2 vermittelte Signalwege. B2 ist meist mit $G_{\alpha q}$ assoziiert, seltener mit $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha s}$ und $G_{\alpha 12/13}$. Die Signalisierung von $G_{\alpha q}$ führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC β), Proteinkinase C (PKC) und MAP Kinase. Zudem aktiviert B2 die eNOS und Phospholipase PLA₂, wobei NO und Prostaglandine (PG) im extrazellulären Raum freigesetzt werden, die wiederum Guanylatzyklase (GC) und Adenylatzyklase (AC) aktivieren, wodurch cAMP und cGMP synthetisiert wird. Die Aktivierung der eNOS ist komplex und erfordert die Dissoziation von eNOS von B2 und weitere Phosphorylierung durch PKC. Zudem interagiert B2 direkt mit der Tyrosin Phosphatase SHP2, wodurch die Aktivität der ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) moduliert wird. B1 interagiert auch mit $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha i}$ und aktiviert die gleichen Signalwege wie B2, wobei jedoch die jeweiligen Muster unterschiedlich sind. Der B2-induzierte Anstieg der Ca²⁺ - Konzentration mobilisiert vorwiegend Kalzium aus intrazellulären Pools, wobei der über B1-vermittelte Anstieg der Ca²⁺ - Konzentration vor allem durch extrazellulären Einstrom zustande kommt. Die durch B1 verursachte NO-Bildung ist abhängig von der Aktivierung der iNOS über der ERK-induzierten Phosphorylierung, was zur nachhaltigen NO-Synthese führt. Je nach Zellarten, zellulärer Umgebung und Wechselwirkungen zwischen den Signalwegen kommt es zu unterschiedlichen biologischen Reaktionen (Quelle: (Moreau *et al.*, 2005; Bas, Adams, *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2011; Couture, Blaes and Girolami, 2014).

Die Bindung von BK an den B2 aktiviert verschiedene G-Proteine ($G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha s}$ und $G_{\alpha 12/13}$) (Leeb-Lundberg, 2012) wodurch es zu einer Aktivierung der Phospholipase PLC- $\beta 1$ kommt, mit einem vorübergehenden Anstieg von Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol. Die erhöhte IP3-Konzentration führt zum Anstieg der Ca^{2+} - Konzentration im Cytosol, entweder über die Freisetzung aus internen Speichern oder durch verstärkten Einfluss (Adams *et al.*, 1989). Dadurch wird die Ca^{2+} abhängige endotheliale eNOS aktiviert. Dies betrifft auch weitere nachgeschaltete Effektorproteine z.B. PLA₂, PLC γ , PLD, verschiedene Isoformen von PKC (α , ϵ , ζ), GTPase RhoA, Hsp90, MAP Kinasen, P13 Kinase (Moreau *et al.*, 2005). Durch die Aktivierung von PLA₂ kommt es zur Freisetzung von Arachidonsäure und Prostaglandin-Synthese (Martin and Wysolmerski, 1987), woraus sich die Akkumulation von cAMP und Bildung von freien Radikalen ergibt (Emond *et al.*, 1990; Kakoki and Smithies, 2009; Kuhr, Lowry, *et al.*, 2010; Morand-Contant, Anand-Srivastava and Couture, 2010; Kayashima, Smithies and Kakoki, 2012).

Über den aktivierten B1 kommt es auch zur Initiierung verschiedener Signalwege, die über $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$, vermittelt sind. Dabei kommt es bei der Aktivierung von B1 zu länger andauernden Effekten im Vergleich zu B2, obwohl es sich in beiden Fällen um ähnliche Signalwege handelt. Diese Tatsache wird erklärt durch eine langsamere Desensibilisierung und Internalisierung von BKR1 im Vergleich zu BKR2 (s. auch 1.2.2.2), aber auch durch Unterschiede bei der Mobilisierung von Ca^{2+} oder der Rekrutierung von eNOS bzw. iNOS (Marceau, Hess and Bachvarov, 1998; Fathy *et al.*, 1999; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Die Aktivierung von B2 verursacht eine vorübergehende Freisetzung von NO (über eNOS), wobei es durch die Aktivierung von B1 zu einer hohen und länger andauernden NO-Bildung kommt, welche über iNOS vermittelt ist (Kuhr, Lowry, *et al.*, 2010). Durch die Interaktion zwischen der C-terminalen Domäne von B2 und eNOS kommt es zu einer Hemmung der Oxygenase-Domäne (Golser *et al.*, 2000). Bei der Bindung von BK an den B2 wird diese Interaktion aufgehoben und NO wird synthetisiert (Ju *et al.*, 1998). Bei der B2-abhängigen NO-Synthese in endothelialen Zellen ist die Ca^{2+} -Calmodulin Signalkette involviert, sowie die durch Phosphorylierung (Ser-1177) bedingte Aktivierung von eNOS (Venema, 2002). Demgegenüber kommt es bei der $G_{\alpha i}$ – vermittelten B1-Aktivierung zur Aktivierung des ERK/MAP Kinase Signalweges, unter Beteiligung von Beta-Arrestin-1 und Src (Kuhr, Lowry, *et al.*, 2010; Kuhr, Zhang, *et al.*, 2010; Brovkovich *et al.*, 2011).

Durch eNOS gebildetes NO verursacht Vasodilatation, agiert als antioxidativer und antiinflammatorischer Mediator durch Hemmung der endothelialen Leukozyten-Adhäsion, Thrombozyten-Aktivierung und Proliferation sowie Kontraktion von glatten Muskelzellen (Wink and Mitchell, 1998; Javanmard *et al.*, 2009). Bei B2^{-/-} Mäusen wurde eine verminderte renale

NO-Exkretion nachgewiesen, sowie eine Reduktion des kapillären glomerulären Lumens (Pradde *et al.*, 1995). Hohe NO-Konzentrationen in den Gefäßen können auch durch iNOS verursacht sein, als Reaktion auf ROS oder proinflammatorische Zytokine (Aktan, 2004; Wu, Tyml and Wilson, 2008). Bei hohen NO-Konzentrationen kommt es über die Reaktion mit dem Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) zur Bildung des hochreaktiven Peroxonitrits ($ONOO^-$), welches an der Entstehung von inflammatorischem und oxidativem Stress maßgeblich beteiligt ist (Radi, Kehrl and Ackermann; Kuhlencordt *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse neuerer Studien haben auch gezeigt, dass G-Protein-vermittelte Signalwege über Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden (Ritter and Hall, 2009) und dies könnte auch eine Folge der BK-Bindung an den B2 sein. So wurde von Duchene *et al.* (Duchene *et al.*, 2002) gezeigt, dass es durch BK-Bindung an B2 über die Interaktion einer spezifischen Domäne des B2 mit der Tyrosin Phosphatase SHP2 zu einer Aktivierung von SHP2 kommt. Gleichermäßen kommt es zur IP3-Bildung in endothelialen Zellen durch die Interaktion der C-terminalen intrazellulären Domäne des B2 mit PLC γ 1 (Abbildung 1.2-5) (Venema *et al.*, 1998).

1.2.2.4 Genetische Polymorphismen von B1 und B2

Für die B1 und B2 kodierenden Gene in den chromosomalen Regionen 14q32 (Chai *et al.*, 1996) und 14q32.1-14q32.2 (Ma *et al.*, 1994) wurden bisher verschiedene genetische Polymorphismen beschrieben. Dabei betreffen die klinisch relevanten Polymorphismen kardiovaskuläre Phänotypen und sind somit auch wichtig für das Verständnis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen veränderter Rezeptoren, abweichenden Signalwegen und pathophysiologischem Geschehen. In Tabelle 1.2-1 sind die bisher bekannten genetischen Polymorphismen zusammenfassend dargestellt.

Bei beiden Rezeptoren wurden Polymorphismen beschrieben, die als prädiktive Marker eine genetische Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit anzeigen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sich durch diese Marker auch eine Reaktion auf die Behandlung mit ACE-H vorhersehen lassen könnte. Demnach weisen die Polymorphismen beider Gene auf die Beteiligung von B1 und B2 am essentiellen Bluthochdruck, an der diabetischen Nephropathie und (im Falle von B2) am ACE-Hemmer induzierten Husten hin.

Die intrinsischen Mechanismen der ACE-H sind mit einer Akkumulation von Kininen verbunden, oftmals unter der unerwünschten Nebenwirkung eines persistierenden, trockenen, unproduktiven Hustens. Die Annahme eines primären und genetisch bedingten Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von ACE-H-bedingtem Husten und

Polymorphismen des B2 scheint daher begründet. So unternahmen Nishio et al. (2011) eine Meta-Analyse von 11 Studien bezüglich ACE-H-induziertem Husten, bei denen auch detaillierte Informationen über ACE I/D (Insertion/Deletion) und B2 Polymorphismen vorlagen. Insgesamt wurden 6 Studien bezüglich der ACE I/D Polymorphismen untersucht (398 Kaukasier, 723 Ostasiaten), und 3 Studien bezüglich der B2 Polymorphismen (300 Ostasiaten). Dabei wurde eine signifikante Assoziation zwischen ACE I/D und durch ACE-H verursachtem Husten in einer Ostasiatischen Population festgestellt [random effects (RE) OR = 1.49 (1.11-2.02), P= 0.009], nicht jedoch unter Kaukasiern [RE OR = 0.90 (0.60-1.35)]. Genauso war auch die Allelfrequenz des B2 signifikant unterschiedlich [OR = 2.25 (1.42-3.57)], sowie auch die Verteilung der T/C Genotypen ($\chi^2 = 8.366$, P= 0.015). Die Meta-Analyse zeigte, dass bei Ostasiaten ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen dem B2 und durch ACE-H herbeigeführtem Husten [RE OR = 2.29 (1.42-3.69), P= 0.001] (Nishio *et al.*, 2011).

Tabelle 1.2-1 Charakterisierung der genetischen Polymorphismen der B1 und B2.

Rezeptor	Lokalisation und Beschreibung	Pathophysiologie bzw. Krankheitsbild	Referenz
B1	-699 G/C Singulärer Nukleotid-Polymorphismus in der Promotor-Region	-699C-Allel: wesentlich seltener vorhanden bei Patienten mit Nierenversagen im Endstadium. Dieses Ergebnis wurde jedoch nicht bestätigt in größeren Patienten-Kohorten. -699G-Allel: höheres Risiko durch koronaren Bluthochdruck bei Männern im mittleren Alter	(Bachvarov <i>et al.</i> , 1998; Zychma <i>et al.</i> , 1999; Knigge <i>et al.</i> , 2000; Dhamrait <i>et al.</i> , 2003)
	Exon 1: BE1 +9/-9 An- (+9) oder Abwesenheit (-9) einer 9 bp langen wiederholten Sequenz in der nichtkodierenden Region	BE1 +9/+9 Phänotyp: Erhöhte BK-vermittelte Vasodilatation im menschlichen Unterarm während ACE-Hemmung BE1 -9 Phänotyp: Erhöhtes Bluthochdruck-Risiko in einer brasilianischen Population durch erhöhten diastolischen Druck; BE1 +9/-9 Phänotyp: erhöhtes urinäres Albumin und Kreatinin bei Diabetikern BE1 +9 Phänotyp: Niedrige Werte für urinäres Albumin und Kreatinin bei Diabetikern	(Braun <i>et al.</i> , 1996; Houle <i>et al.</i> , 2000; Maltais <i>et al.</i> , 2002; Van Guilder <i>et al.</i> , 2008; Freitas <i>et al.</i> , 2009)
B2	58 T/C Singulärer Nukleotid Polymorphismus	58T-Allel: Protektiver Effekt vor Bluthochdruck in asiatischen und Afro-amerikanischen Populationen; erhöhtes Risiko bei Kaukasiern. 58T-Allel: Erhöhtes Risiko für durch ACE-H verursachten Husten, verbunden mit einer höheren B2-Transkriptionsrate; 58C-Allel: erhöhtes Risiko für essentiellen Bluthochdruck bei Asiaten	(Gainer <i>et al.</i> , 2000; Mukae <i>et al.</i> , 2000, 2002; Niu <i>et al.</i> , 2010; Nishio <i>et al.</i> , 2011; Bhupatiraju <i>et al.</i> , 2012)
	Kombination der BE1 +9/-9 und 58 T/C Polymorphismen	Beide genetische Marker agieren synergistisch, ein erhöhtes Risiko für essentiellen Bluthochdruck wurde nachgewiesen	(Bhupatiraju <i>et al.</i> , 2012)

1.2.3 **PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON BRADYKININ UND BRADYKININ-REZEPTOREN**

Für das Verständnis der physiologischen Rolle von Kininen waren zunächst die Erkenntnisse wichtig, die in den 80er Jahren mit der Entwicklung von selektiven Antagonisten für beide Rezeptoren festgestellt wurden (Regoli and Barabé, 1980; Sharma, 2014). Weitere Erkenntnisse erbrachten Forschungsarbeiten der darauffolgenden Jahre mit den transgenen Mäuselinien C1-INH^{-/-} (Han *et al.*, 2002) und B2^{-/-} (Madeddu *et al.*, 1999).

Im Laufe der nachfolgenden Jahre wurden in zahllosen Studien die vielfältigen Wirkungen von Bradykinin und den beiden Rezeptoren nachgewiesen. Dies betrifft die Regulation des Blutdrucks in peripheren und koronaren Blutgefäßen, die Regulation von Salz- und Wasserhaushalt sowie Insulinfreisetzung, kardioprotektive, anti-fibrotische, apoptotische und antiproliferative Wirkungen, oxidative oder antioxidative Effekte. Bradykinin ist auch an Entzündungsprozessen beteiligt, durch die Aktivierung endothelialer Zellen, wobei es zusätzlich zur Vasodilatation zu einer erhöhten vaskulären Durchlässigkeit kommt, was mit den klassischen Entzündungssymptomen wie Rötung, Wärme, Schwellung und Schmerzen einhergeht. Insbesondere trägt Bradykinin zur Gewebe-Überempfindlichkeit bei, z.B. allergischem Schnupfen oder Asthma. Zum Bradykinin-abhängigen Angioödem kommt es infolge eines angeborenen oder erworbenen C1-INH-Mangel oder durch die Verwendung von ACE-H zur Behandlung von Hypertonie oder Herzinsuffizienz (Moreau *et al.*, 2005; Bas, Adams, *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2011; Sharma, 2012; Couture, Blaes and Girolami, 2014; da Costa *et al.*, 2014).

1.2.3.1 Vasodilatatorische und vasokonstriktorische Wirkung

Seit der Entdeckung von Bradykinin, beschrieben zahlreiche Autoren seine potenten vasodilatatorischen Eigenschaften, wobei der genaue Wirkungsmechanismus und die jeweiligen endothelialen Mediatoren noch nicht bekannt waren. In den vergangenen Jahren wurden die molekularen Zusammenhänge und Mediatoren beschrieben, die sich durch die Aktivierung der B1 und B2 über Bradykinin ergeben, sowie deren nachgeschalteten Signalwege (Gryglewski *et al.*, 2002; Hammond *et al.*, 2011; Leffler, Parfenova and Jaggar, 2011; Giles *et al.*, 2012). Zusätzliche Beweise ergaben sich aus Versuchen mit B1 Agonisten, oder bei konstitutiver Expression von B1, wobei in verschiedenen Tierarten stets eine Abnahme des Blutdrucks festgestellt wurde. Dies wurde in unterschiedlichen Gefäßarten im Tiermodell, aber auch in Menschen nachgewiesen (Regoli, Plante and Gobeil, 2012).

Kinine üben jedoch auch starke vasokonstriktorische Effekte aus. Bradykinin verursacht die Kontraktion von Gefäßen nach Verletzungen und fördert die Freisetzung endothelialer Vasokonstriktoren (Briner, Tsai and Schrier, 1993; Vanhoutte *et al.*, 2009). Die Halsvene des Kaninchens und die menschliche Nabelschnurvene reagieren auf Bradykinin mit Vasokonstriktion (Marceau *et al.*, 1994). *In vitro* wurde eine B1-induzierte Kontraktion der Ratten-Pfortader nachgewiesen, wobei die Kontraktion durch die Bindung von Thromboxan A2 an deren Rezeptoren in den endothelialen glatten Muskelzellen zustande kam (Basei *et al.*, 2012).

Die menschliche Nabelschnurvene wird oftmals in Kontraktilitätsversuchen eingesetzt, zur Beschreibung von vaskulären Mechanismen und der Evaluation potenziell vasoaktiver Substanzen (Marceau *et al.*, 2010).

1.2.3.2 Antioxidative Wirkung

Es gibt verschiedene Hinweise bezüglich einer Kopplung des KKS Systems mit oxidativem Stress. Die protektiven Wirkungen des KKS vor oxidativem Stress und Organschäden in Herz und Nieren werden, gemäß den Schlussfolgerungen in der Übersichtsarbeit von Kayashima *et al.* (Kayashima, Smithies and Kakoki, 2012), mit erhöhten NO-Konzentrationen in Verbindung gebracht. Dabei wurde auch gezeigt, dass die Infusion mit Kininen einen protektiven Effekt hat vor Salz-induzierten renalen Schäden durch Hemmung des oxidativen Stresses (reduzierte Aktivität der NADPH Oxidase und Superoxid-Synthese). Dadurch konnte eine Hemmung entzündlicher und apoptotischer Prozesse festgestellt werden (Chao *et al.*, 2007).

Bei der intramyokardialen Injektion mit Kallikrein wurde eine Reduktion eines experimentellen myokardialen Infarktes reduziert. Nach 24 Stunden wurde eine erhöhte NO-Konzentration gemessen und die Apoptose von Kardiomyozyten wurde gehemmt. Bei einer 7-tägigen Infusion mit Kallikrein kam es zu einer Reduktion der Infiltration von Monozyten und Makrophagen in das geschädigte Gewebe und einer Verbesserung der Herzleistung. Gleichzeitig stellten die Autoren auch eine Reduktion der Expression und Aktivität der NADH Oxidase fest, was mit einer geringeren Superoxid-Bildung einherging. Signalwege die an oxidativen Prozessen beteiligt sind (z.B. MAPK) wurden auch herunterreguliert. Diese Effekte wurden nicht festgestellt wenn der B2 durch die gleichzeitige Verabreichung von Icatibant blockiert wurde (Yao *et al.*, 2007).

1.2.3.3 Inflammatorische und anti-inflammatorische Wirkung

Eine zunehmende Anzahl überzeugender Beweise belegen die zentrale Rolle des KKS bei entzündlichen Prozessen. Somit ist die Frage nach den involvierten Mechanismen sehr relevant, gerade in Bezug auf den rasanten Anstieg von chronischen Erkrankungen in den vergangenen Jahrzehnten, denen meist entzündliche Prozesse zugrunde liegen.

Bradykinin hat eine starke proinflammatorische Wirkung, die über beide Rezeptoren vermittelt wird. Es wird davon ausgegangen, dass B2 für den Beginn einer entzündlichen Reaktion wichtig ist, während B1 eher bei der Aufrechterhaltung eines chronisch inflammatorischen Zustands von Bedeutung ist (Couture *et al.*, 2001).

Die Expression von B1 wird durch verschiedene proinflammatorische Zytokine (z. B. IL-1 β , TNF α und Interferon γ stimuliert (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005) Diese Mediatoren aktivieren und regulieren unterschiedliche Signalwege, wobei aber stets auch der Signalweg des Transkriptionsfaktors NF- κ B aktiviert wird. Die Aktivierung von NF- κ B ist ein charakteristisches Kennzeichen aller entzündlichen Prozesse. In praktisch allen Zelltypen und Geweben kommt NF- κ B vor, wo er regulierend auf die Genexpression zahlreicher inflammatorischer Mediatoren wirkt, und somit eine wichtige Funktion hat bei der Steuerung der Immunantwort, der Zellproliferation und des Zelltodes (Ghosh and Hayden, 2008). Somit ist NF- κ B der wichtigste Transkriptionsfaktor welcher B1 bei inflammatorischen Prozessen hochreguliert. Schanstra *et al.* (Schanstra *et al.*, 1998) zeigten in menschlichen Lungen-Fibroblasten, dass eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung mit einer Blockade der IL-1 β -vermittelten B1-Aktivierung einherging. Diese Gruppe konnte auch zeigen, dass die B1-Aktivierung an sich auf die NF κ B Aktivierung stimulierend wirkte, was schließlich zu einer erhöhten Synthese von IL-1 β oder TNF α führte. Somit bestehen komplexe Wechselwirkungen zwischen B1 und proinflammatorischen Zytokinen bei der Entstehung bzw. der Verschlechterung entzündlicher Reaktionen. An den Orten einer Entzündung sind Kininogene, Kallikrein und Kininase hochreguliert und die lokale Synthese von B1 Agonisten z.B. des-Arg⁹-BK stellt einen weiteren entzündlichen Stimulus dar (Bhoola, Figueroa and Worthy, 1992; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Damit wird vermutet, dass nach einer ersten inflammatorisch bedingten B1-Induktion, es zur Etablierung eines Kreislaufs mit stets positiven und verstärkenden Signalen kommt, wodurch die chronisch entzündlichen Vorgänge erklärt werden könnten. Heute gilt es als weitgehend anerkannt, dass der mitunter wichtigste Effekt des B1 in seiner Rolle bei der Rekrutierung entzündlicher Zellen liegt (Duchene and Ahluwalia, 2009).

Eine schädigende Wirkung des B1 wurde auch bei der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung nachgewiesen indem er zur neuroinflammatorischen Wirkung der β -Amyloid-Ablagerungen beiträgt. Versuchstiere einer transgenen Mauslinie der Alzheimer Erkrankung,

die eine Form des menschlichen beta-Amyloid-Vorläuferproteins überexprimiert, wurden mit einem selektiven B1-Antagonisten behandelt, welcher die Blut-Hirn-Schranke überwindet (SSR240612). In den unbehandelten Tieren wurde eine höhere hippocampale Konzentration des B1 festgestellt und die Behandlung mit SSR240612 führte zu verbesserter Gedächtnisleistung und räumlicher Orientierung, sowie auch zu einer Abnahme der löslichen A β Plaques (Lacoste *et al.*, 2013).

Die Aktivierung von B2 geht mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität und Rekrutierung von Neutrophilen einher, was zur Ödembildung führt und zur Freisetzung von IL-1 β , und TNF α , sowie der Rekrutierung entzündlicher Zellen bei Gichtanfällen (Shaw and Harper, 2011). Trotz der bekannten pro-inflammatorischen Effekte beider Rezeptoren, wurde für B2 auch ein anti-inflammatorischer Effekt beschrieben. Bei der Studie von Yao (2007), die im vorhergehenden Abschnitt vorgestellt wurde, kam es durch die intramyokardiale Injektion von Kallikrein auch zu einer verringerten Aktivierung von NF- κ B und einer reduzierten Expression von MCP-1 und VCAM-1 sowie anderen entzündlichen Markern. CCL2 wird an Orten der Entzündung von Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritische Zellen gebildet, während das VCAM-1-Protein die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen an das Gefäßendothel vermittelt. VCAM-1 ist auch an der Leukozyten-Endothelzellen-Signaltransduktion beteiligt und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung von Arteriosklerose und rheumatoider Arthritis (Put *et al.*, 2014). Bradykinin vermittelt auch anti-inflammatorische und neuroprotektive Effekte im Gehirn, über multiple Wirkungen auf Gliazellen. Die durch Lipopolysaccharide verursachte Freisetzung von IL-1 β und TNF α aus diesen Zellen wurde durch Bradykinin reduziert, was auch mit einem Anstieg an cAMP verbunden war (Noda *et al.*, 2007). Von Monteiro et al (Monteiro *et al.*, 2007) wurde gezeigt, dass die Aktivierung von B2 eine durch Trypanosomen verursachte Entzündung reduzierte, beruhend auf dem Vergleich von Ergebnissen von zwei transgenen Mauslinien (C57BL/6 B2^{-/-} und C57BL/6 B2^{+/+}).

Somit scheint B2 sowohl für eine frühe inflammatorische aber auch eine anti-inflammatorische Reaktionskaskade wichtig zu sein. Dagegen trägt B1 zu einer verlängerten und chronifizierten inflammatorischen Reaktion bei.

1.2.3.4 Weitere Wirkungen

Die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen ist ein typisches Kennzeichen des arteriosklerotischen Prozesses nach endothelialer Verletzung. Bradykinin vermittelt die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs. Daran ist der B2 beteiligt, denn dieser Effekt von Bradykinin wurde durch den B2-Antagonisten HOE-140 aufgehoben, nicht jedoch durch den B1-Antagonisten des-Arg⁹-Leu⁸-BK (Velarde *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2005). Kinine haben nicht nur einen proliferativen Einfluss auf endotheliale Zellen, sondern sind auch an der Neovaskularisation nach einer akuten Ischämie beteiligt. Dies geschieht an den Orten arterieller Schäden durch die Rekrutierung und Aktivierung von B2 exprimierenden mononukleären Zellen mit regenerativen Eigenschaften (CD34, CXCR4). Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheiten (KHK) wurde eine Herunterregulierung dieser Gruppe von mononukleären Zellen beobachtet, was zu einer gestörten Wiederherstellung der Bradykinin-vermittelten endothelialen Reparatur führt, und als neuer Mechanismus für endotheliale Schäden bei Patienten mit KHK beschrieben wurde (Kränkel *et al.*, 2008, 2013).

Neuere Studien erbrachten auch Hinweise auf die Beteiligung von Bradykinin an der Hemmung der Apoptose endothelialer Zellen. Die Expression und Aktivität des B2 in der mikrovaskulären endothelialen Zelllinie pCMVEC trug zum Schutz der Zellen vor nekrotischen und apoptotischen Schäden bei, die durch H₂O₂ und LPS induziert wurden. Diese Effekte wurden durch die Behandlung mit dem B2 Antagonisten HOE 140 aufgehoben. Durch die Behandlung mit Bradykinin kam es gleichzeitig zu einer erhöhten Expression von COX-2, des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und der Superoxid-Dismutase (SOD). In *ex vivo* Versuchen mit Rattengehirnen wurde zudem nachgewiesen, dass BK zu etwa 40% die durch H₂O₂ verursachte mikrovaskuläre Degeneration verhinderte (Bovenzi *et al.*, 2010). Bradykinin verhinderte auch die Seneszenz und DNA-Schäden, die durch Behandlung von bovinen Aortenendothelzellen mit H₂O₂ verursacht wurden. Durch die Verwendung des B2-Antagonisten HOE-140 und des NO-Inhibitors N(omega)-methyl-L-Arginin Acetat wurde der protektive Effekt von Bradykinin aufgehoben (Oeseburg *et al.*, 2009).

Die Vorbehandlung von Hasenherzen durch Perfusion mit Bradykinin (10⁻⁸ M BK, 20 min., 37°C) schützte auch Kardiomyozyten bei einer nachfolgenden Kardioplegie. Bei den so konditionierten Herzen wurde eine 3-fach verringerte Apoptoserate von Kardiomyozyten festgestellt, was mit einer verbesserten linksventrikulären Leistung einherging (Feng *et al.*, 2005). Bei ähnlichen Versuchen wurde gezeigt dass BK Antagonisten und NOS Inhibitoren die inflammatorische und apoptotische Reaktion von Kardiomyozyten verstärkten, wobei dieser Effekt durch einen exogenen NO-Donor aufgehoben werden konnte (Yeh *et al.*, 2010). Der protektive Effekt von B2 bei kardialer Apoptose wurde auch eindrücklich belegt in der Studie von Marketou *et al.* (Marketou *et al.*, 2010), wo es bei gleichzeitiger Gabe des BK-

Agonisten NG291 während der Induktion eines akuten myokardialen Infarktes zu wesentlich verbesserten kardioprotektiven Effekten kam (Herzfunktion, Gewebeumbau und Expression von Entzündungsproteinen) (Marketou *et al.*, 2010).

Weniger eindeutige Ergebnisse wurden in verschiedenen Studien berichtet bezüglich apoptotischer Vorgänge im Nierengewebe. So zeigte Chiang *et al.* (Chiang *et al.*, 2007) dass Bradykinin die ROS-Synthese steigert und auch mitochondrielle Schäden auslöst, sowie renalen tubulären Zelltod durch ATP-Erschöpfung, der über einen PLC-abhängigen Mechanismus vermittelt ist. Die gleichen Autoren zeigten auch, dass eine Kallikrein-Vorbehandlung bei Ratten, die 5 Tage vor einer akuten Ischämie/Reperfusion der Nierenarterie stattfand, im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kontrollen zu einer stark verschlechterten renalen Funktion führte. Durch die Vorbehandlung kam es zu einer verstärkten tubulären Nekrose, höherer TNF- α Konzentration und vermehrtem oxidativen Stress, verbunden mit apoptotischen und entzündlichen Vorgängen. Diese Effekte ließen sich invertieren durch gleichzeitige Vorbehandlung mit einem B2 Antagonisten, nicht jedoch mit einem B1 Antagonisten (Chiang *et al.*, 2006).

Im Gegensatz zu diesen Forschungsergebnissen wurde durch eine 3-wöchige Bradykinin-Infusion bei salz-sensitive Dahl-Ratten, die 2 Wochen lang vor der Infusion eine salzreiche Ernährung erhielten, eine Verbesserung der renalen Funktion festgestellt, sowie der entsprechenden Laborwerte. Dabei kam es zu keiner Veränderung des Blutdrucks. Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden glomerulären Schäden verbessert, es kam zu einer geringeren Apoptoserate und reduzierten Entzündungsparametern (Chao *et al.*, 2007). Bei der diabetischen Nephropathie wurde ein protektiver Effekt des KKS auf die Apoptose von Podozyten festgestellt (Kwak *et al.*, 2011). Der Einfluss des KKS auf ischämische Schäden der Niere wurde auch mit KO-Mäusen untersucht (B2^{-/-} und B1^{-/-}/B2^{-/-}). Nach 30-minütiger beidseitiger renaler Okklusion mit anschließender Reperfusion (24 h) ergab sich eine erhöhte Anzahl von apoptotischer Zellen (TUNEL-positiv) in der Niere von KO-Mäusen im Vergleich mit den Kontrollen. Die Untersuchung weiterer zellulärer Parameter bestätigte dass beide BK Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen bei der Verringerung von apoptotischen DNA-Schäden sowie morphologischen und funktionalen Nierenschäden infolge von Verletzungen die durch Ischämie und anschließende Reperfusion bedingt sind (Kakoki *et al.*, 2007).

1.2.4 DIE BEDEUTUNG VON BRADYKININ UND BRADYKININ-REZEPTOREN IN PHYSIOLOGISCHEN PROZESSEN

Eine drastisch erhöhte trans- und parazelluläre Gefäßpermeabilität (s. 0) ist charakteristisch für zahlreiche pathophysiologische Veränderungen, einschließlich Sepsis, Entzündung oder Trauma. Dazu zählen auch zahlreiche Erkrankungen bei denen es zu chronisch-inflammatorischen Veränderungen kommt, die sich auf einer systemischen Ebene auswirken, z.B. Diabetes, Arteriosklerose oder maligne Tumore mit Metastasen. Dabei handelt es sich um ein sehr komplexes biologisches Geschehen, bei denen der Bradykinin-vermittelte Durchtritt von Proteine und Flüssigkeiten durch das vaskuläre Endothel über transendotheliale Vesikel oder über interendothelialen Verbindungen als der wesentliche Mechanismus betrachtet wird, der diesen Veränderungen zugrunde liegt (Maurer *et al.*, 2011).

Eine kaum zu ermessende Anzahl von Studiendaten belegen die Effekte von Kininen im Herz-Kreislaufsystem und im renalen System und deren protektiven Wirkungen bei drohenden Organschäden die z.B. im Zusammenhang stehen mit Diabetes oder ischämischen Erkrankungen. Die Wirkung der Kinine ist jedoch auch belegt durch die weit verbreitete Anwendung der Wirkstoffgruppe der ACE-Hemmer, welche den raschen Bradykininabbau hemmen (siehe 1.2.4.2).

1.2.4.1 *Vaskuläre Pathologien*

Seitdem erstmals 1976 von Margolius *et al* gezeigt wurde, dass es bei hypertensiven Patienten zu einer verminderten Ausscheidung von Kallikrein im Urin kommt (Margolius *et al.*, 1976), zeigte eine Vielzahl weiterer Untersuchungen die Bedeutung des KKS bei der Pathogenese des Bluthochdruckes auf. Zunächst wurde in B2 KO-Mäusen beobachtet, dass der Blutdruck sich bei einer hohen Salzaufnahme erhöhte, während er unter physiologischen Bedingungen stabil blieb (Alfie *et al.*, 1996, 1997). Weitere Versuche von Brochu *et al* (Brochu *et al.*, 2002) erbrachten dann den Beweis, dass Endothelin 1 und Angiotensin II als hoch wirksame vasokonstriktorische Hormone die Blutdrucksteigerung verursachten, wobei es bei den B2-KO Mäusen zu keinem kompensatorischen Effekt kam. Eine Erhöhung der Blutdruckwerte wurde aber auch beobachtet bei Langzeitexperimenten mit der gleichen Mäuselinie, bei Verabreichung einer Kost mit normalem Salzgehalt (Emanueli *et al.*, 1999). Bei der Deletion beider BK-Rezeptoren kam es zu großen Einschränkungen der endothelialen Relaxation und einer reduzierten NO-Verfügbarkeit, was ein Hinweis war für die Beteiligung beider Rezeptoren an dem Stoffwechsel und der vaskulären Funktion von NO (Loiola *et al.*, 2011).

Bei arteriosklerotischen Veränderungen wurde eine Hochregulation von B1 nachgewiesen, durch eine intensive Immunzytochemische Markierung von B1 in endothelialen Zellen, Schaumzellen (Makrophagen), Entzündungszellen und Fibroblasten in der verdickten Intima arteriosklerotischer Plaques, sowie auch in den endothelialen glatten Muskelzellen der tiefer liegenden Tunica media. B2 wurde durch diese Methode auch in den gleichen Zellen nachgewiesen, jedoch mit einer geringeren Intensität (Raidoo *et al.*, 1997). Bei B1- und Apolipoprotein-E KO Mäusen wurde eine Prädisposition zur Arteriosklerose berichtet, wobei es durch die Abwesenheit des B1 auch zu einer Verschlechterung von Aortenaneurismen kam unter hypercholesterolämischen Bedingungen (Merino *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse verdeutlichen die protektive Wirkung des B1 und der nachgeschalteten Signalkette vor vaskulären arteriosklerotischen Veränderungen.

1.2.4.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen weltweit an erster Stelle der Haupttodesursachen. Wie bereits mehrfach erwähnt, wird das KKS mit Herzfunktionsstörungen in Verbindung gebracht. Zahlreiche experimentelle und klinische Forschungsdaten der vergangenen Jahre haben gezeigt dass Diabetes, Bluthochdruck, Herzinsuffizienz, Ischämie, Herzinfarkt und linksventrikuläre Hypertrophie mit einer lokal verringerten Aktivität des KKS einhergeht. Bei kardiovaskulären Erkrankungen sind aber auch die vom KKS verursachten pleiotropen Effekte von Bedeutung, die in der Hemmung von Apoptose, Entzündung und Hypertrophie bestehen, bei gleichzeitiger Förderung der Angiogenese und Neurogenese in Herz, Nieren, Gehirn und Blutgefäßen. Bei lokaler sowie systemischer Verabreichung von BK kommt es zu einem erhöhten koronaren Blutfluss und einer Verbesserung des Herzmuskelstoffwechsels (Sharma, 2012).

Das physiologische Gleichgewicht der Flüssigkeits-Homöostase und der Regulation des Kreislaufs wird durch eine fein abgestimmte Steuerung zwischen dem KKS und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) gewährleistet (Schölkens, 1996). Im Herz-Kreislauf-System vermittelt BK eine Vasodilatation und Plasma-Extravasation was zu entzündlichen Reaktionen führt (Moreau *et al.*, 2005). Die Gefäßerweiterung wird im gesunden Zustand vom BK₂-Rezeptor vermittelt; unter entzündlichen Bedingungen kommt es zur jedoch Hochregulierung des B1, welcher auch die Kinin-induzierte Vasodilatation und Hypotonie vermittelt. Wie bereits in Abbildung 1.2-5 dargestellt, kommt es durch die Stimulation des B2 über die eNOS zur NO-Bildung, welches vom Endothel in die glatten Muskelzellen diffundiert und die Guanylatzyklase aktiviert. Die Biosynthese von Prostaglandinen durch PLA₂ wird auch stimuliert, was zur Bildung von cAMP in glatten Muskelzellen führt. Diese physiologischen

Wirkungen von Kininen sind nicht nur für die Behandlung von Hypertonie und ischämischen Erkrankungen wichtig, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion (Moreau *et al.*, 2005). Die Aktivierung der B2 mit NO-Bildung trägt bei zum Schutz vor oxidativen Schäden im Herz-Kreislauf-System und bei Ischämie-bedingten Herzerkrankungen (Chao *et al.*, 2006).

Die Rolle des KKS bei Bluthochdruck wurde erkannt durch Beobachtungen einer signifikant verringerten Ausscheidung von Kallikrein über den Urin bei hypertensiven Patienten und wird mit einer fehlerhaften Kinin-Bildung erklärt (Chao *et al.*, 2006). Die pharmakologischen Wirkungen von BK bei der systemischen Kontrolle des Blutdrucks setzt sich zusammen aus der vasodilatatorischen Wirkung, in Kombination mit der Reduktion des peripheren Gefäßwiderstandes und Regulation der Ausscheidung von Na⁺ (Sharma, 2012). Über die Bindung von Kininen an endotheliale B2 und der damit verbundenen Freisetzung von NO und Prostaglandinen kommt es zu einer vasodilatatorischen, anti- ischämischen und anti-proliferativen Wirkung, wobei myokardiale Reserven an energiereichen Phosphaten und Glykogen erhalten bleiben (Schölkens, 1996). Angesichts gegenläufiger vasokonstriktorischer Wirkung von Angiotensin II tragen Kinine auch zur Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase bei, und werden kontinuierlich während einer Ischämie oder Hypoxie am Herzen freigesetzt. BK konnte auch der Verschlechterung der linksventrikulären Hypertrophie bei hypertensiven Ratten entgegenwirken, wobei die kardioprotektive Wirkung durch B2-Rezeptor-Antagonisten und NOS-Inhibitoren blockiert wurde. Ein Mangel an Komponenten des KKS am Herzen kann daher myokardiale Dysfunktion bewirken, die mit hohem Bluthochdruck und linksventrikulärer Hypertrophie einhergehen (Sharma, 2012).

1.2.4.3 Nierenerkrankungen

Eine eingeschränkte renale Ausscheidung von Kallikrein wurde bei Patienten mit Nierenerkrankungen festgestellt, wobei die reduzierte Ausscheidung mit der Schwere der Erkrankung einherging (Price, 1982; Naicker *et al.*, 1999). Langzeit-Infusionen einer sehr geringen Dosis Rattenharn-Kallikrein reduzierte funktionell und morphologisch das Fortschreiten der Nierenschädigung in Dahl-Ratten, die anfällig sind gegen eine salzinduzierte Hypertonie und mit einer salzreichen Kost gefüttert wurden. Der renale Schutz wurde durch die Stimulation von B2 vermittelt, denn durch die Gabe von Icatibant wurde dieser Effekt wieder aufgehoben (Hirawa *et al.*, 1999). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Übertragung des Kallikrein-Gens mittels Adenoviren zu einer verbesserten renalen Funktion bei der gleichen Rattenlinie führte, sowie auch bei der Rattenlinie 2K1C (mit renaler arterieller Okklusion) oder bei niereninsuffizienten Versuchstieren mit 5/6 Nephrektomie (Chao *et al.*, 1998; Yayama *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 2000). Kallikrein machte auch die Salz-induzierte renale

Fibrose und glomeruläre Hypertrophie rückgängig und reduzierte die Akkumulation von Entzündungszellen im Interstitium und den Gefäßen von Dahl-Ratten (Zhang, Chao and Chao, 1999). Diese renalen protektiven Effekte wurden auch beobachtet bei normotensiven Tieren mit Gentamycin-induzierten Nierenschäden (Murakami *et al.*, 1998).

1.2.4.4 Krebs

Die bisher aufgeführten pleiotrope Funktionen der Kinine, bei der Aktivierung endothelialer Zellen, Proliferation, Aktivierung von Leukozyten etc. sind auch innerhalb von chronisch entzündlichen Mikroumgebungen von Bedeutung, die ein Charakteristikum maligner Erkrankungen sind. Daher wurde die Rolle von Kinin-Rezeptoren innerhalb verschiedener Krebs-Studien untersucht.

Da Costa *et al.* (da Costa *et al.*, 2014) begründen Ihre Ansicht dass Kinin-Rezeptoren (vor allem B1) aus folgenden Gründen viel versprechende Ziele für die Krebstherapie sind: (1) die Zellen zahlreicher Tumore exprimieren anormal hohe Mengen dieser Rezeptoren; (2) einige Krebsarten produzieren Kinine und benutzen sie als autokrine Faktoren, um ihr eigenes Wachstum selbst zu stimulieren; (3) die Aktivierung der Kinin-Rezeptoren führt zur Aktivierung von Makrophagen, dendritischen Zellen und anderen Zellen der tumoralen Mikroumgebung; (4) Kinine haben pro-angiogene Eigenschaften; (5) Kinin-Rezeptoren wurden in Verbindung gebracht mit der Migration, Invasion und Metastasierung von Krebszellen; (6) selektive Antagonisten gegen B1 oder B2 haben anti-proliferative, entzündungshemmende und anti-angiogene Effekte gegenüber Krebszellen gezeigt, wobei auch deren Migration eingeschränkt wurde.

Bisher wurden der B2-Antagonist RMP-7 (Labradimil) und der duale B1/B2- Antagonist B9870 (Breceptin) im Tierversuch erprobt. Trotz der vielversprechenden präklinischen Ergebnisse, bei denen gezeigt wurde dass Labradimil die Aufnahme von Carboplatin in implantierte Gliome erhöht, konnten die Daten in einer klinischen Phase II Studie nicht reproduziert werden (Prados *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2006).

Die Expression von B1 und/oder B2 wurde in unzähligen Studien über ganz unterschiedliche Krebsarten berichtet (z. B. Nieren-, Speiseröhren-, Gebärmutterhals-, Magen-, Prostata-, Lungen- und Mammakarzinome, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome, Osteosarkom, endometriale und gastrische Karzinome, Lymphome, Hepatome, Mesotheliome oder Hypophysenadenome). Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des KKS und vor allem der B1 und B2 an elementaren biologischen Mechanismen des Kanzerogenese, z.B. der malignen Transformation und Tumor-Progression, die allen genannten Krebsarten gemeinsam

sind. Detailliertere Daten zu den aufgeführten Krebsarten können der umfassenden Übersichtsarbeit von da Costa (2014) entnommen werden.

1.2.4.5 Asthma

Asthma bronchiale beruht auf einer dauerhaft bestehenden Überempfindlichkeit der Atemwege und bei entsprechend veranlagten Personen stellt sich ein chronisch entzündlicher Zustand ein, mit anfallsweiser Atemnot infolge von Bronchialobstruktion. Charakteristisch sind auch die Bildung von Ödemen der Bronchialschleimhaut sowie die vermehrte Sekretion von Schleim. Bei der Pathogenese von Asthma kommt der neutralen Endopeptidase (NEP) eine regulatorische Rolle zu. Dabei handelt es sich um ein membrangebundenes Enzym, welches verschiedene Substratmoleküle, unter anderem auch Bradykinin, am N-terminalen Ende der hydrophoben Aminosäuren spaltet. Durch Zigarettenrauch oder andere Reize sowie entzündliche Veränderungen kommt es zu einer Hemmung der NEP-Transkription und einer geänderten Regulierung der Abbaus von NEP-Substraten (Kroegel, 2002). Um die Wirkung von Bradykinin auf die asthmatische Bronchokonstriktion zu erfassen, wurden Bradykinin, der NEP-Hemmer Phosporamidon und der ACE-Hemmer Captopril im Meerschweinchen – Tiermodell inhalativ verabreicht. Dabei kam es unter der Einwirkung von Bradykinin zu einer dosisabhängigen Erhöhung der plasmatischen Exsudation. Die NEP-Hemmung und Captopril verursachten eine Exazerbation, da beide Wirkstoffe den Abbau von Bradykinin verhindern und somit die Bronchokonstriktion verstärken (Lötvall *et al.*, 1991; Cui *et al.*, 1999).

1.3 DIE ENDOTHELIALE PERMEABILITÄT

Das Gefäßendothel entspricht der inneren Oberfläche von Blutgefäßen und stellt die Übergangsstelle dar zwischen zirkulierenden Blutkomponenten und Zellen der Gefäßwand sowie dem umgebenden extravaskulären Gewebe. Endothelzellen haben eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Perfusion und regeln, als semipermeable Barriere, den Übertritt von Flüssigkeiten, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Austauschmikrogefäßen und dem Interstitium. Gleichzeitig wird das Eindringen von Krankheitserregern oder Schadstoffen in die Blutbahn verhindert (Beck *et al.*, 1999; Bertuglia, 2004). Enge interzelluläre Verbindungen stellen eine ausreichende Permeabilitätsbarriere dar, die von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen stressbedingten Moleküle gesteuert werden (Miles and Miles, 1952). Während der Wirtsabwehr gegen Infektionen oder als Reaktion auf Gewebeverletzungen kommt es zu Veränderungen der endothelialen Integrität, welche sowohl als Ursache aber auch als Folge inflammatorischer Prozesse betrachtet werden können. Derartige kapillare Lecks stören die Flüssigkeitshomöostase und beeinträchtigen auch die Sauerstoffversorgung des umliegenden Gewebes. Im Laufe der Zeit kommt es zu pathophysiologischen Prozessen die auf Stoffwechselstörungen, Infektionen, traumatischen Prozessen oder anderen Krankheitserscheinungen beruhen was zu multiplen organspezifischen Dysfunktionen führen kann (Weis, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Curry and Adamson, 2010).

1.3.1 DIE ENDOTHELIALEN BARRIEREN

Es wird grundsätzlich unterschieden zwischen verschiedenen Arten von endothelialen Barrieren. Das kontinuierliche Endothel ist undurchlässig für die im Blut gelösten Stoffe durch die Ausbildung von *Tight Junctions*, die als besonders dichte Zell-Zell-Kontakte eine sehr impermeable Form der inneren Auskleidung von blutleitenden Gefäßen darstellen. Sie tragen dazu bei, dass der Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut durch hochselektive Transportmechanismen strikt kontrolliert wird und kommen meistens in der apikalen Region von Epithelzellen (z.B. Nieren-, Harnblasen- und Darmepithel) sowie Gehirnkapillarendothelzellen (Blut-Hirn-Schranke) vor. Dabei handelt es sich um schmale Bänder aus Membranproteinen zu denen das Occludin gehört, bzw. Proteine die zu Gruppe der Claudine gehören, und die auf Kapillarebene eine besonders effektive Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und Gewebe gewährleisten. Zusätzlich sind die Zellen des kontinuierlichen Endothels (außer in den Kapillaren des ZNS) reich an so genannten

Caveolae. Dabei handelt es sich um kleine Kavitäten mit cholesterinreichen Mikrodomänen, die als 50-100 Nanometer große Ω -förmige Einbuchtungen der Plasmamembran zu erkennen sind (s. auch Abbildung 1.3-1). Kontinuierliche Endothelien kommen vor im Gewebe von Haut, Herz, Lunge, Nervensystem (Blut-Hirn-Schranke), Skelettmuskulatur, Fettgewebe, exokrinen Drüsen und Thymus. Im Nierenglomerulus, in der Darmwand sowie in endokrinen Drüsen kommt das durchlässigere fenestrierte Endothel vor, wobei „Fenster“, die im Durchmesser etwa 70 nm groß sind, auch den Durchtritt größerer Moleküle ermöglichen. Durch die speichenartigen Diaphragmen der „Fenster“ wird jedoch die Durchlässigkeit für sehr großer Moleküle oder sogar Zellen wieder einschränkt. Bei dem diskontinuierlichen Endothel handelt es sich um eine besonders durchlässige Form, die durch weite Abstände zwischen den meisten Endothelzellen gekennzeichnet ist. Durch diese grobmaschige Architektur können sogar Blutzellen über den parazellulären Transportweg hindurchtreten. Kapillaren mit diskontinuierlichem Endothel ermöglichen einen ungehinderten Transport aller Blutbestandteile und kommen vor allem in den Lebersinusoiden sowie den Nierenglomeruli vor.

Die endotheliale Barrierefunktion der Austauschmikrogefäße (Kapillaren und postkapillare Venolen) beruht auf der Integrität der endothelialen Struktur, die auf Moment-zu-Moment-Änderungen reagiert in Bezug auf das Zytoskelett, komplexe interzelluläre Verbindungen und die Bindung an die Basalmembran. Eine niedrige und selektive basale Permeabilität wird durch eine feine physiologische/molekulare Regulierung dieser zellulären Strukturen gewährleistet. Die Stimulation durch entzündungshemmende Zytokine, Krankheitserreger, aktivierte Blutzellen oder Krankheitszustände führen zu endothelialen Dysfunktionen. Die Pathophysiologie dieser Vorgänge ist gekennzeichnet durch einen übermäßigen Fluss des Blutplasmas in das umgebende Gewebe, bedingt durch die eingeschränkte para- und interzelluläre Integrität. Diese Mechanismen sind in Abbildung 1.3-1 dargestellt.

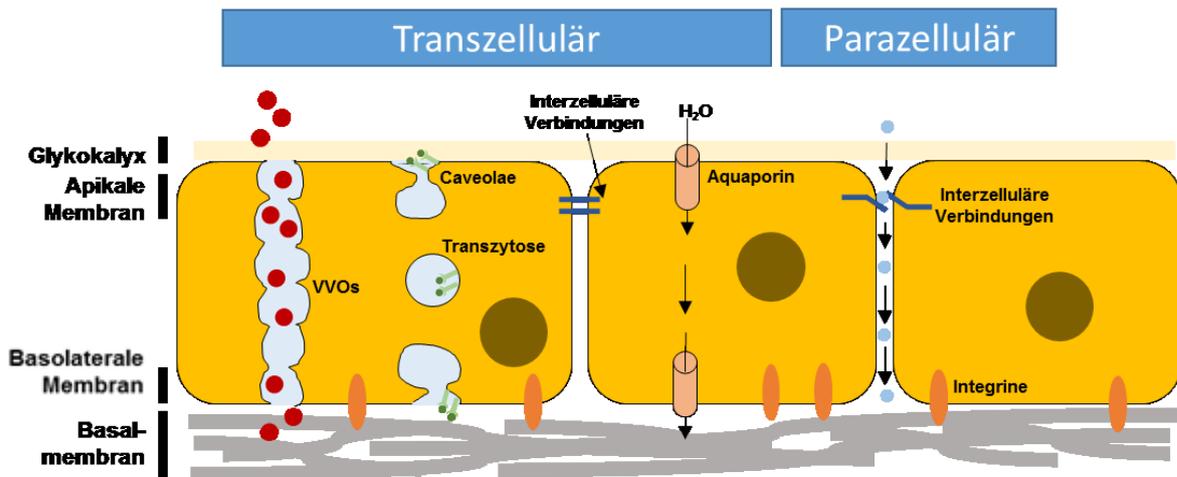


Abbildung 1.3-1 Transzelluläre und parazelluläre Permeabilität im mikrovaskulären Endothel. Die endotheliale Glykokalyx kleidet luminal jedes gesunde Gefäß aus und ist neben der Endothelzelle selbst ein bedeutender Bestandteil der Gefäßbarriere. Die Barrierefunktion der vaskulären Endothelien wird durch eine dünne Zellschicht gewährleistet, die über membrangebundene Integrine der Basalmembran eng aufliegt. Endotheliale Zellen sind durch Tight Junction-Proteine verbunden, die eine selektive Passage von gelösten Stoffen und Flüssigkeiten durch das Endothel ermöglichen. Durch pathophysiologische Vorgänge werden diese Verbindungen porös, wobei auch große Lücken entstehen können. Gelöste Stoffe können auch über Caveolae durch das Zellinnere transportiert werden, entweder über Rezeptor-vermittelte endozytotische Vesikel oder über vakuolenartige vesikuläre Organellen (VVOs), die mit endozytotischen Vesikeln fusionieren können und somit offene transzelluläre Poren bilden können. Der transzelluläre Transport von Wasser wird in den endothelialen Membranen durch Aquaporine z.B. Sammelrohr in der Niere reguliert.

1.3.1.1 Transzelluläre Permeabilität

Die Transzytose ist ein wichtiger Weg der endothelialen transzellulären Permeabilität für Makromoleküle (Michel and Curry, 1999; Mehta and Malik, 2006; Predescu, Predescu and Malik, 2007; Chidlow and Sessa, 2010; Komarova and Malik, 2010). An dem Mechanismus ist die Vesikel-vermittelte Endozytose an der luminalen endothelialen Membran beteiligt, mit anschließender Transzytose durch die Zelle sowie Exocytose an der basolateralen Membran. Der Transport von der apikalen zur basolateralen Membran kann durch einzelne Vesikel vollzogen werden oder durch ein zusammenhängendes Cluster von miteinander verbundenen vesiculo-vakuolären Organellen (VVOS), die kanalartige Strukturen bilden mit einem Durchmesser von 80-200 nm, die den Zellinnenraum vollständig durchqueren (Kohn *et al.*, 1992; Dvorak *et al.*, 1996).

Endozytose und Exozytose werden durch Caveolae vermittelt, lipidische Mikrodomänen und Einstülpungen der Plasmamembran (Predescu and Palade, 1993; Simons and Ikonen, 1997).

Das Volumen der Flüssigkeit innerhalb Caveolae kann bis zu 15-20% des Endothelzellenvolumens betragen (Frøkjær-Jensen, 1991), was den Transport von erheblichen Flüssigkeitsmengen und gelösten Stoffen ermöglicht. Caveolae enthalten Caveolin-1 (CAV-1), ein 22 kDa großes membranäres Strukturprotein, welches in einer oligomeren Anordnung vorliegt, die den Caveolae ihre charakteristische Form und Struktur verleiht (Sargiacomo *et al.*, 1995; Predescu, Predescu and Malik, 2007).

Vesikulär vermittelte Transzytose tritt auf, auch wenn Albumin an gp60-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen bindet (Minshall *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 2001; Hu and Minshall, 2009). Leukozyten können auch durch Transzytose durch das endotheliale Zellinnere bewegt werden. Dies wurde in mikroskopischen Aufnahmen von Fluoreszenzmarkierten Leukozyten gezeigt, die nach membranärer Invagination internalisiert wurden (Carman and Springer, 2004; Carman *et al.*, 2007).

1.3.1.2 Parazelluläre Permeabilität

Die parazelluläre Permeabilität ist verantwortlich für den wesentlichen Anteil des Durchtritts von Blutplasma und Proteinen durch mikrovaskuläre Endothelzellen unter pathophysiologischen Bedingungen. Wie bereits erwähnt, kommen in den Mikrogefäßen bestimmter Gewebearten (z.B. Niere und Leber), Diskontinuitäten oder Fenestrierungen zwischen den Endothelzellen vor, um den physiologischen Durchtritt großer Moleküle oder Proteine (Michel and Curry, 1999) zu ermöglichen. In anderen Organen regulieren interzelluläre Verbindungen oder Poren den selektive Durchtritt von Wasser, Makromolekülen oder sogar Blutzellen. Die strukturelle und funktionelle Integrität dieser Übergänge ist ein wesentlicher Aspekt der parazellulären Permeabilität.

Die beteiligten Strukturen der parazellulären Permeabilität sind in der Abbildung 1.3-2 zusammengefasst.

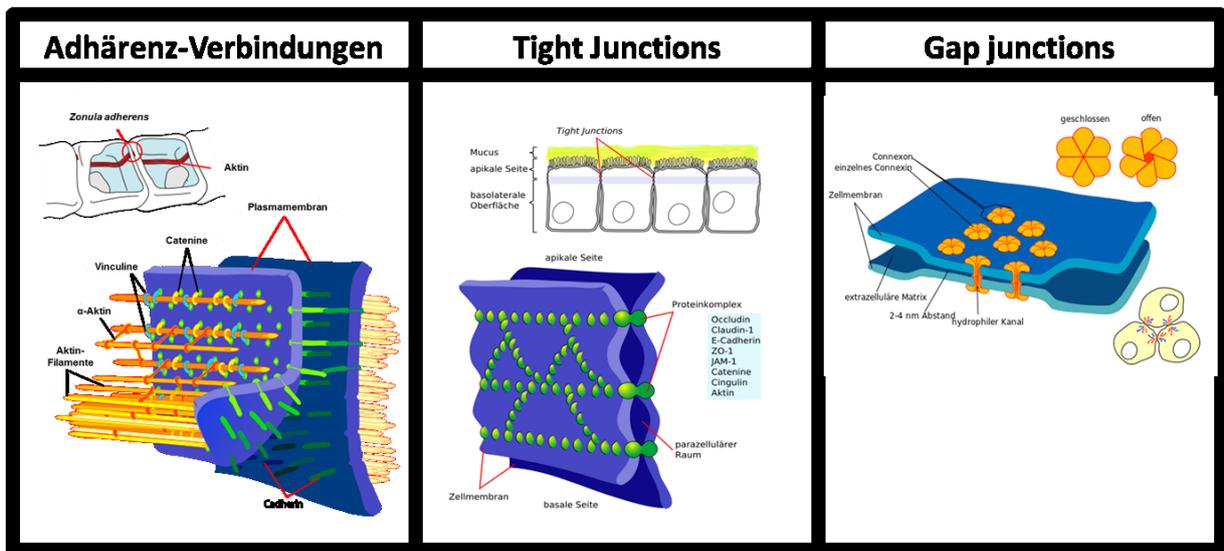


Abbildung 1.3-2 Strukturen der transzellulären und parazellulären Permeabilität
 (A) **Adhärenz-Verbindungen** [Quelle: Adherens Junctions structural proteins“ von Mariana Ruiz LadyofHats. Lizenziert unter Gemeinfrei über Wikimedia Commons - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adherens_Junctions_structural_proteins.svg#/media/File:Adherens_Junctions_structural_proteins.svg]
 (B) **Tight junctions** [Quelle: "Cellular tight junction de" by artwork by Mariana Ruiz - File:Cellular tight junction-en.svg translated to German by Kuebi = Armin Kübelbeck. Licensed under Public Domain via Wikimedia Commons - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cellular_tight_junction_de.png#/media/File:Cellular_tight_junction_de.png]
 (C) **Gap junctions** [Quelle: "Cellular gap junction de" by artwork by Mariana Ruiz - File:Cellular gap junction-en.svg translated to German by Kuebi = Armin Kübelbeck. Licensed under Public Domain via Wikimedia Commons - https://de.wikipedia.org/wiki/Gap_Junction#/media/File:Gap_cell_junction-de.svg]

Die Adhärenz-Verbindungen (Adherens Junctions, AJ) und Tight junctions (TJ) sind die am weitesten verbreitete Art endothelialer Zellübergänge und kommen als wichtige interzelluläre Strukturen im Endothel der meisten, wenn nicht sogar aller mikrovaskulärer Gefäßbetten vor (Mehta and Malik, 2006; Komarova and Malik, 2010). Sie stellen eine Verbindung zwischen den Aktin-Filamenten benachbarter Zellen her und stärken sie dadurch mechanisch. Dabei sind sie undurchlässig für Albumin (69 kDa; Molekülradius 3,6 nm) und große Proteine (Simionescu, Simionescu and Palade, 1978; Mehta and Malik, 2006).

Tight junctions sind schmale Bänder aus den integralen Membranproteinen Occludin und Claudin. Sie umgürten die Epithelzellen vollständig und stehen mit den Bändern der Nachbarzellen in enger Verbindung. Zudem sind sie an das Aktin-Zytoskelett gebunden, über α -Catenin und die Zona Occludens Proteine (ZO-1, ZO-2). Dadurch wird eine parazelluläre Barriere gebildet, die eine effektive Diffusionsbarriere darstellt. Im Vergleich zu AJ sind sie in peripheren Mikrogefäßen weniger verbreitet, und wurden im mikrovaskulären Endothel einiger

spezialisierten Gewebearten, zum Beispiel der Blut-Hirn- oder Blut-Retina-Schranke nachgewiesen (Pardridge, 1998; Hawkins and Davis, 2005), wo sie eine zusätzliche Barrierefunktion darstellen, die den Durchgang wesentlich kleinerer Moleküle (<1 kDa) verhindern.

Weitere Strukturen kommen an zellulären endothelialen Strukturen von größeren Gefäßen vor, die jedoch für die parazelluläre Permeabilität mikrovaskulärer Endothelzellen von geringerer Bedeutung sind. Gap Junctions sind Kanäle aus Connexinen, die Zellmembranen zweier benachbarter Zellen durchqueren und deren Cytoplasma miteinander verbinden, wobei die Membranen in einem Abstand von nur 2 bis 4 nm zueinander fixiert werden. Signalmoleküle, z.B. Ca^{2+} können sich über Gap junctions zwischen benachbarten Zellen bewegen (Koval and Battacharya, 2006). Damit spielen die gap junctions eine eher indirekte Rolle bei der Regulation der endothelialen Durchlässigkeit durch die Förderung von Zell-Zell-Kommunikation.

Das mikrovaskulären Endothel einiger Gewebearten enthält Poren von 50 bis 60 nm im Durchmesser (zB Niere, Darm oder Plexus). Im diskontinuierlichen Endothel (in der Leber oder Milz) können die Lücken bis zu 100 nm betragen (Levick, 2010). Diese Strukturen haben jedoch keine Bedeutung für die Regulation der Permeabilität.

1.3.2 ARTEN DER PERMEABILITÄT

Im pathophysiologischen Geschehen von akuten und chronischen Entzündungen, bei Krebs und Prozessen der Wundheilung ist die Gefäßpermeabilität drastisch erhöht (Nagy *et al.*, 2002, 2008; Dvorak, 2003; Nagy, Dvorak and Dvorak, 2003). Es handelt sich dabei um ein sehr komplexes biologisches Geschehen, wobei die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen von zahlreichen Faktoren abhängen. Dazu gehören, unter anderem, die intrinsischen Eigenschaften der unterschiedlichen Mikrogefäße (Kapillaren, Venolen, Muttergefäße), die Größe, Form und Ladung der permeierenden Moleküle sowie die Versuchstiere und deren jeweilige Gefäßbetten. Bei der Untersuchung der Permeabilität ist generell zu beachten dass die beteiligten Gefäße nicht nur einer einzigen Gefäßart zugeordnet werden können, wodurch die Messungen stets eine Kombination verschiedener Faktoren darstellen, z.B. intrinsische Eigenschaften des Blutes und extrinsische Charakteristika wie z.B. die Durchblutung. Je nach den beteiligten Gefäßen oder der Zusammensetzung des Extravasates und anderer Merkmale kann unterschieden werden zwischen der basalen, akuten und chronischen vaskulären Permeabilität (Nagy *et al.*, 2008).

1.3.2.1 Die basale Permeabilität (BP)

Der Austausch von Wasser, Gasen (O₂ und CO₂) und kleinen Molekülen (z.B. Salz, Zucker oder kleine Plasmaproteine) verläuft unter physiologischen Bedingungen über einen bidirektionalen Transport der überwiegend durch die Diffusion vermittelt wird. Dabei kann die basale Permeabilität verschiedener Gewebearten stark variieren und auch innerhalb eines Gewebes können sich erhebliche Veränderungen ergeben, je nach hydrostatischem Druck, Blutfluss und der gesamten endothelialen Fläche die für den Austausch zur Verfügung steht.

Kapilläre Endothelien wurden ursprünglich als eine dünne, passive Barriere beschrieben, die von Poren unterschiedlicher Größe durchdrungen ist. Mit der Möglichkeit elektronenmikroskopischer Untersuchungen stellte sich jedoch in den 1950er Jahren heraus, dass es sich dabei nicht um „Poren“ handelte, wodurch es auch weiterhin keine Erklärung gab für die Extravasation von Plasmaproteinen. Die Studien von George Palade brachten jedoch neue Erkenntnisse, und zeigten dass kapilläre Endothelien eine große Anzahl kleiner Vesikel enthielten (ca. 70 nm Durchmesser), die als Caveolae bezeichnet wurden (s. Abbildung 1.3-1) (Palade, 1960, 1988; Palade, Simionescu and Simionescu, 1982). Membran und Inhalt dieser Vesikel stehen oftmals in Kontinuität mit der Zellmembran und dem extrazellulären Medium (Blutplasma oder interstitielle Lymphe). Caveolae bewegen sich zwischen der luminalen und abluminalen Seite des Kapillarendothels und transportieren Plasma und plasmatische Proteine, wobei sie mitunter eine charakteristische Kette aus Vesikeln bilden (Dvorak, 2007a). Zur gleichen Zeit wurde aber auch festgestellt dass Caveolin-1-defiziente Mäuse, die keine Caveolae ausbilden können, trotzdem eine erhöhte Permeabilität für Albumin haben (Schubert *et al.*, 2002; Rosengren, Rippe and Rippe, 2006). Eine überaktive eNOS in den Mäusen führt zu einer erhöhten NO-Produktion, da keine Hemmung durch Caveolin vorliegt (Rizwan Siddiqui *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Die akute vaskuläre Hyperpermeabilität (AVH)

Eine schnelle Erhöhung der Gefäßpermeabilität tritt auf, sobald das Endothel vaskulärer Mikrogefäßen permeabilisierenden Stoffen (z.B. VEGF oder Histamin) ausgesetzt ist. Histamin, Serotonin und VEGF werden in Mastzellen des Gewebes gespeichert und freigesetzt, sobald die Degranulation dieser Zellen durch Faktoren wie z. B. Allergien oder Insektenstiche stimuliert wird (Galli, 1997, 2000; Boesiger *et al.*, 1998). Dadurch kommt es zu einem schnellen, jedoch zeitlich limitierten (20-30 min.) Einfließen von Plasma in das umliegende Gewebe. Dabei ist die Menge der extravasierten Flüssigkeit wesentlich höher als bei der basalen Permeabilität. Während man bei der basalen Permeabilität die durchtretende Flüssigkeit eher als ein Filtrat bezeichnen kann (bestehend aus Wasser und kleinen

Molekülen), hat das Extravasat der akuten Hyperpermeabilität, welches auch als Exsudat bezeichnet wird, einen sehr hohen Gehalt an Plasmaproteinen. Sobald diese in Kontakt mit dem Gewebefaktor kommen, wird das Blutgerinnungssystem aktiviert (Dvorak *et al.*, 1981; VanDeWater *et al.*, 1985). Dabei entsteht eine gelartige Matrix aus Fibrin, welche den Abfluss der Flüssigkeit über Lymphgefäße verhindert und es kommt zur Schwellung des Gewebes. Nachdem der Stimulus der Hyperpermeabilität nicht andauernd ist, wird das Fibringerüst ohne weitere Konsequenzen rasch wieder abgebaut.

Im Unterschied zur basalen Permeabilität liegt bei der akuten Hyperpermeabilität eine Verminderung der Barriere in den Venolen vor, die den Kapillaren nachgeschaltet sind (Majno, Palade and Schoefl, 1961; Majno, Shea and Leventhal, 1969). Diese Erkenntnis stimmt überein mit der Beschreibung von vesikulären Organellen (vesico-vacuolar organelle, VVO) in Venolen, die einen alternativen transendothelialen Weg für plasmatische Extravasation nach Stimulation mit permeabilisierenden Stoffen darstellen (Kohn *et al.*, 1992; Dvorak *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996, 1997, 2000). VVO's lassen sich elektronenmikroskopisch als traubenförmiges Gebilde darstellen, welche das endotheliale Cytoplasma von der luminalen zur abluminalen Seite durchqueren und auch in der Nähe von inter-endothelialen Zellkontakten zu finden sind. Dabei können VVOs bis zu 10 Mal größer sein als Caveolae (Feng *et al.*, 1999) und sind untereinander und mit der Plasmamembran durch dünne Diaphragmen verbunden, ähnlich wie bei den Caveolae (Feng *et al.*, 1999). Bei Caveolin-1-defizienten Mäusen, wurden VVOs nachgewiesen, aber es ist nicht bestätigt ob dies auch ursächlich mit der vermehrten kapillaren Permeabilität zusammenhängt die bei diesen Tieren beobachtet wurde. Obwohl die funktionalen Mechanismen der VVOs noch nicht ausreichend geklärt sind, geht man davon aus, dass die Permeabilität fördernden Faktoren zur Öffnung der Diaphragmen von VVOs führen, und somit eine transzelluläre Verbindung für die Extravasation von Plasma und plasmatischen Proteinen verursachen. Dreidimensionale Rekonstruktionen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen haben gezeigt, dass die durch Permeabilitätsfaktoren verursachte Öffnungen in Endothelien von Venolen transendothelial und nicht parazellulär sind (Neal and Michel, 1995; Feng *et al.*, 1997, 1999).

Wie bereits erwähnt, gehören die Adhärenzverbindungen und Tight Junctions zu den Strukturen der parazellulären Permeabilität. Cadherine sind als Adhäsionsproteine transmembranäre Glykoproteine und vermitteln Zellkontakte in verschiedenen Geweben. Im menschlichen Organismus sind mehr als 80 verschiedene Mitglieder der Cadherinfamilie bekannt, die auch in Adhärenzverbindungen und *Tight junctions* zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten beitragen. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), Histamin oder Bradykinin führen zur Hyperphosphorylierung von VE-Cadherin wodurch es zum Abbau von VE-Cadherin kommt, gefolgt von der Extravasation von

Makromolekülen. Im Gegensatz dazu kommt es im physiologischen Zustand nur zu einem vorübergehenden Abbau der Adhärenzverbindungen, zumal VE-Cadherin recycelt und erneut auf der Zelloberfläche präsentiert wird (Fukuhra *et al.*, 2006). Bei Erkrankungen die durch eine andauernd erhöhte vaskuläre Permeabilität charakterisiert sind, kommt es auch zu einer andauernd gestörten strukturellen und funktionalen Regulation der parazellulären Permeabilität, die zellulären Verbindungen bleiben geöffnet und es stellt sich ein Zustand der chronischen Permeabilität ein (Nagy *et al.*, 2008).

1.3.2.3 Die chronische vaskuläre Hyperpermeabilität (CVH)

Während es bei der AVH zu einer schnellen und vorübergehenden Erhöhung der Permeabilität kommt, wird bei der chronischem Einwirken von Permeabilitäts-induzierenden Wirkstoffen das Gefäßbett langfristig verändert und somit auch die Venenstruktur und Venenfunktion. Dies ist der Fall im pathologischen Geschehen von chronischen entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Rheuma oder Psoriasis, in Tumoren oder bei der Wundheilung (Nagy *et al.*, 1995; Bates and Jones, 2003; Dvorak, 2007b). Die Zusammensetzung des austretenden proteinreichen Exsudates entspricht dem Plasma, was auch bei der akuten vaskulären Hyperpermeabilität der Fall ist.

Bei der CVH findet die gesteigerte Permeabilität nicht in den Gefäßbetten normaler Blutgefäße statt. Sowohl bei der Wundheilung als auch im Fall von Tumoren handelt es sich bei den hyperpermeablen Gefäßen um abnormale neu gebildete Blutgefäße, vor allem Muttergefäße und deren glomerulären mikrovaskulären Proliferationen (GMP) (Brown *et al.*, 1992, 1997; Pettersson *et al.*, 2000; Sundberg *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2006). Die Muttergefäße sind stark erweitert und entstehen aus bereits vorhandenen Blutgefäßen bei denen die Perizyten vom Endothel gelöst werden und die Basalmembran abgebaut wird, wobei es zu einer vier- bis fünffachen Vergrößerung des Lumens kommt. Dadurch werden einzelne Endothelzellen wesentlich flacher, ausgedünnt und vereinzelt. Durch die verkürzten Strecke zwischen Lumen und Ablumen können Makromoleküle die Endothelzelle schneller durchqueren (Nagy *et al.*, 2006, 2008). Zusätzlich kommt es zur Extravasation von Makromoleküle durch Fenestrierungen, die sowohl in Mikrogefäßen als auch in glomerulären mikrovaskulären Proliferationen vorkommen (Feng *et al.*, 1999). Damit ist auch eine verlangsamte Blutflußgeschwindigkeit verbunden, sowie eine durch die erhöhte Permeabilität bedingte Zunahme des Hämatokrit-Wertes.

Wie bereits im Fall der AVH beschrieben kommt es auch hier zur Aktivierung des Blutgerinnungssystems und Bildung einer Fibrin-Matrix. Die Fibrin-Matrix bietet ein vorläufiges pro-angiogenes Stützgewebe, welches später von einwachsenden neuen Blutgefäßen und

Fibroblasten ersetzt wird (Dvorak, Dvorak, *et al.*, 1979; Dvorak, Orenstein, *et al.*, 1979; Dvorak, 2003).

1.4 REGULIERUNG DER VASKULÄREN PERMEABILITÄT

Das relative Ausmaß der vaskulären Permeabilität kann indirekt durch den Blutdruck und dem daraus resultierenden Blutfluss reguliert werden. Eine Zunahme der Durchblutung, zum Beispiel als Folge der Vasodilatation, erhöht die vaskuläre Permeabilität (Meininger and Davis, 1992; Baskurt, Yalcin and Meiselman, 2004). Zu den wichtigsten regulatorischen Signalstoffen der Gefäßdurchlässigkeit gehören Wachstumsfaktoren (VEGF), Histamin und Bradykinin.

1.4.1 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, VEGF

Der VEGF umfasst eine Familie von Proteinen die hauptsächlich vaskuläres Endothel stimulieren und wichtige Signalmoleküle der Vaskulogenese und der Angiogenese darstellen. Sieben verschiedene Formen des VEGF sind bisher bekannt (A-F, PlGF) (Ylä-Herttuala *et al.*, 2007). VEGF bindet an zwei strukturell verwandte Rezeptoren (VEGFR1 und VEGFR2), wobei vor allem VEGFR2 an der Regulierung der Permeabilität und Angiogenese beteiligt ist (Workman, 2004; Sun *et al.*, 2006). Die Rolle von VEGFR1 ist bisher weniger klar, es handelt sich wahrscheinlich um einen negativen Regulator von VEGFR2 (Koch *et al.*, 2011). Die Bindung von VEGF an den VEGFR-2-Rezeptor führt zu Dimerisierung, Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase, Phosphorylierung des Rezeptors und der intrazellulären Substrate der Kinase. Dabei ist die Position Y949 des VEGFR2-Rezeptors eine Bindungsstelle für das Protein TSAAd (T-cell specific adaptor), welches an die zyttoplasmatische Tyrosinkinase (cSrc) bindet. Durch Gen-Silencing von TSAAd kommt es zum Verlust der VEGF – induzierten vaskulären Permeabilität (Sun *et al.*, 2012). Zudem wird Cadherin durch cSrc phosphoryliert (Eliceiri *et al.*, 1999; Weis *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2009), was zum Abbau der interzellulären Cadherin-Verbindungen beiträgt, mit nachfolgender Internalisierung, Abbau oder Recycling dieses Proteins (Fukuhra *et al.*, 2006). Weitere Positionen der Phosphorylierung von VEGFR2 wurden beschrieben (Y1375, Y1214), die Signalwege induzieren, welche auch an der Regulierung der vaskulären Permeabilität beteiligt sind (Sakurai *et al.*, 2005; Lamalice, Houle and Huot, 2006; Funa *et al.*, 2009; Claesson-Welsh and Welsh, 2013). Der eNOS-NO Signalweg ist auch in die durch VEGF vermittelte Regulierung der vaskulären Permeabilität eingebunden, zumal in einer eNOS Knockout Mauslinie (eNOS^{-/-}) die charakteristischen durch VEGF vermittelten Signalwege blockiert sind. Dies weist darauf hin, dass eNOS eine wichtige

Rolle spielt bei der VEGF-induzierten Angiogenese und vaskulären Permeabilität (Fukumura *et al.*, 2001).

1.4.2 HISTAMIN

Histamin ist seit langem als ödematogener Faktor mikrovaskulärer Gefäße bekannt, vor allem im Zusammenhang mit akuten Entzündungsreaktion die durch Allergien, Verbrennungen, Insektenstiche Traumata oder manche Infektionskrankheiten verursacht sind. Vier Arten von G-Protein-gekoppelten Histamin- Rezeptoren wurden bisher beschrieben (H1, H2, H3 und H4) (Marshall, 1984; Hill *et al.*, 1997; Parsons and Ganellin, 2006), wobei der Rezeptor H1 die wichtigste Funktion in Bezug auf die vaskuläre Permeabilität hat (Clough, Bennett and Church, 1998). Es ist allgemein anerkannt, dass die Gq-gekoppelten Bindung von Histamin an den H1 Rezeptor die Phospholipase PLC β aktiviert und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht. Dadurch kommt es zu einer höheren Aktivität der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLKK) und Aktin-Myosin-Kontraktionen (Yuan, 2000; Yuan *et al.*, 2007). Die durch Histamin vermittelte Signalkette verursacht auch die Phosphorylierung und somit den Abbau von Proteinen der Adhärenzverbindungen und der *Tight junctions* (Shasby *et al.*, 2002; Mehta and Malik, 2006; Guo *et al.*, 2008).

1.4.3 BRADYKININ

Sowohl Histamin als auch Bradykinin aktivieren die Serin-Threonin Kinase Akt (Proteinkinase B, PKB), welche die endotheliale NO-Synthase (eNOS) phosphoryliert und somit aktiviert (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999; Fukumura *et al.*, 2001; Phung *et al.*, 2006). Dadurch kommt es zur Bildung von NO, einem der wichtigsten Regulatoren des Gefäßtonus. Die Vasodilatation kommt durch Stimulierung der löslichen Guanylatcyclase und die Erhöhung des cyclischen GMP in den Muskelzellen der glatten Muskulatur zustande (Förstermann and Sessa, 2012). Die eNOS kann auch von anderen Kinasen außer Akt aktiviert werden. Ein weiterer Effekt von NO besteht in der S-Nitrosylierung von β -Catenin, welches die Verbindung herstellt zwischen der zytosolischen Domäne des Zelladhäsionsmoleküls Cadherin und dem Aktin des Zytoskeletts (s. Abbildung 1.3-2). Dadurch kommt es zur Dissoziation von Catenin und Cadherin und dem Abbau der Adhärenzverbindungen (Thibeault *et al.*, 2010). Die Aktivierung der PLA₂ durch Ca²⁺ führt zur Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen (Leeb-Lundberg, 2012).

1.5 FRAGESTELLUNG

Die Rolle der Veränderungen der Bradykinin-Aktivität in HAE und ACE-H induziertem Angioödem ist bislang weniger gut verstanden. Dies beinhaltet u. a. die Regulierung der Expression des B2. Ob und in wie weit es zu Änderungen der Empfindlichkeit des B2 nach längerer Stimulation mit Bradykinin kommt, ist bisher ebenso wenig bekannt und das gleiche gilt für die Synthese von vaskulärem NO als Reaktion auf die Aktivierung des B2 in Hautgefäßen (Bas, Hoffmann and Kojda, 2006). Zudem erhöht die Behandlung mit ACE-H die durch Acetylcholin und/oder Hyperämie induzierte Endothel-abhängige Vasodilatation, was auf eine erhöhte vaskuläre NO Bioverfügbarkeit hinweist bei Patienten die an Herz-Kreislauf-Erkrankungen leiden. Dies wurde gezeigt im Fall von Bluthochdruck (Gainer *et al.*, 1998), nicht primär insulinabhängiger Diabetes (O'Driscoll *et al.*, 1999) und KHK (Koh *et al.*, 1999). Es ist möglich, dass die Regulierung der B2 zu dem HAE und ACE-H induziertem Angioödem beitragen kann, sowie einen Einfluss hat auf die Wirksamkeit von Wirkstoffen wie C1-INH oder Icatibant. Darüber hinaus könnte eine solche Regulierung einen Einfluss haben auf den durch ACE-Hemmer induzierten trockenen Husten (Fox *et al.*, 1996).

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit bestand darin, die Rolle von NO, Bradykinin, C1-INH, Icatibant und Diclofenac zu untersuchen bezüglich der endothelialen Expression und Aktivität von B2 bzw. der involvierten Signalwege. Ein weiteres Ziel bestand darin, die damit assoziierten phänotypischen Änderungen zu evaluieren, durch Messung der Aortenkonstriktion, sowie durch die Bestimmung der vaskulären Permeabilität mittels des Miles-Assays und der 2-Photonen-Mikroskopie. Da eine direkte Untersuchung dieser Fragen am Menschen nicht möglich ist, basierte der experimentelle Aufbau auf endothelialen Zellen (porcine Aorten-Endothelzellen, murine zerebrale Endothelzellen, humane umbilikale venenendothelzellen) sowie auf verschiedenen Organen von Mäuselinien (Lunge, linksventrikuläres Gewebe, Haut, Ohr, thorakale Aortenringe).

In diesem Zusammenhang sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welchen Einfluss hat NO auf die Expression des Bradykinin-Rezeptors und die durch Bradykinin induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in verschiedenen Zellsystemen?
- Geht die Modifikation der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit mit einer veränderten Proteinexpression des B2 *in vivo* einher?
- Welche Wirkung hat endogenes vaskuläres Bradykinin auf die Proteinexpression des B2 und auf die vaskuläre Permeabilität in einem transgenen Mausmodell mit überexprimiertem B2?

- Welchen Einfluss hat die NO-Bioverfügbarkeit auf die Bradykinin-vermittelte Vasomotion von Leitungsarterien wie der Aorta?
- Wie wird die vaskuläre Permeabilität (in der dorsalen Haut von Mäusen) durch Bradykinin und Labradimil verändert? Welche Signalwege sind daran beteiligt?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 PUFFER UND LÖSUNGEN

Die verwendeten Chemikalien und organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Zur Herstellung sämtlicher Puffer wurde frisch destilliertes bzw. demineralisiertes Wasser verwendet.

- TAE-Puffer
 - 40 mM Tris
 - 0,1% Essigsäure
 - 10 mM EDTA
 - pH 8,0
- TE-Puffer
 - 10 mM Tris
 - 1 mM EDTA
 - pH 8,0
- 10x TBE-Puffer
 - 890 mM Tris
 - 89 mM Borsäure
 - 20 mM EDTA
- Lysispuffer für Mausschwanzspitzen
 - 50 mM Tris
 - 100 mM EDTA
 - 100 mM NaCl
 - 1% SDS
 - pH 8,0

- Gewebe-Lysispuffer, pH 7,6
 - 5 mM Tris
 - 1 mM EDTA
 - 1 mM EGTA
 - 2,5mM Na₄P₂O₄
 - 1 mM β-Glycerolphosphat
 - 1 mM Na₃VO₄
 - 5 mM NaF
 - 1 mM PMSF
 - Proteaseinhibitoren (0,01g/ml Antipain, 0,01g/ml Aprotinin, 0,01g/ml Leupeptin, 0,01g/ml Benzamidin)
- Lysispuffer für die Zellkultur (RIPA-Lysispuffer)
 - 150 mM NaCl
 - 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 - 1% NP-40
 - 0,1% SDS
- Puffer für Membranpräparationen, pH 7,4
 - 150 mM Tris-HCL
 - 2 mM PMSF
 - 2 mM EDTA
 - 2 mM EGTA
 - Proteaseinhibitoren (0,01g/ml Antipain, 0,01g/ml Aprotinin, 0,01g/ml Leupeptin, 0,01g/ml Benzamidin)
- Bradford-Reagenz
 - 0,02% Coomassie Blue G 250
 - 10% v/v Phosphorsäure
 - 5% v/v Ethanol
- Sammelgelpuffer, pH 6,8
 - 250 mM Tris-HCl
 - 0,2% SDS
 - pH 6,8
- 4x Trenngelpuffer, pH 8,8
 - 150 mM Tris-HCl
 - 0,4% SDS
 - pH 8,8

- SDS Probenpuffer
 - 50 mM Tris
 - 2% SDS
 - 10% Glycerin
 - 0,005% Bromphenolblau
- 10x SDS-Laufpuffer, pH 8,6
 - 250 mM Tris-HCl
 - 1,92 mM Glycin
 - 1% SDS
- TBST-Puffer, pH 7,6
 - 20 mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - 0,1% (v/v) Tween 20
- TBS-Puffer, pH 7,6
 - 20 mM Tris
 - 150 mM NaCl
- Western-Blotting-Puffer
 - 25 mM Tris
 - 200 mM Glycin
 - 20% (v/v) Methanol
- Stripping-Puffer
 - 5 mM Tris
 - 2% SDS
 - 0,75% β -Mercaptoethanol
- Krebs-HEPES-Puffer, pH 7,4
 - 99 mM NaCl
 - 4,69 mM KCl
 - 1,87 mM CaCl_2
 - 1,2 mM Mg SO_4
 - 25,0 mM NaHCO_3
 - 1,03 mM K_2HPO_4
 - 20 mM Na-HEPES
 - 11,1 mM Glucose

- Coomassie Gel-Färbung
Lösung 1: 0,2% Coomassie Brilliant Blue G 250, 90% Ethanol
Lösung 2: 20% Essigsäure
Fixierlösung: 40% Ethanol
Entfärbungslösung: 20% Ethanol, 10% Essigsäure
- Pluronic F-127-Lösung
0,2 g Pluronic® wurden mit DMSO ad 1,0 aufgefüllt und unter Wärme gelöst (20%, w/v)
- OG (Oregon Green)-Lösung, 1,5 µM
50 µg Oregon Green® 488 BAPTA-1 AM wurden in 39,7 µl DMSO gelöst und zu je 3,0 µl Aliquots in 2,0 ml Reagiergefäße verteilt. Die Aliquots wurden bei -20°C unter Lichtschutz bis zur Verwendung gelagert. Am Tag des Experiments wurden dem Aliquot 3,0 µl Pluronic F-127-Lösung und 2,0 ml KHP zugegeben. Die Endkonzentration betrug 1,5 µM.
- 10 x Deglykosylierungspuffer
PBS Puffer 1x
20 mM EDTA
1% SDS
5% Triton X-100
10% 2- Mercaptoethanol
- PBS Puffer
140,0 mM NaCl
10,0 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
2,7 mM KCl
1,8 mM KH₂PO₄
- 1 x LDS Probenpuffer
40% Glycerol
4% Lithiumdodecylsulfat
0,8 % Triethylamin-Cl pH 7,6
4% Ficoll®-400
0,025% Phenolrot
0,025% Coomassie G250
2 mM EDTA 2-Natrium

2.2 LABORTIERE

2.2.1 MÄUSELINIEN UND TIERHALTUNG

Die folgenden Tierversuche wurden entsprechend §8 des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 beantragt und von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (AZ 50.05-230-3-65/99, AZ 50.05-230-3-94/00, AZ 50.05-230-18/06). Bei der Durchführung der Versuche wurden alle Vorschriften des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2006 beachtet, sowie auch die Richtlinie *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* der *US National Institute of Health*. Alle Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in einem speziellen pathogen-freien Bereich (SPF) geboren.

Um den Einfluss von endogenem Stickstoffmonoxid *in vivo* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit transgene Tierlinien verwendet. Bei der eNOS Knockout Mauslinie (eNOS^{-/-}) wurde die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) durch einen klassischen Knockout ausgeschaltet, daher produzieren diese Tiere keine eNOS (Shesely *et al.*, 1996). Bei der eNOS-überexprimierenden Linie (eNOS^{+/+}) handelt es sich um Tiere mit einer erhöhten eNOS-Genexpression im endothelspezifischem Gewebe (Suvorava *et al.*, 2005). Diese genetische Konstruktion entstand durch Klonierung des bovinen eNOS-Abschnittes zwischen den Tie-2-Promoter und das Tie-2-Fragment (Oppermann *et al.*, 2009). Transgen negative Geschwister wurden als Kontrollen eingesetzt, sowie Kontrollmäuse des Stammes C57BL/6. Alle Mäuse waren männlich, im Alter zwischen 12 und 20 Wochen.

Zur Untersuchung des durch e-NOS bedingten oxidativen Stresses wurde die transgene Mauslinie C101A-eNOS-tg (Mu^{+/+}) verwendet, welche am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf etabliert wurde (Suvorava *et al.*, 2015). Zu diesem Zweck wurde ein bovinen eNOS cDNA-Fragment (4,1 kb) zwischen den murinen Tie-2 Promotor (2,1 kb) und ein Tie-2 Intron Fragment kloniert, welches als Tie-2 enhancer zur endothelspezifische Expression eingesetzt wurde. Die zielgerichtete Mutagenese zur Substitution von Cystein durch Alanin wurde durch „primer overlap extension“ PCR durchgeführt. Um die langfristige Richtigkeit der genetischen Konstruktion zu gewährleisten, wurden in regelmäßigen Abständen transgen-spezifische PCR-Reaktionen durchgeführt, gemäß den Angaben in Tabelle 2.2-1. Durch mindestens zehnfache Rückkreuzung transgen-positiver C101A-eNOS-tg Mäuse mit C57BL/6-Mäusen wurde der genetische Hintergrund gesichert. Die transgen negativen Geschwistertiere (C101A-eNOS-tg⁻) stammten aus der 15. – 20. Generation der Rückkreuzung von C101A-eNOS-tg Mäusen mit C57BL/6-Mäusen. Bei diesen Versuchstieren handelt es sich um männliche Mäuse im Alter zwischen 3 und 6 Monaten.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem ein neue transgenen Linie verwendet (B2^{tg} bzw. BK⁺⁺), mit endothelspezifischer Überexpression des B2, welcher aus der B2 exprimierenden Plattenepithel-Karzinomzelllinie UDSCC 2 (squamous carcinoma cells, HNO-Klinik, HH-Universität Düsseldorf) verwendet wurde. Das klonierte Genkonstrukt besteht aus dem B2, der unter Kontrolle des murinen Tie-2-Promotors steht, sowie einem 10 Kb großem Fragment des ersten Introns des Tie-2-Gens (Tie-2-Enhancer), der für die endothelspezifische Expression in adulten Mäusen wichtig ist. Die Generierung dieser Mauslinie ist in der Arbeit von Dr. rer. nat. Vu Thao-Vi Dao (Dao, 2011) detailliert beschrieben.

Die Haltung und Zucht der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (12 stündiger Tag-Nacht-Rhythmus durch Kunstlicht, Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchtigkeit 55°C ± 5%). Die Versuchstiere standen zu jedem Zeitpunkt unter tierärztlicher Kontrolle und wurden alle 2 Tage auf das Vorhandensein von Infektionen und anderen Erkrankungen überprüft. Für die Durchführung der Versuche wurden nur Tiere verwendet, die über einen einwandfreien körperlichen Zustand (Körpergewicht, Fell, Augen, Verletzungen) verfügten.

Kontinuierlicher Zugang zu Standardfutter („Global Diet 2016 for rodents“ der Firma Harlan, Borchon) und entkeimtem Trinkwasser (pH 3) waren immer gewährleistet.

2.2.2 FÜTTERUNGSVERSUCHE

2.2.2.1 Organisches Nitrat PETN

Zur Erfassung des Effektes des NO Donators PETN auf die B2-Proteinexpression im Lungen- und linksventrikulären Gewebe wurden etwa fünf Monate alte Tiere des Stammes C57Bl/6 verwendet. Die Labortiere wurden randomisiert in drei Gruppen eingeteilt (n=5, für jede Gruppe). Der NO-Donator Pentaerythryltetranitrat (PETN, von Actavis GmbH Monheim, Deutschland, in großzügiger Weise zur Verfügung gestellt) wurde in die Futterpellets in zwei verschiedenen Konzentrationen eingearbeitet um die gewünschte Tagesdosis (6 oder 60 mg PETN/kg KG d⁻¹) zu erreichen (Oppermann *et al.*, 2011). Frühere Studien haben gezeigt, dass mit dieser Vorgehensweise messbare Plasmakonzentrationen von Dosis-korrelierten PETN Metaboliten nachgewiesen werden können (Oppermann *et al.*, 2009). PETN oder Placebo wurde dem Futter 4 Wochen lang zugesetzt.

2.2.2.2 *N^ω-nitro-L-Arginin*

C57BL/6 Mäuse (n=12) erhielten in den 3 Wochen vor Versuchsbeginn *N^ω-nitro-L-Arginin* (L-NA, Sigma, Deutschland), welches dem Trinkwasser (pH 3) in einer Konzentration von 1,5 mg/l zugesetzt. Ausgehend von einer durchschnittlichen Wasseraufnahme von 2,0 ml, ergibt sich daraus eine tägliche Dosis von 100 mg L-NA/kg KG. Frühere Studien haben gezeigt, dass diese Dosis ausreichend ist um eine Erhöhung des Blutdrucks zu verursachen die dem Blutdruck der *eNOS^{-/-}* entspricht (Kojda *et al.*, 1999), d.h. es wurde eine vollständige Hemmung der eNOS erreicht. Bei den Kontrollen handelte es sich um Vehikel-behandelte C57BL/6 Mäuse (n=12).

2.2.3 INJEKTIONSVERSUCHE

Zum differenzierten Vergleich der akuten und chronischen Effekte verschiedener Pharmaka auf die Proteinexpression von B2 im Lungengewebe der C57BL/6 Mauslinie, wurden der B2 Inhibitor Icatibant, (16 µg/kg KG) und der Kallikrein Inhibitor C1-INH (130 µg/kg KG) i.v. injiziert. Bei den Akut-Versuchen wurde eine einzige Dosis verabreicht, wobei die Isolierung von RNA und Proteinen 3 h nach Injektion erfolgte. Im Gegensatz dazu erfolgten bei den chronischen Versuchen 3 Injektionen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, wobei auch hier 3 h nach der letzten Injektion die RNA und Proteine isoliert wurden.

2.2.4 GENOTYPISIERUNG DER TRANSGENEN TIERE

2.2.4.1 *Isolierung von genomischer DNA aus Biopsien der Maus*

Biopsien aus der Schwanzspitze der Maus wurden zur anschließenden Genotypisierung der Versuchstiere entnommen. Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das entnommene Gewebe mit 750 µl Lysispuffer und 17,5 µl Proteinase K (0,5 mg/ml; Qiagen) versetzt und bei 56°C über Nacht (ca. 16 Stunden) zur Lyse aller Proteine inkubiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden 250 µl einer 6 M NaCl-Lösung zugegeben, die Reaktionsgefäße wurden geschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (13 000 rpm, 15 min, RT). Zur Fällung der DNA wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von der Zugabe von 500 µl eiskaltem (-20°C) absolutem Ethanol. Nach 10 min Inkubation wurde erneut zentrifugiert (4°C; 13000 rpm; 30 min). Der Überstand wurde

verworfen und die DNA durch Zugabe von 750 µl kaltem Ethanol (70%) und anschließender Zentrifugation (4°C; 13000 rpm; 5 min) aufgenommen. Das Sediment wurde vollständig getrocknet, in 80 µl TE-Puffer aufgenommen und über Nacht gelöst. Am nächsten Tag wurde die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Biophotometer® (Eppendorf, Hamburg) spektrophotometrisch bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde als ausreichend betrachtet, wenn der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm im Bereich von ca. 1,8 lag. Die DNA (bzw. Aliquots) wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR

Die Genotypisierung der transgenen Mäuse erfolgte mittels PCR. Die Zielsequenzen zur Genotypisierung transgen-positiver Mäuse (eNOS^{+/+}) stammten aus dem Tie-2-Promoter (Sense-Primer) sowie aus einer bovinen DNA-Sequenz die zur Konstruktion der transgenen Maus verwendet wurde (Antisense-Primer). Für die Untersuchung der Knockout-Tiere (eNOS^{-/-}) wurden zwei Primerpaare verwendet, welche die Neomycin-Kassette und die murine eNOS-DNA-Sequenz flankierten (siehe Tabelle 2.2-1).

Die Überprüfung der transgenen Konstrukte erfolgte durch transgen-spezifische PCR mit etwa 100-200 ng genomischer DNA, einer Primerkonzentration von 0,4 µM und dem „Mastermix 2,5x“ (Eppendorf, Hamburg). Die erfolgreiche Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenzen wurde anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft. Dafür wurde die amplifizierte DNA im Verhältnis 1:1 mit DNA-Auftragspuffer gemischt, im 2%-igen Agarosegel (mit Ethidiumbromid (0,5 µl/ml,) oder Gelred Nucleic Acid Stain (0,06 µl/ml; Biotium, Hayward) aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (30 min bei 90 V). Zur Größenbestimmung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde eine 100 Bp-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) im Gel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte bei 254 nm im UV-Transilluminator gegen die entsprechenden Laufstrecken der in der DNA-Leiter enthaltenen DNA-Fragmente.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.2-1 Genotypisierung der verwendeten transgenen Mauslinie: Primersequenzen, PCR-Mischungen und Amplifikationsbedingungen für die verwendeten Mauslinien.

	eNOS ^{+/+}	eNOS ^{-/-}	B2 ^{tg} (BK ^{+/+})	C101A-eNOS-tg (Mu ^{+/+})	
Primerpaare	<i>Sense</i>	5' - GGG AAGTCGCAAAGTTGT GAG -3'	5' - GCATCACCAGGAAGAAGACC - 3'		
	<i>Antisense</i>	5' - GCTCCCAGTTCTTCA CGC GAG -3'	5' - GAGCCATACAGATGGTTGCC - 3'	5'-TTGAAGAGTGTGGGCCAGGA-3' 5'-ACACCAGGGAGCCAGGGC-3'	
	<i>Sense</i>		(Neomycin-Kassette) 5'-CTCGACGTTGTC ACTGAAGC - 3'		
	<i>Antisense</i>	-	5'-TCAAGAAGGCGATAGAAGGC - 3'	-	
		(Murine eNOS DNA-Sequenz)			
Mastermix (2,5 x; Eppendorf, Hamburg)	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl	
Primermix (10 µM)	10 µl	10 µl	0,8 µl	0,8 µl	
MgCl ₂	1 µl	0,5 µl	-	-	
DNA (100-200 ng/µl)	1 µl	2,0 µl	1 µl	5 µl	
H ₂ O UP	18 µl	2,5 µl	13,2 µl	9,2 µl	
Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes	50 µl	25 µl	25 µl	25 µl	
Amplifikation	Denaturierung	95°C, 3 min	95°C, 3 min	94°C, 3 min	95°C, 3 min
	Amplifikation	94°C, 1 min	95°C, 1 min	94°C, 30 sec	94°C, 70 sec
	<i>Annealing</i>	55°C, 1 min	57°C, 1 min	60°C, 30 sec	54°C, 75 sec
	Elongation	72°C, 1 min	72°C, 1 min	60°C, 30 sec	72°C, 2 min 7 sec
		} 35 Zyklen	} 35 Zyklen	} 35 Zyklen	} 35 Zyklen

2.3 ZELLKULTUREN UND INKUBATION

Endothelzellen aus der Schweineaorta (PAEC, porcine aortic endothelial cells) wurden aus frisch entnommenen Schweineaorten isoliert und die murine cerebrale Endothelzelllinie bEND.3 wurde von ATCC (Teddington, Middlesex, UK) bezogen. Innerhalb von 7 bis 10 Tagen wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, wie bei Fox et al. (Fox *et al.*, 1996) beschrieben. Für alle Versuche wurden Zellen der Passage 2-3 (PAEC) und Passage 20-25 (bEND.3) verwendet. Zur Anzucht der Zellen wurde Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) verwendet, supplementiert mit 10% (v/v) fötalem Rinderserum (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) und 100 Einheiten/ml Penicillin/Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Die Inkubation erfolgte bei 37° C in Anwesenheit von 5% CO₂. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 24-28 verwendet.

Für die Inkubationsversuche wurden die Standardmedien ersetzt durch Medien ohne bovines Rinderserum und die Zellen wurden für 3 h mit dem NO-Donor DEA/NO inkubiert, sowie dem lange wirkenden NO-Donor DETA/NO (100 µM) für bis zu 24 h. Nach der Inkubation wurden die Zellen abgeschabt und durch Einfrieren, Auftauen und anschließendem Ultraschall für (15 min bei 4° C) in Lysepuffer homogenisiert.

2.3.1 ISOLIERUNG VON PORVINEN AORTENENDOTHELZELLEN

Zur Präparation von porvinen Aortenendothelzellen wurden Aorten von frisch geschlachteten, 7-9 Monate alten Schweinen beiderlei Geschlechts vom örtlichen Schlachthaus (Duisburg, Deutschland) bezogen. Die Aorta wurde in sterilen (autoklavierten) Kunststofftüten auf Eis transportiert, um die Integrität des Gewebes zu bewahren und um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden.

Für die Isolierung und Kultivierung von porvinen Aorten-Endothelzellen wurden zunächst die Aorten mit einer Schere vom anhaftenden Gewebe befreit. Danach wurden die äußeren Teile der Aorten mit Ethanol (80%) desinfiziert. Sämtliche Abzweigungen der Zwischenrippenarterien wurden mit Klammern geschlossen, und das Innere der Aorten wurde mit 20 ml PBS gespült, wobei die Spülflüssigkeit in einem Becherglas aufgefangen wurde. Für die schnelle, aber sanfte Lösung der Endothelzellen unter Vermeidung von Zellschäden wurde

10 ml Dispase in die Aorten injiziert, mit anschließender Inkubation (20 min., 37°C). Die Zellsuspension wurde anschließend in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen und es wurde mit 20 ml Kulturmedium M119 nachgespült. Nach Zentrifugation (200g, 5 min, RT) wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Sediment wurde in 15 ml M199 Kulturmedium aufgenommen, welches mit 10% FCS (**PAA** Laboratories, Cölbe, Deutschland) supplementiert war. Die Zellsuspension wurde dann in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche pipettiert. Für die Versuche wurde die 4. Passage verwendet.

2.3.2 BESTIMMUNG DER REAKTIVITÄT DES ENDOTHEL

Die Funktion des Endothels wurde durch den kumulativen Zusatz von Acetylcholin (0,01 bis 10 µM) überprüft, gemäß der Beschreibung von O'Driscoll (O'Driscoll *et al.*, 1999). Für einige Experimente wurde das Endothel entfernt durch sanftes Reiben der Intima-Oberfläche mit einem hölzernen Stöckchen (abweichend von der Beschreibung in Abschnitt 2.3.1). Nach der Konstriktion mit Phenylephrin (0,2 µM) in der Gegenwart oder Abwesenheit des Endothels oder L-Nitroarginin (L-NA, 100 µM), wurde Bradykinin (0,01 bis 10 µM) durch kumulative Applikation zugesetzt. Bei einigen der Präparationen erfolgte eine Prä-Inkubation mit dem B2-Antagonisten Icatibant (früher Hoe-140, 10 µM), sowie mit dem nicht-selektiven COX-Hemmer Diclofenac (10 µM).

2.4 PRÄPARATION UND ANALYSE VON PROTEINEN

Aus dem Gewebe von transgenen und nicht transgenen Mäusestämmen (dorsale Haut, Lunge, linker Herzventrikel), sowie aus den Zellsätzen porviner Aortenendothelzellen wurde die Proteinfraction isoliert zur anschließenden Untersuchung mittels Western-Blot.

2.4.1 PROTEINISOLIERUNG

2.4.1.1 Isolierung von Proteinen aus Geweben der Maus

Herstellung von Gewebehomogenaten

Die Herstellung von Homogenaten und Isolierung der Proteinfractionen für die Untersuchung der Proteinexpression im Western-Blot war identisch für die verschiedenen Gewebe der Maus (Haut, Lunge und linksventrikuläres myokardiales Gewebe).

Die gefrorenen Organe wurden zunächst in einem gefrorenen (zuvor in Stickstoff getränkten) Metallmörser pulverisiert und unmittelbar in kaltem Lysispuffer dispergiert, entsprechend der Menge des pulverisierten Gewebes. Zur Herstellung eines Gewebehomogenates wurde mittels eines Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen) für 10 min. auf höchster Stufe homogenisiert.

Isolierung der membranären Fraktion

Zur Isolierung der membranären Fraktionen für die Untersuchung des B2 wurden den Homogenaten äquivalente Mengen an Tris-HCl-Puffer (150 mM) zugesetzt und zentrifugiert (20000×g, 20 min, 4°C). Anschließend wurden die membranären Bestandteile von der zytosolischen Fraktion abgetrennt, indem das nach der Zentrifugation erhaltene Sediment in ? ml RIPA-Puffer aufgenommen und für 20 min bei 4°C extrahiert wurde. Danach wurde erneut zentrifugiert (20000×g, 20 min, 4°C) und anschließend wurden die Überstände ausaliquotiert.

2.4.1.2 Isolierung von Proteinen aus bEnd.3 Zellen

Zur Proteinisolierung aus der endothelialen bEnd.3 Zelllinie wurden die Zellen zweimalig mit 10 ml PBS (einfach, pH 7,4) gewaschen, und vorsichtig mit einem Zellkulturschaber von der Flaschenunterseite abgelöst. Nach Zentrifugation (200×g, 5 min) wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment in 1 ml PBS aufgenommen, erneut zentrifugiert (100×g, 5 min, RTp) und bei -80°C gelagert. Die Isolierung der membranären Fraktion erfolgte wie bereits beschrieben (s. 0).

2.4.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD

Der Bradford-Test diente der Bestimmung der Proteinkonzentration von Organ- und Zelllysaten und wurde nach der Methode von Marion Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt.

Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (Biorad, München) verändert seine ursprüngliche rot-braune Färbung im ungebundenen kationischen Zustand nach Komplexbildung mit Proteinen durch Absorptionsverschiebung. Durch die Komplexbildung wird es in seine blau unprotonierte anionische Sulfonatform überführt und stabilisiert. Die Bindung an den Proteinen erfolgt an unspezifische kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm verursacht. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist proportional zu der Menge an gebundenem Farbstoff und damit zu der Proteinkonzentration in der Probe. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde BSA (Sigma, München) in den Konzentrationen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bis $140 \mu\text{g ml}^{-1}$ in 5 mM Tris (pH 7,6) verwendet. Die Messungen wurden in Standard-VIS-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt und bei 595 nm im Spektrophotometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) gemessen. Hierfür wurde eine Mischung von 100 μl der zu messenden Proteinlösung mit 400 μl Bradford-Reagenz verwendet. Eine Mischung aus 100 μl Tris mit 400 μl Bradford-Reagenz wurde als Kontrolle verwendet.

2.4.3 WESTERN-BLOT

Tobin und Renard haben 1979 erstmalig die Western-Blot-Methode eingeführt, um die Proteinexpression zu analysieren (Renart, Reiser and Stark, 1979; Towbin, Staehelin and Gordon, 1979). Das Prinzip nach dem die Proteine aufgetrennt werden ist die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970; Maizel, Summers and Scharff, 1970). Die separierten Proteinbanden Komponenten werden anschließend auf eine Membran überführt und über eine Antikörperbindung direkt auf der Membran detektiert.

Die Proben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und abhängig von dem zu untersuchenden Protein entweder bei 95°C für 5 Minuten oder bei 70°C für 10 Minuten denaturiert. Die Gelmatrix, auf dem die Proben aufgetragen und aufgetrennt wurden, bestand aus einem weitporigen Sammelgel (4,5% Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1) und einem engporigen Trenngel (7,5%-12% Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1). Als Starter der Quervernetzung des Acrylamid und somit der Polymerisierung des Gels wurde 0,6 $\mu\text{l/ml}$ TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 0,8 $\mu\text{g/ml}$ Ammoniumpersulfat zugesetzt, wobei die zugesetzten Konzentrationen im Sammel- und Trenngel identisch waren.

Für die Gelelektrophorese bei 150 Volt wurden die Apparaturen der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Bei jeder Proteintrennung lief in einer Tasche ein farbmarkierter Protein-Größenstandard (Precision Plus, Bio-Rad, München) mit. Nach Eintritt der Proteine im

Sammelgel, erfolgte die Auftrennung im anschließenden Trenngel. Die nach Molekülgröße aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Blotting Apparatur (Bio-Rad, München) bei 100 V über 90 Minuten in kaltem Western-Blotting-Puffer geblottet. Die Proteine wurden entweder auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Porengröße 0,45 µM; Millipore, Schwalbach) oder eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,4 µM; Millipore, Schwalbach) überführt. Die Membranen wurden zuvor mit Methanol aktiviert und die unspezifischen Bindungsstellen eine Stunde lang entweder durch Blockingmilch (6% Milchpulver in TBST-Puffer; PVDF-Membran) oder durch Odyssey®-Blocking Puffer (Nitrocellulose-Membran) geblockt. Danach wurde dreimal für 5 min mit TBST (PVDF-Membran) oder PBST (Nitrocellulose-Membran) gewaschen. Die Detektion der spezifischen Bindungsstellen erfolgte nach Antikörperinkubation bei 4°C über Nacht. Gemäß den Angaben in der Tabelle 2.4-1, wurden verschiedene Primärantikörper für die Detektionen verwendet. Zur Standardisierung auf eine Ladekontrolle wurden die Membranen mit Anti-Aktin oder Anti-GAPDH-Antikörper inkubiert und vermessen.

Tabelle 2.4-1 Primär- und Sekundärantikörper zur Protein-Detektion im Westernblot: Bezeichnung, Quelle, Verdünnung und Hersteller.

	Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper	Anti-B2_MH	Maus/Human	1:2500	Abcam, Cambridge
	Anti-B2_M	Maus	1:1000	BD Transduction, Heidelberg
	Anti-B2_M	Kaninchen	1:2500	Abcam, Cambridge
	Anti-Actin	Kaninchen	1:5000	Sigma, München
	Anti-GAPDH	Maus	1:8000	Sigma, München
	Anti-AT2	Kaninchen	1:300	Milipore, Schwalbach
	Anti-AT2	Human	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
	Anti-eNOS	Maus	1:1000	BD Transduction, Heidelberg
Zweitantikörper	Anti-Maus	Maus	1:6000	Bio Rad, München
	Anti-rabbit IR Dye® 800 CW	Ziege	1:10000	Licor Biosciences, Bad Homburg
	Anti-mouse IR Dye® 680 LT	Ziege	1:10000	Licor Biosciences, Bad Homburg
	Anti-Kaninchen	Ziege	1:8000	Calbiochem, Darmstadt
	Anti-Ziege	Esel	1:8000	Santa Cruz, Heidelberg

2.4.3.1 Detektion der PVDF-Membran auf einem Röntgenfilm

Nach Inkubation mit einem Sekundärantikörper (s. Tabelle 2.4-1) für eine Stunde wurden die Membranen erneut vier Mal für je 5 min gewaschen und mit Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) oder SuperSignal® West Dura (Pierce, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers für 5 min inkubiert und die Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™, Amersham, Freiburg) detektiert. Die Filme wurden mit der Kamera eines Densitometers (Gel Doc™ 1000, Bio-Rad, München) fotografiert und die optische Dichte der Banden wurde mit Hilfe der Herstellersoftware Quantity One (Version 4.2.3., Bio-Rad, München) bestimmt. Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte durch Normalisierung auf die Kontrolle (100 %).

2.4.3.2 Detektion der Nitrocellulose-Membran mit dem Licor Odyssey® Fluoreszenzscanner

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (Licor Biosciences, Bad Homburg (s. Tabelle 2.4-1) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde 4 x 5 min in PBST gewaschen. Um die Reste des Tween 20 zu entfernen, wurde die Membran anschließend mit PBS gewaschen. Die Membranen wurden auf die Meßplatte des Licor Odyssey® gelegt und die Fluoreszenz mithilfe des Licor Odyssey® Fluoreszenzscanners detektiert. Die Application Software Version 3.0 (Licor Odyssey®, Licor Biosciences) diente zur Quantifizierung der Proteinexpression. Die Membranen wurden nach der Vermessung in PBST gelagert.

2.5 PRÄPARATION UND ANALYSE DER RNA

Nach der Isolierung und Quantifizierung der RNA aus unterschiedlichen Geweben und Zellen erfolgte die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription. Die dabei erzeugte cDNA wurde als Template verwendet für die anschließende Realtime-RT-PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression des Bradykinin-2-Rezeptors.

2.5.1 ISOLIERUNG DER RNA

2.5.1.1 *Tierische Gewebe*

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression bestimmter Gene in Mäusen erfolgte die Entnahme und Aufbereitung von Geweben der Lunge, des Herzens und der dorsalen Haut. Die Homogenisierung der Mausgewebe erfolgte mittels eines ausschließlich für die RNA – Isolierung eingesetzten Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen), wobei das RNeasy® Mini Kit für die RNA-Isolierung verwendet wurde. Die nachfolgend erwähnten Lösungen (mit Ausnahme der Proteinase K sind Bestandteile des RNeasy® Mini Kits und wurden daher nicht in dem entsprechenden Abschnitt (2.1, S. 55) aufgeführt.

Die in der RNA-Later® -Lösung tiefgefroren (-80°C) aufbewahrten Gewebeproben wurden zunächst mit kaltem, β -Mercaptoethanol enthaltenen denaturierenden RLT®-Lysispuffer versetzt und im Ultra-Turrax homogenisiert. Zwischen aufeinanderfolgenden Proben wurde der Ultra-Turrax stets mit 0,1%-iger NaOH-Lösung und Nuklease-freiem Wasser ausgespült.

Sobald keine Gewebestücke makroskopisch mehr erkennbar waren, wurden die Homogenate auf QiaShredder®-Säulen überführt und zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min). Der Überstand wurde anschließend mit 590 μ l Nuklease-freiem Wasser und 10 μ l QIAGEN® Proteinase K (Qiagen, Hilden) inkubiert (50°C, 10 min). Nach Zugabe des 0,5-fachen Ethanol-Volumens wurde der gesamte Ansatz auf eine RNeasy®-Säule transferiert und zentrifugiert (10.000 rpm). Bei diesem Schritt wurde die RNA in der Säule gebunden, der Überstand wurde daher anschließend verworfen. Danach wurde die Säule mit 350 μ l RW1 Puffer® gewaschen und zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min). Zum Abbau der DNA-Verunreinigungen wurde 80 μ l DNase-Mix (10 μ l DNase™ + 70 μ l RDD- Puffer™; Qiagen, Hilden) direkt auf die Säule pipettiert, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubationszeit. Zum Waschen der Säule und Aufreinigung der RNA wurde 350 μ l RW1 Puffer® auf die Säule eingebracht und anschließend zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min). Dieser Schritt wurde noch 2-mal wiederholt, unter Verwendung von je 500 μ l RPE Puffer®. Zur Elution der RNA wurde 30-50 μ l Nuklease-freies Wasser verwendet und anschließend zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min).

2.5.1.2 *Porvine Aortenendothelzellen (PAEC) und bEND.3 Zellen*

Die PAEC und bEND.3 Zellen wurden zunächst bis zu einer 80-90%-igen Konfluenz kultiviert. Nach Zugabe von 700 μ l kaltem Lysispuffer (RLT-Puffer® des RNeasy® Mini Kits + β -

Mercaptoethanol (1:10)) wurde die gleichmäßige Bedeckung des Zellrasens überprüft und die Zellen dann vorsichtig mit einem Kultur-Zellschaber (Neolab, Heidelberg) von der Flaschenunterseite abgelöst und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde solange resuspendiert bis alle Zellklumpen voneinander gelöst waren.

Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension auf QIAshredder® Säulen (Qiagen, Hilden) überführt und zentrifugiert (13.000 rpm, 2 min, RT). Der Überstand wurde mit 700 µl Ethanol (70%) versetzt und solange resuspendiert bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Von dieser Lösung wurden 700 µl auf eine RNeasy®-Säule aufgebracht und nach Herstellerangaben fortgefahren. Die RNA-Elution erfolgte mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Darmstadt) und einer Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min, RT), wobei dieser Schritt zur Erhöhung der Ausbeute wiederholt wurde.

2.5.2 BESTIMMUNG DER RNA-KONZENTRATION

Die Konzentration der RNA wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt mittels eines BioEppendorf Photometers (Eppendorf, Hamburg). Es wurden Proben verwendet deren OD 260/280 Quotient zwischen 1,8 und 2 lag.

2.5.3 cDNA-SYNTHESE

Die komplementäre DNA (cDNA) wurde unter Verwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, Weiterstadt) synthetisiert. Pro Ansatz wurde standardmäßig bis zu 2 µg RNA eingesetzt, wobei die Herstellerangaben zur Synthese der cDNA befolgt wurden. Die synthetisierte cDNA wurde danach als Matrizen-DNA in der Realtime-RT-PCR eingesetzt.

2.5.4 REALTIME-PCR

2.5.4.1 Grundlagen der Realtime-RT-PCR

Die Realtime-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und die eine zusätzliche Quantifizierung der amplifizierten DNA ermöglicht. Da sie meistens zur (relativen)

Quantifizierung von mRNA verwendet wird, erfolgt die Vervielfältigung erst nach der reversen Transkription, daher die Bezeichnung „RT-PCR“.

Das Prinzip der Realtime-PCR besteht in der Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen, die während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit (*real time*) erfasst werden. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der synthetisierten PCR-Produkte zu. Am Ende einer Realtime-PCR wird die Quantifizierung anhand der Fluoreszenzsignale der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Bei der DNA-Amplifizierung und gleichzeitigen Generierung der Fluoreszenzsignale ist die Kombination aus 5'-Nuklease-Aktivität der Taq Polymerase und der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) entscheidend. Ein Donor-Fluorochrom (Reporter) wird durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an ein in der Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt.

Dieses Prinzip ist auch bei den hier verwendeten TaqMan-Sonden vorhanden (TaqMan® Probe, Applied Biosystem, Weiterstadt), die an einem Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am anderen Ende mit einem Quencher (Akzeptor-Fluorochrom) (z. B. FAM und TAMRA) markiert wurden. Die Amplifikation mit diesen Sonden ist in Abbildung 2.5-1 dargestellt.

Die Sonde wird so hergestellt, dass sie am Matrizen-Strang hybridisiert, zwischen den Primern die zur DNA-Amplifikation eingesetzt werden. Wird nun für die Amplifikation eine Taq-Polymerase verwendet, die zusätzlich zur Polymerase-Aktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, dann wird die Sonde während der Gegenstrang-Synthese am 5'-Ende abgebaut. Somit entfernen sich Quencher und Reporter voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Somit steigt mit der Akkumulation des PCR-Produktes die Fluoreszenz des Reporters an, die in jedem Zyklus am Ende der Elongation gemessen wird. Dabei korrespondiert einem fluoreszenten Signal des Reporters eine neue und sequenzspezifische DNA-Kopie, weil es nur dann zur Fluoreszenz des Reporters kommt, wenn er durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase von der Sonde entfernt wurde und damit auch aus der räumlichen Nähe zum Quencher.

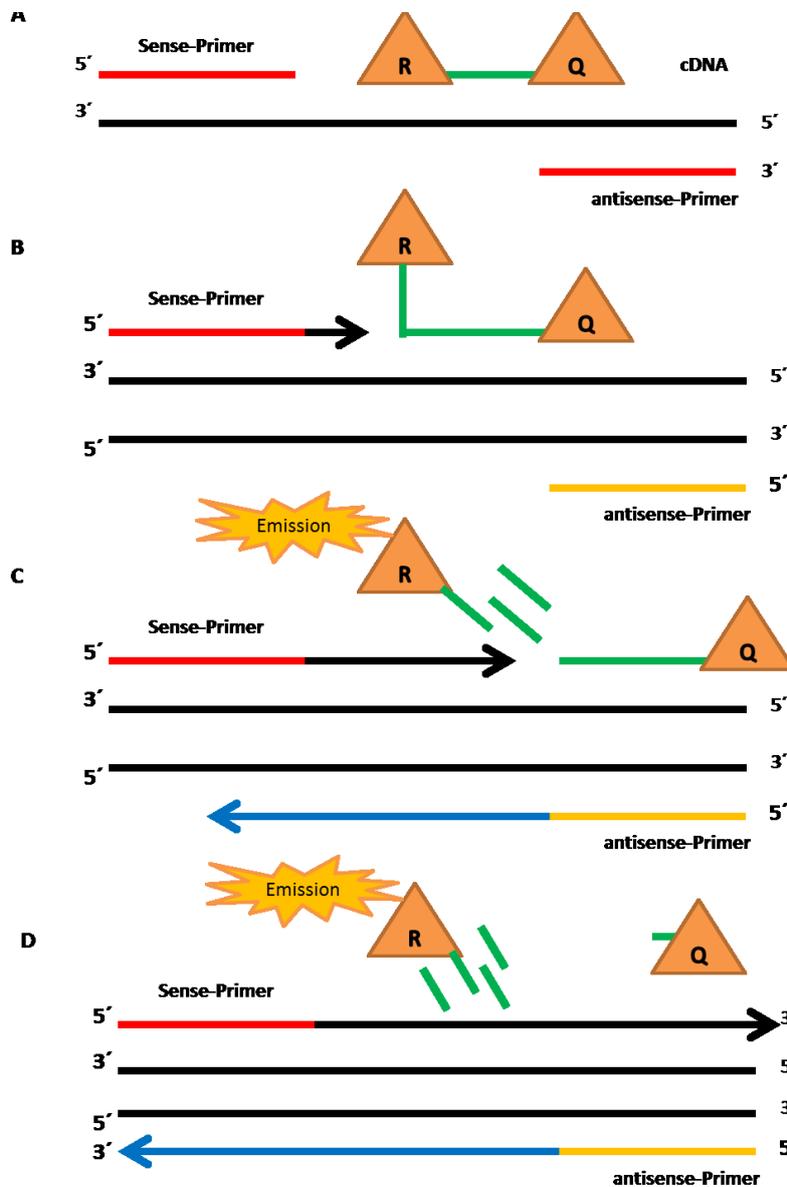


Abbildung 2.5-1. (A) Während der PCR-Reaktion bindet die TaqMan Sonde spezifisch an eine komplementäre Sequenz zwischen den komplementären Sequenzen beider primer. Bei einer intakten Sonde kommt es zur Unterdrückung der Fluoreszenz aufgrund der Nähe des Reporters zum Quencher (FRET). (B) Die DNA Polymerase synthetisiert den neuen Strang und (C) die Sonde wird durch die 5'-Nuclease –Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Somit wird der Reporter von der Sonde getrennt, und bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge (je nach Reporter-Fluorophor) kommt es zu einer erhöhten und messbaren Fluoreszenz-Emission des Reporters. (D) Nach jeweils einer vollendeten Polymerisation entsteht ein Reportersignal für jede neu entstehende sequenzspezifische DNA Kopie.

2.5.4.2 Realtime-RT-PCR der B2 mRNA Expression

Die Quantifizierung der mRNA-Expression des Bradykinin-2-Rezeptors erfolgte mittels der Realtime-RT-PCR, wobei für B2 und das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen hprt1 (Hypoxanthin-guanin Phosphoribosyltransferase) das TaqMan® Gene Expression System (Mm01339967_m1 und Mm00446968, Applied Biosystems/Life Technologies) verwendet wurde. Der Realtime-RT-PCR-Lauf erfolgte in dem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Weiterstadt).

Tabelle 2.5-1 Detektion der mRNA-Expression der Gene B2 und HPRT mittels der Realtime-RT-PCR-Methode.

	B2	Hprt1
TaqMan Gene Expression Assay	Hs00176121	Mm00446968
Amplikon	99 bp	65 bp
Exon	2-3 bp	6-7 bp
Realtime RT-PCR-Mischung	20x TaqMan® Gene Expression Assay	1 µl
	2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl
	Primer (10 µM)	0,4 µl
	Sonde (10 µM)	0,2 µl
	cDNA template (100 bis 500 ng)	9 µl
	Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes	20 µl
PCR	Polymerase-Aktivierung	95°C, 10 min
	Denaturierung	95°C, 15 sec
	Annealing/Elongation	60°C, 1 min
	} 50 Zyklen	

2.5.4.3 Relative Quantifizierung der mRNA Expression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Zur Standardisierung der Expression von B2 wurde das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen hprt1 koamplifiziert und zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde die vergleichende $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Dabei wurden zunächst die Zyklen bestimmt, bei sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt (C_T -Werte, Threshold-Cycle). Je niedriger der C_T -Wert ist, d.h. je früher sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundstrahlung abhebt, umso höher ist die im Reaktionsgemisch enthaltene Zahl der Kopien des Zielgens zu Beginn der Reaktion.

Folgende Formeln wurden verwendet:

$$C_t (\text{gesuchtes Gen, B2}) - C_t (\text{interne Kontrolle, HPRT1}) = \Delta C_t$$

$$\Delta C_t (\text{Behandelte Zellen}) - \Delta C_t (\text{Unbehandelte Zellen}) = \Delta \Delta C_t$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

2.6 MILES ASSAY

2.6.1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Der Miles Assay ist eine Untersuchungsmethode zur Erfassung der endothelialen Permeabilität von Mäusen als Versuchstiermodell. Evans blue (Abbildung 2.6-1) ist ein Albumin -bindender Farbstoff. Unter physiologischen Bedingungen ist ein intaktes Endothel undurchlässig für Albumin, somit wird das an Evans blue gebundene Albumin im Blutgefäß zurückgehalten. Ein intaktes Endothel verhindert die Extravasation des Farbstoffs in das benachbarte Gewebe. Unter pathologischen Bedingungen, die mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität einhergehen, verlieren die Endothelzellen teilweise ihren engen Kontakt zueinander und das Endothel wird durchlässig für kleine Proteine wie z.B. Albumin. In diesem Zustand ist auch die Extravasation des an Albumin gebundenen Evans blue in das Gewebe möglich. Organe mit erhöhter Durchlässigkeit zeigen daher eine deutlich erhöhte Blaufärbung im Vergleich zu Organen mit intaktem Endothel. Das Ausmaß der Gefäßpermeabilität kann dann durch einfache Visualisierung oder durch quantitative Messung des Farbstoffgehaltes pro Milligramm Gewebe gemessen werden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Bei diesem Test handelt es sich um eine besonders einfache quantitative Methode, zumal der Farbstoff aus dem Gewebe nach Inkubation mit Formamid extrahiert werden kann. Das Absorptionsmaximum von Evans Blue liegt bei 620 nm. Durch Verwendung einer Standardkurve für Evans Blue werden dann die gemessenen Werte der Absorption in mg Farbstoff pro mg Gewebe umgewandelt. Signifikante Unterschiede der Gefäßpermeabilität werden anschließend mittels statistischer Analyse beurteilt (Radu and Chernoff, 2013).

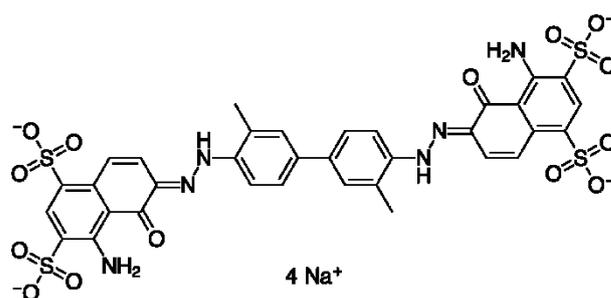


Abbildung 2.6-1 Strukturformel von Evans Blue

2.6.2 DURCHFÜHRUNG

Permeabilitätsmessungen wurden nach intravenöser und intradermaler Verabreichung verschiedene Wirkstoffe durchgeführt:

- i.d. Bradykinin 30 μ l (2 nmol)
Histamin 30 μ l (2 nmol)
Labradimil 30 μ l 2 nmol)
- i.v. Icatibant 100 μ g/kg KG
L-NAME 16 mg/kg KG
Diclofenac 5 mg/kg KG

Bei allen Versuchen wurde PBS als Kontrolle injiziert. Die verwendeten Mäuselinien sind nachfolgend aufgeführt:

- C57BL/6
- eNOS^{-/-} KO (transgene eNOS Knockout Maus)
- C101A-eNOS-tg Maus (Mu⁺⁺ Maus)
- B2^{tg} Maus (BK⁺⁺ Maus)

Nach Anästhesie der 8-12 Wochen alten männlichen Tiere mittels intraperitonealer Verabreichung von Rompun® (Xylazin 5 mg/kg KG; Bayer) und Ketavet® (Ketamin 100 mg/kg KG; Pfizer) wurde Evans Blue (30 mg/kg KG, gelöst in 100 μ l PBS; Sigma) in die Schwanzvene injiziert (27 G Nadel/1ml Spritze). Während der 20-minütigen Einwirkzeit wurden Rückenhaare rasiert (Abbildung 2.6-2-A). Die restlichen Haare wurden mit einer Enthaarungscreme entfernt (ISANA sensitiv, Rossmann) (Abbildung 2.6-2-B). Anschließend wurden intradermal jeweils 30

μl 100 μM Bradykinin, Histamin oder Labradimil injiziert, wobei PBS (30 μl) als Kontrolle verwendet wurde.

In einigen Experimenten wurden C57BL/6 Mäuse vorbehandelt, wobei den Tieren an 2 aufeinander folgenden Tagen jeweils eine Injektion (i.v.) Icatibant, L-NAME, Diclofenac bzw. 100 μl PBS (Vehikel) in den oben angegebenen Konzentrationen verabreicht wurde. Danach wurden die Tiere in den vorhin beschriebenen Akutversuch überführt.

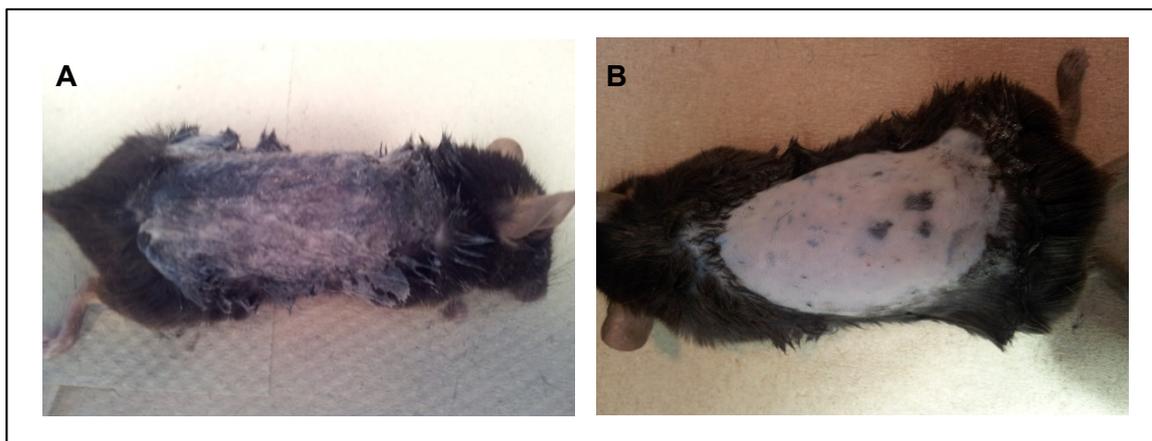


Abbildung 2.6-2 Anästhesierte Mäuse nach dem Rasieren (A) und Enthaaren (B).

Die Euthanasie der Tiere durch zervikale Dislokation erfolgte 30 min nach der intradermalen Injektion. Die dorsale Haut wurde zur Quantifizierung der Extravasation präpariert, und umgedreht (Abbildung 2.6-3-A). Die Stellen der intradermalen Injektion wurden dann mit einer Stanze (9mm Durchmesser) ausgestanzt (Abbildung 2.6-3-B) und gewogen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) überführt. Nach Zugabe von N,N-Dimethylformamid (Sigma) wurde Evans Blue aus den Hautstücken extrahiert (24 Stunden bei 56 °C und 750 rpm in einem Eppendorf Thermomixer comfort) und photometrisch bei 620 nm in einem Beckman DV 640 Spectrometer unter Verwendung einer Glasküvette OS 1000 bestimmt. Die Menge des in die Haut permeierte Evans Blue wurde anhand einer Standardkurve quantifiziert.

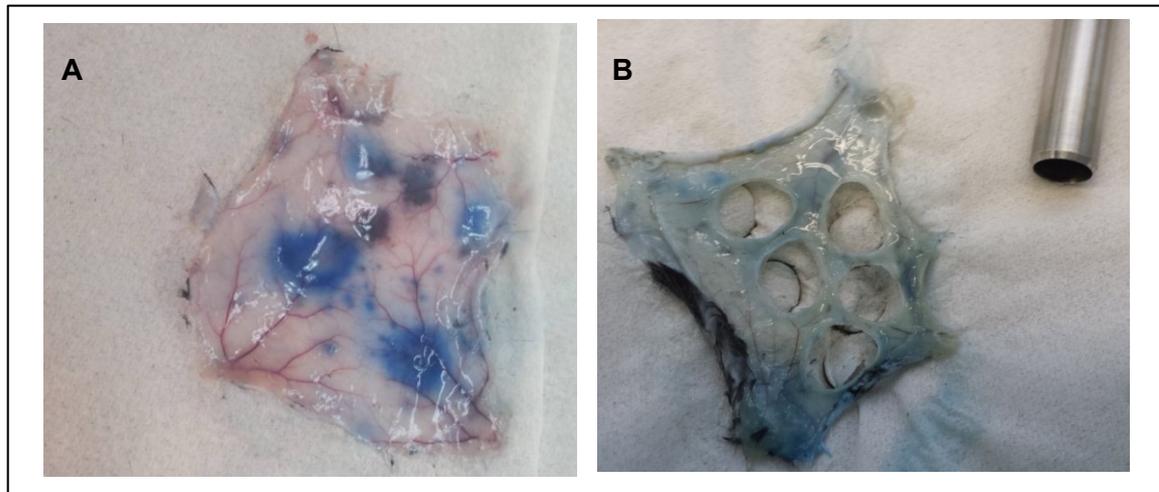


Abbildung 2.6-3 (A) Ausgeschnittene und umgedrehte dorsale Haut mit Evans Blue Extravasation. (B) Zustand nach dem Ausstanzen der Bereiche in denen Evans Blue in das umliegende Gewebe ausgetreten ist.

2.6.3 STANDARDKURVE

Die Menge Evans blue in den experimentellen Proben wurde durch Interpolation aus einer Standardkurve berechnet. Dafür wurde zunächst eine Stammlösung (30 mg/ml) hergestellt, die dann 1:1000 mit Formamid verdünnt wurde (30 µg/ml Evans blue).

Für die höchste Konzentration der Standardkurve (12,9 µg/ml) wurden 430 µl der verdünnten Stammlösung (30 µg/ml) zu 570 µl Formamid pipettiert. Danach wurden 500 µl der hergestellten Lösung (12,9 µg/ml) zu 500 µl Formamid pipettiert. Im weiteren Verlauf wurden jeweils 2-fache Verdünnungen hergestellt, indem 500 µl der höher konzentrierten Evans blue Lösung mit 500 µl Formamid gemischt wurde. Somit wurde die Standardkurve mit 8 Evans blue-Konzentrationen hergestellt (12,9 µg/ml, 6,45 µg/ml, 3,225 µg/ml, 1,6125 µg/ml, 0,806 µg/ml, 0,403 µg/ml, 0,2015 µg/ml und 0,1 µg/ml). In Abbildung 2.6-4 wird beispielhaft eine Standardkurve gezeigt.

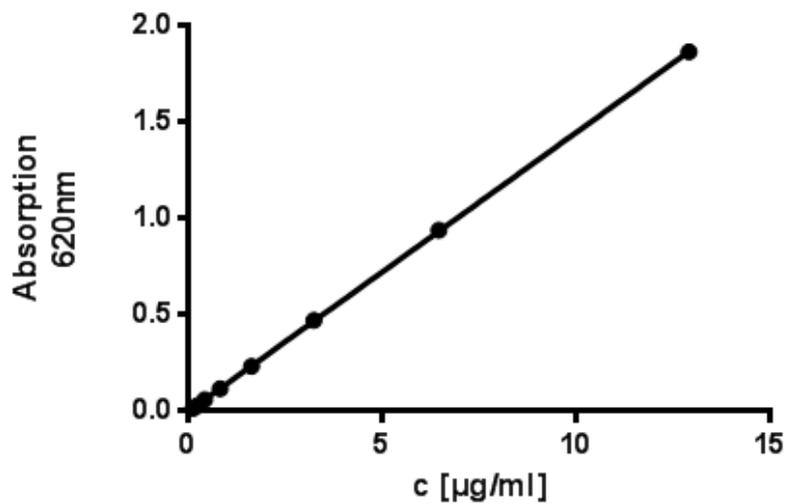


Abbildung 2.6-4 Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration von Evans Blue in den ausgestanzten Hautstücken

2.7 DEGLYKOSYLIERUNG

Für die Deglykosylierung wurden 5 µl von dem 10x Deglykosylierungspuffer zu 45 µl klarem Zelllysate hinzugegeben und 10 Minuten bei 80 °C denaturiert. Nach der Zugabe von 1 Einheit des Enzyms N-glycosidase F (Sigma), wurden die Proben für 2 Stunden bei 37 °C ohne zu schütteln und mischen mit 1x LDS Probenpuffer inkubiert.

2.8 CALCIUM-ASSAY

Die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde mittels des Ca^{2+} Assays gemessen. Hierfür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1/AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet.

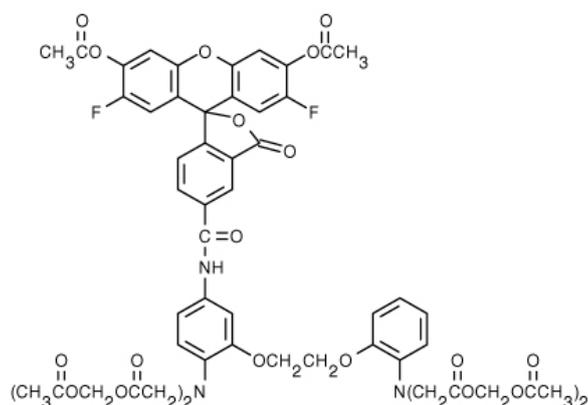


Abbildung 2.8-1 Strukturformel von Oregon Green® 488 BAPTA-1, AM (Summenformel: $C_{59}H_{53}F_2N_3O_{26}$; Molekülmasse: 1258,07).

Der Farbstoff Oregon Green® (OG, Abbildung 2.8-1) ist membrangängig und enthält mit BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N',N',N'-tetraacetic acid), eine Ca^{2+} -komplexierende Komponente. Die Carbonsäurereste des OG liegen zunächst acetoxymethyliert vor zur verbesserten membrangängigkeit des Farbstoffs. Nach passiver Diffusion des OG durch die Zellmembran werden die Acetoxymethylester durch unspezifische Esterasen gespalten. Der Farbstoff wird hydrophiler und kann die Zelle nicht mehr verlassen. Die Komplexbildung mit Ca^{2+} erhöht die Fluoreszenzemission des Farbstoffs proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Aus dem Anstieg der Fluoreszenz kann so direkt auf den Grad an Komplexbildung und damit die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration geschlossen werden.

Der Ca^{2+} -Assay wurde mit dem NOVOstar® Microplate Reader mit integriertem Pipettiersystem durchgeführt. Je nach Versuch wurde der Agonist Bradykinin (10 nM – 1 mM), der Antagonist Icatibant (0 – 100 μ M) bzw. der NO-Donor DEA/NO (10 μ M) verwendet. ATP (10 μ M) wurde als initiale Kontrolle der zellulären Ca^{2+} -Reaktion eingesetzt. bEnd3-Zellen wurden auf 96-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden (Messplatten) mit einer Zelldichte von 20.000-30.000 Zellen pro *well* aufgebracht. Nach 24 Stunden wurde der Zellrasen mit 3ml K_2HPO_4 (Roth) gewaschen oder je nach Experiment mit Arzneistoff inkubiert und erst danach gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 20 μ l einer 1,5 M OG-Lösung im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) eine Stunde lang inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Reagenzienplatten (96-Well-Zellkulturplatten mit rundem Boden) zu 80 μ l (Agonistplatte) bzw. 40 μ l (Antagonistenplatte) pro *well* vorpipettiert. Aufgrund eines 1+9-Verdünnungsschritts von den Reagenzien- auf die Meßplatten, wurden alle Lösungen 10-fach höher konzentriert. Nach Inkubation mit OG wurde der Farbstoff abgesaugt und je nach Modus wurde 160 μ l (Antagonistmodus) bzw. 180 μ l

(Agonistmodus) K_2HPO_4 zugesetzt. Im Antagonistenmodus wurden an dieser Stelle 20 μ l Antagonistenlösung pro *well* aus der Antagonistenplatte auf die Messplatte pipettiert und preinkubiert (20 Minuten bei 37°C). Im Agonistenmodus entfiel dieser Schritt. Danach wurde die Messplatte im NOVOstar® für weitere 15 Minuten unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Messung der Fluoreszenz gestartet. Während der Messung wurden 20 μ l der Agonistenlösung aus der Agonistenplatte über das Pipettiersystem aufgezogen und in das jeweilige *well* der Messplatte injiziert. Die Fluoreszenz wurde bei 520 nm (Bandbreite 25 nm) gemessen.

Für die Konzentrations-Wirkungskurven wurde Bradykinin zugesetzt (10 nM – 1 mM), nach Behandlung mit der Vehikel-Lösung KHP, Icatibant (30 min) oder DEA/NO (3 h). Als anfängliche Kontrolle der zellulären Ca^{2+} -Wirkung wurde ATP (10 μ M) zugesetzt.

2.9 ZWEI-PHOTONEN MIKROSKOPIE

Bildgebungstechniken wie Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Positronen-Emissions-Tomografie oder Ultraschall ermöglichen die nicht-invasive Darstellung funktionaler und struktureller Aspekte. Die räumliche Auflösung dieser Verfahren ermöglicht jedoch keine Visualisierung subzellulärer Strukturen. Zudem ist eine auf den unterschiedlichen molekularen Eigenschaften beruhende Visualisierung auch nicht möglich. Mittels der optischen Fluoreszenzmikroskopie wurden diese Nachteile überwunden, wobei die subzelluläre Auflösung (<1 μ m) mit hoher Empfindlichkeit und molekularer Selektivität für spezifische Strukturen kombiniert wurden.

Bei den klassischen fluoreszenzoptischen Verfahren ist jedoch eine Beobachtung von Strukturen in intakten lebensfähigen Proben nicht möglich. Erst durch die Kombination von Multiphotonentechnik und Intravitalmikroskopie wurde es möglich, Interaktionen von Geweben und Zellen *in vivo* unter physiologischen Bedingungen über verschiedene Zeiträume zu beobachten (Cahalan *et al.*, 2002). Die physikalischen Grundlagen des Zwei-Photonen-Effekts wurden bereits in den 30iger Jahren von Maria Goebbert-Mayer theoretisch beschrieben (Grzybowski and Pietrzak), die praktische Umsetzung für die Mikroskopie erfolgte jedoch erst in den 90 er Jahren durch Denk und Stricker (Denk, Strickler and Webb, 1990).

Das physikalische Prinzip eines 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop (Two-Photon Laser Scanning Microscope, TPLSM) ähnelt dem der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, bei der ein Laser die Oberfläche der eingestellten Ebene abtastet. Dabei werden die Lichtintensitäten des reflektierten oder durch Fluoreszenz abgegebenen Lichtes nacheinander

an allen Orten des abzubildenden Bereiches gemessen, so dass eine anschließende Rekonstruktion des Bildes möglich ist. Die dabei erzeugten digitalen Bilder werden in einem Computer zusammengesetzt und können in Echtzeit beobachtet werden (Potter, 1996). Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wird jedoch nur eine Eindringtiefe von 50–80 µm erzielt (je nach Präparat).

Bei TPLSM wird rotverschobenes Anregungslicht verwendet, welches auch Fluoreszenzfarbstoffe anregen kann. Für jede Anregung werden zwei Photonen Infrarotlicht absorbiert, wobei die Verwendung von Infrarotlicht die Streuung des Lichts im Gewebe minimiert. Aufgrund der Mehrphotonenabsorption kommt es zu einer effektiven Unterdrückung von Hintergrundsignalen, was mit einer effizienten Lichtdetektion und reduzierten Phototoxizität verbunden ist, vor allem aber auch eine wesentlich tiefere Gewebepenetration ermöglicht, bis zu 1000 µm (Denk, Strickler and Webb, 1990; Theer, Hasan and Denk, 2003). Die Kombination all dieser Merkmale stellt TPLSM über mikroskopischen Techniken zur dreidimensionalen Visualisierung von tiefer liegenden Strukturen im lebendigen Gewebe.

Zur Visualisierung der Gefäßdurchblutung wurden die 8-12 Wochen alten männlichen Tiere der Mäuselinien B2^{tg} und B2ⁿ mittels intraperitonealer Verabreichung von Rompun (5 mg/kg KG; Bayer) und Ketavet (100 mg/kg KG; Pfizer) anästhesiert. Danach wurde den Versuchstieren zunächst der Farbstoff FITC-Dextran (MW 2,000,000, Sigma-Aldrich) in die Schwanzvene injiziert (20 mg/kg/KG, gelöst in 50µl 0,9% NaCl (Braun)). Die Injektion erfolgte mittels eines selbst angefertigten Katheters, bestehend aus einem 20 cm langen Schlauch, an dessen Spitze eine BD Microlance Kanüle 30 G befestigt wurde. Das andere Ende des Schlauches wurde mit einer 1ml Insulin Spritze verbunden, gemäß der Darstellung in Abbildung 2.9-1.

Das Ohrläppchen wurde mit Gewebekleber fixiert und ein Deckglas wurde mittels zweier Magneten auf dem Ohrläppchen befestigt. Die Photomultiplier wurden auf die jeweiligen Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome eingestellt (FITC: 495 - 530 nm; Alexa594-Dextran: 590 - 650nm). Das Ohrläppchen wurde zunächst mit Laserlicht der Wellenlänge bestrahlt, um alle 60 Sekunden das Signal des nicht gewebedurchlässigen grünen Fluorochroms FITC über einen Zeitraum von 30 min. zu registrieren. Anschließend wurde der gewebedurchlässige Farbstoff Alexa594-Dextran (MW 10.000 Thermo Fisher) in der oben beschriebenen Weise in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert (5 mg/kg/KG, gelöst in 50µl 0,9% NaCl (Braun)) und das emittierte Fluoreszenzsignal wurde in der gleichen Weise aufgezeichnet.

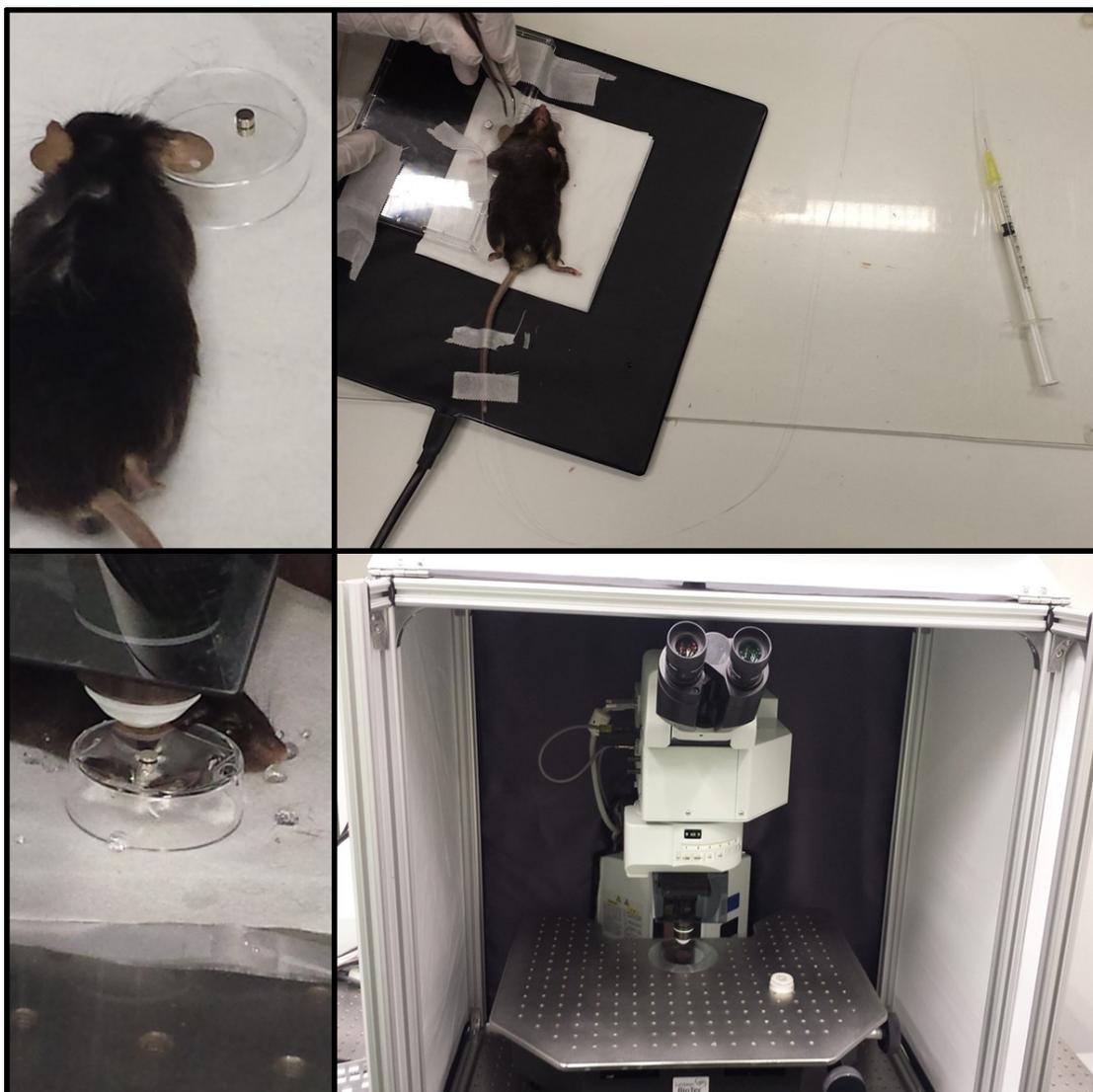


Abbildung 2.9-1 Die anästhesierten Versuchstiere wurden auf dem Objektträger präpariert, wobei das Ohrfläppchen mit Gewebekleber fixiert wurde und ein Deckglas darüber mittels zweier Magneten befestigt wurde. Die Injektion von FITC-Dextran (20 mg/kg/KG, gelöst in 50µl 0,9% NaCl) und Alexa594-Dextran (5 mg/kg/KG, gelöst in 50µl 0,9% NaCl) erfolgte mittels eines selbst angefertigten Katheters, bestehend aus einem 20 cm langen Schlauch, an dessen Spitze eine BD Microlance Kanüle 30 G befestigt wurde. Das andere Ende des Schlauches wurde mit einer 1 ml Insulin Spritze verbunden.

2.10 STATISTIK

Alle Daten wurden durch Standard-Computerprogramme analysiert (GraphPad Prism PC Software, Version 3.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA, Varianzanalyse ANOVA). Die Ergebnisse molekularbiologischer Versuchsreihen sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben, wobei n sich auf die Anzahl der

Einzelversuche bezieht. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bzw. einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Tukey-Test). Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet. Bei einem Vergleich mit mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls-Test durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 REGULATION DES B2-REZEPTORS DURCH NO

3.1.1 VALIDIERUNG VERSCHIEDENER ANTI-B2-ANTIKÖRPER

Zur Bewertung der Spezifität der beiden B2 Antikörper bezüglich deren Bindung an B2 in Zelllinien und Mäusegewebe, wurden verschiedene Western-Blot-Experimente durchgeführt. Der monoklonale Maus- Antikörper B2_M (BD Transduction, Heidelberg) bindet an nicht-glykosylierte B2 und sollte eine Doppelbande bei ungefähr 42 kD zeigen, während der entsprechende monoklonale Antikörper aus Kaninchen B2_K (Abcam) an glykosyliertem B2 bindet; bei Bindung sollte eine einzelne Bande bei etwa 72 kD nachweisbar sein. Die Inkubation von bEnd.3 Zellen mit 10 μ M DEA/NO für 3 h hat das Signal des B2_M nicht verändert (Abbildung 3.1-1 A) und ähnliche Ergebnisse wurden erzielt für porcine Aortenendothelzellen (PAEC) (Abbildung 3.1-1 B) und in bEnd.3 mit dem Kaninchen-AK B2_K (Abbildung 3.1-1 C). Im Gegensatz dazu kam es bei Verwendung von B2_K zu keinem Signal im Bereich von 72 kD (Abbildung 3.1-1-D), was möglicherweise auf eine Variation bei der Arten-Spezifität hinweist. Dennoch zeigten beide Antikörper vergleichbare Ergebnisse in der bEnd.3 Zelllinie.

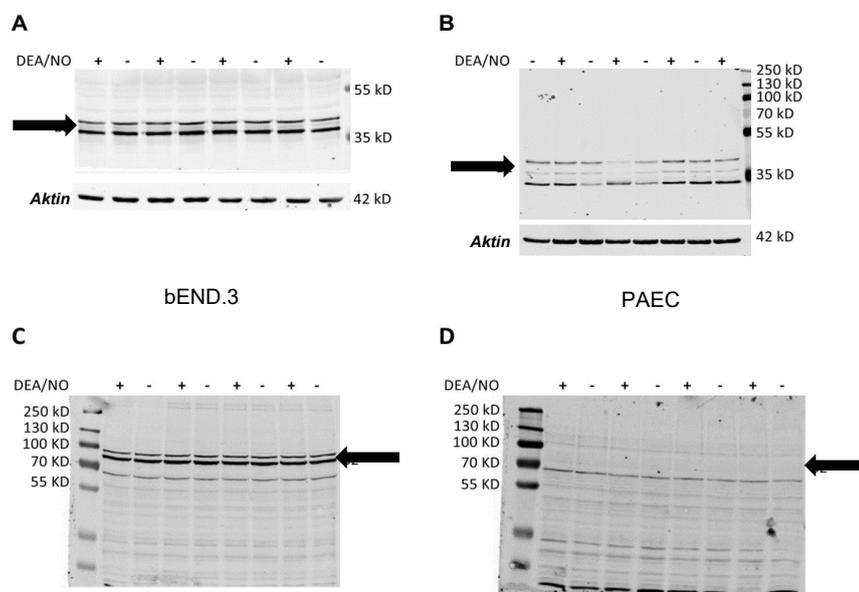


Abbildung 3.1-1 Western-blots zur Validierung verschiedener anti-B2-Antikörper in den Zelllinien bEND.3 (A, C) und PAEC (B, D) Zelllinien, mit (+) oder ohne (-) einer vorherigen 3-stündigen Inkubation mit 10 μ M DEA/NO, bei Verwendung des monoklonalen Maus-AK B2_M (A, B) und des monoklonalen Kaninchen-AK B2_K (C, D). Die Pfeile zeigen die vorhandene (A, B, C) bzw. fehlende (D) Bande der gebundenen AK, nämlich 42 kD bei B2_M (A, B) und 72 kD bei B2_K (C, D). Es handelte sich hierbei um Vorversuche zur Validierung der Antikörper, daher wurden die Ergebnisse nicht quantifiziert.

Überraschenderweise wurde das Signal des Maus-AK B2_M unterhalb von 42 kD gefunden (Abbildung 3.1-1 A und B). Dieses Ergebnis wurde anschließend im Lungengewebe von C57BL/6, eNOS^{-/-} und B2^{-/-} Mäusen überprüft, unter Verwendung einer Protein-Leiter die ein 40 kD-Protein enthielt.

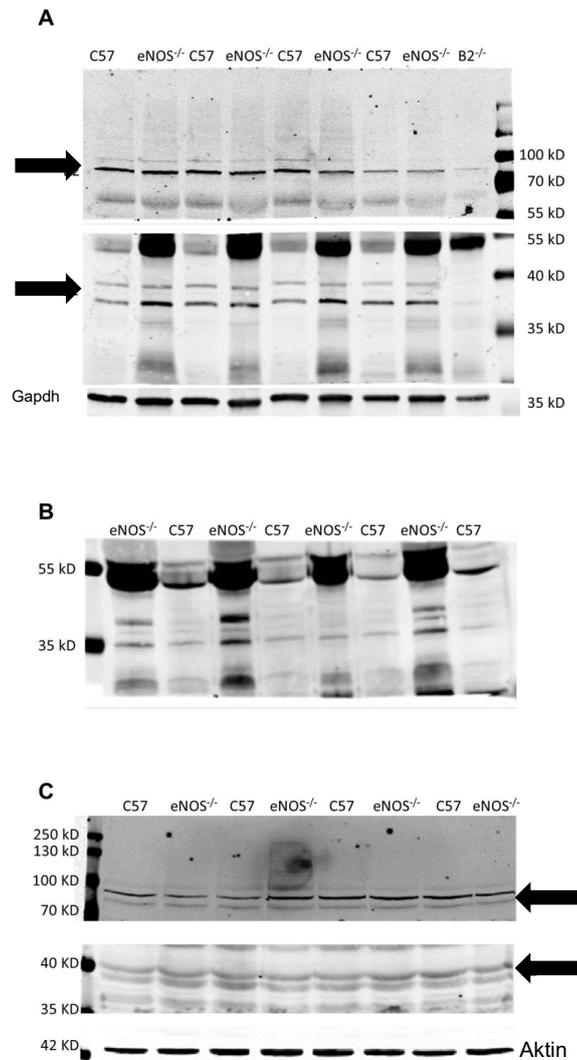


Abbildung 3.1-2 Fluoreszenz-Muster der Western-blots mit Zellaufschlüssen aus Lungengewebe (A, B) und dorsalem Hautgewebe (C) der Mauslinien C57BL/6 (C57), eNOS^{-/-} und B2^{-/-}, bei Verwendung von monoklonaler Maus-AK B2_M (A, B, C) und Kaninchen-AK B2_K (A, C). Die Pfeile weisen auf die Bande der gebundenen AK, nämlich 42 kD bei B2_M und 72 kD bei B2_K (A, C). (A) Färbemuster mit den monoklonalen Kaninchen-AK B2_K (oben) und Maus-AK B2_M (Mitte). Der blot wurde bei 55 kD zerschnitten und der mittlere Teil wurde als Streifen verwendet, um den Gesamtanteil an Proteinen zu verringern. (B) Färbemuster mit den anti-Maus IgG Antikörper. Der anti-Kaninchen IgG Antikörper zeigte kein Signal und der entsprechende *blot* ist daher nicht gezeigt. Es handelte sich hierbei um Vorversuche zur Validierung der Antikörper, daher wurden die Ergebnisse nicht quantifiziert. (C) Färbemuster mit den monoklonalen Kaninchen-AK B2_K (oben) und Maus-AK B2_M (Mitte). Der *blot* wurde bei 55 kD zerschnitten und der mittlere Teil wurde als Streifen verwendet, um den Gesamtanteil an Proteinen zu verringern. Diese Blots wurden quantifiziert und in die Endergebnisse einbezogen.

Die Abbildung 3.1-2-A und Abbildung 3.1-2-C stammen vom gleichen blot, der für den Nachweis beider AK verwendet wurde und der bei 55 kD zerschnitten wurde. Die *blots* der mittleren Bereiche der Abbildungen Abbildung 3.1-2-A und Abbildung 3.1-2-C wurden ausgeschnitten und mit einem monoklonalen anti-GAPDH Maus-AK (Abbildung 3.1-2-A, unterer Bereich) anti-Aktin Maus-AK (Abbildung 3.1-2-C, unterer Bereich) inkubiert, um die gesamte Proteinmenge abzuschätzen. Während der Kaninchen-AK B2_K ein eindeutiges erwartetes Signal bei 72 kD zeigte, befand sich die Doppelbande des Maus-AK B2_M bei 38 kD, wie bereits bei den Western-blots mit den Zelllinien bEND.3 und PAEC gezeigt wurde, und somit erneut unterhalb der erwarteten Proteingröße von 42 kD (mittlere Bereiche der Abbildung 3.1-2-A und C). In den Zellaufschlüssen aus Lungengewebe von B2^{-/-} Mäuselinien waren die Signale beider Antikörper stark verringert. Dementsprechend zeigen beide AK eine gute, wenn auch nicht vollständige Spezifität für das B2 Protein.

Allerdings zeigt der Maus-AK B2_M ein wesentlich intensiveres Signal in eNOS^{-/-} Mäusen. Dies wurde in allen Proben beobachtet und ist als Hinweis auf unspezifische Färbung zu werten, verursacht durch die Bindung des sekundären Anti-Maus IgG Antikörpers. Das gleiche Muster kann auch in der Abbildung 3.1-2-B beobachtet werden, obwohl hier der *blot* nur mit dem Anti-Maus IgG Antikörpers inkubiert wurde. Zudem sind derartig intensivere Signale nicht mit dem monoklonalen Kaninchen-AK B2_K beobachtet worden (Abbildung 3.1-2-A und C, jeweils obere Abschnitte). Angesichts dieser Ergebnisse ist die Anwendung des monoklonalen Maus-AK B2_M für den Nachweis des B2 in eNOS^{-/-} Mäusen nicht geeignet. Es ist jedoch zu bemerken, dass eine derartige fälschliche Färbung im Lungengewebe von B2^{-/-} Mäusen nicht zu beobachten war (Abbildung 3.1-2-A).

3.1.2 DER EINFLUSS VON NO AUF DIE ENDOTHELIALE B2 EXPRESSION IN KULTIVIERTEN ZELLEN

3.1.2.1 Untersuchungen in porcinen Endothelzellen aus der Aorta (PAEC)

Effekt von DEA/NO auf die Bradykinin-B2-Rezeptor Expression

Um den Einfluss von NO auf Endothelzellen aus der Schweineaorta (PAEC) zu untersuchen, wurden die präparierten Zellen für 3 h mit 10 μ M des NO Donors DEA/NO inkubiert (s. 0). Die anschließende Western-Blot Analyse mit dem Maus-Antikörper B2_M (

Abbildung 3.1-3) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P=0,3028$) zwischen den relativen Fluoreszenzeinheiten, der mit DEA/NO behandelten Zellen ($97,61 \pm 13,63\%$, $n=8$) und der unbehandelten Zellen (Vehikelkontrollösung; 100%, $n=8$).

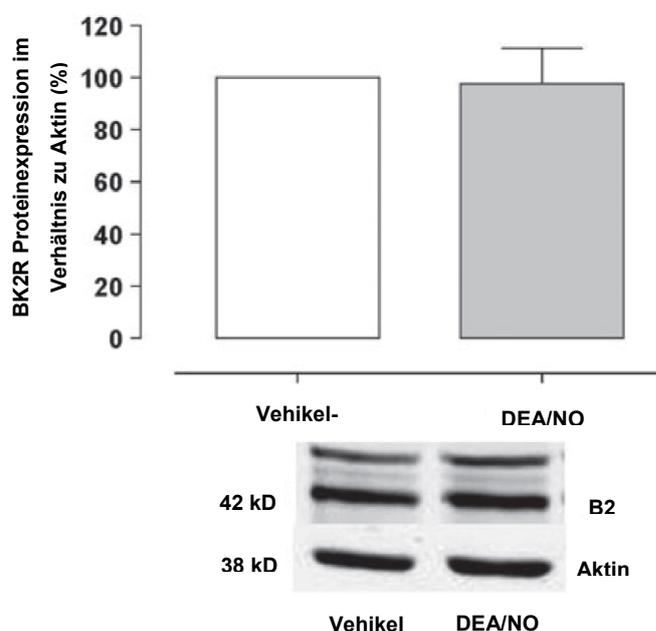


Abbildung 3.1-3 Einfluss von NO auf die B2 Proteinexpression in PAEC endothelialen Zellen. Repräsentative Western-Blots der Proteinexpression, nach Inkubation mit dem NO Donor DEA/NO (10 μ M, 3 h) und unter Verwendung des Maus-Antikörpers B2_M. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n=8$).

Effekt von Bradykinin auf die Proteinexpression des Bradykinin-2 Rezeptors

Um den Wirkung von Bradykinin auf die Proteinexpression des B2 zu erfassen, wurden die Zellen für 3 Stunden mit Bradykinin (100 μ M) inkubiert. Die Ergebnisse (Abbildung 3.1-4) zeigen, dass es bei Behandlung mit Bradykinin (100 μ M) zu einer leichten Erhöhung der Expression des B2 kommt, von 100 % (Vehikel-Lösung) auf $122,8 \pm 21,7\%$. Dabei handelt es sich jedoch um eine Tendenz ($p=0,6809$).

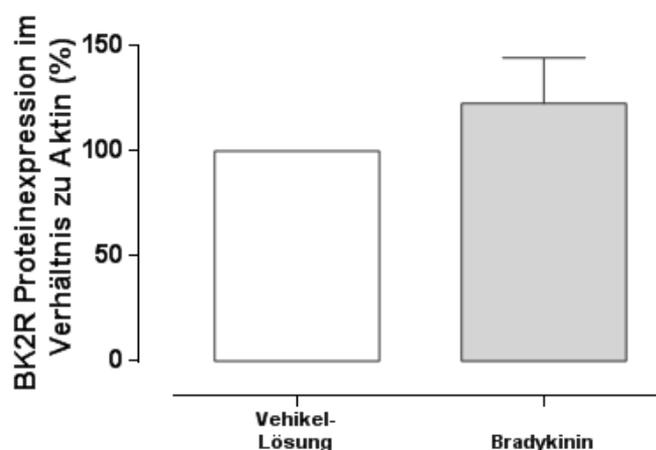


Abbildung 3.1-4 Einfluss von Bradykinin auf die B2 Proteinexpression in PAEC endothelialen Zellen. Repräsentative Western-Blots der Proteinexpression, nach Inkubation mit Bradykinin (100 μ M, 3 h; n = 6). und unter Verwendung des Maus-Antikörpers B2_M. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.1.2.2 Untersuchungen in zerebralen Endothelzellen (bEND.3)

Effekt von DEA/NO auf die Proteinexpression des B2

Endothelzellen (bEND.3) aus zerebralen Blutgefäßen wurden als zusätzliches Zellsystem verwendet zur Untersuchung einer Regulation von DEA/NO auf die Proteinexpression des B2, wobei für 3 h mit 10 μ M des NO Donors DEA/NO inkubiert wurde. Die B2 -Expression mittels der Western-Blot-Methode ist in Abbildung 3.1-5 dargestellt. Die bEND.3 Zellen verhielten sich hinsichtlich ihrer Ansprechbarkeit auf eine Regulierung des B2 in ähnlicher Weise wie die PAEC (s. 3.1.2.1), zumal auch hier zwischen den relativen Fluoreszenzeinheiten der mit DEA/NO behandelten Zellen ($109,9 \pm 9,1\%$, n=8) und der unbehandelten Zellen (Vehikel-

kontrollösung; 100%, n=8) kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt wurde ($p=0,3028$).

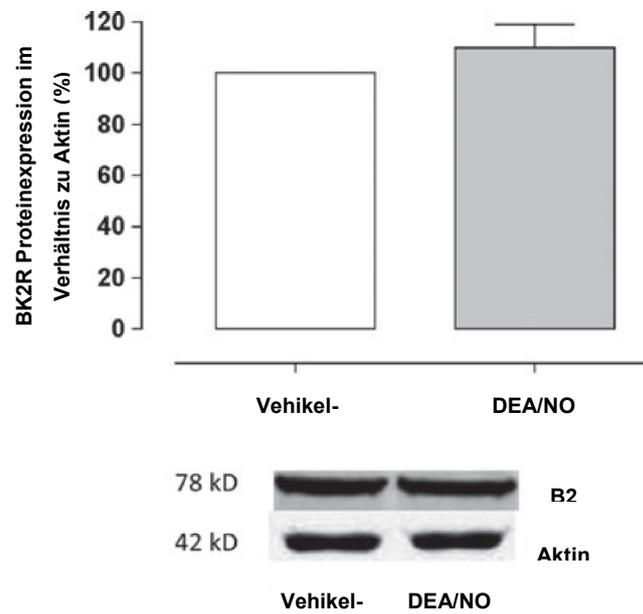


Abbildung 3.1-5 Einfluss von NO auf die B2 Proteinexpression in bEND.3 endothelialen Zellen. Repräsentative Western-Blots nach Inkubation mit dem NO Donor DEA/NO (10 μ M, 3 h) und unter Verwendung des Kaninchen-AK B2_K. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n=8).

Effekt von DETA/NO auf die Proteinexpression des B2

Für eine längerfristige NO-Behandlung der b.END.3 Zellen wurde DETA/NO verwendet (1 mM). Aufgrund seiner langen Halbwertszeit eignet sich DETA/NO besonders für die Generierung längerfristiger konstanter NO-Konzentrationen in Kulturmedien. Die in der Abbildung 3.1-6 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass eine verlängerte NO-Exposition (24 h) nicht zu einer vermehrten Synthese von B2 führten. Zwischen der relativen Expression der mit DETA/NO behandelten Zellen bestand weder nach 3 h ($109,6 \pm 15,42\%$, n=8) noch nach 24 h ($104,8 \pm 3,67\%$, n=6) ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen ($p=0,8014$, einfache ANOVA).

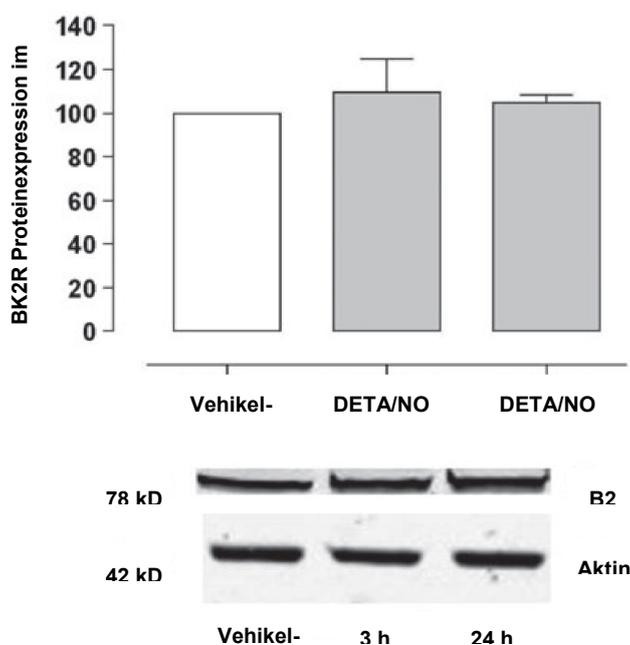


Abbildung 3.1-6 Einfluss von NO auf die B2 Proteinexpression in bEND.3 endothelialen Zellen. Repräsentative Western-Blots nach Inkubation mit dem NO Donor DETA/NO (10 μ M, 3 h und 24 h) und unter Verwendung des Kaninchen-AK B2_K. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n=8).

Effekt von DEA/NO auf die m-RNA Expression des Bradykinin-2 Rezeptors

Die Realtime-RT-PCR-Messung zur Bestimmung der mRNA-Expression des B2-Rezeptors erfolgte nach 3-stündiger Inkubation der Zellen mit DEA/NO (10 μ M), wobei zur Standardisierung die mRNA des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (Hprt1) koamplifiziert wurde, gemäß den in der Tabelle 2.5-1 angegebenen

Reagenzien und Versuchsbedingungen. Die Ergebnisse (Abbildung 3.1-7) belegen, dass es unter Zusatz von DEA/NO nicht zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression des Rezeptors kommt zwischen den willkürlichen Einheiten der mit DEA/NO behandelten Zellen ($1,35 \pm 0,29$ a.u.) und der Kontrolle (1,0 a.u.; $n=5$; $P=0,2245$).

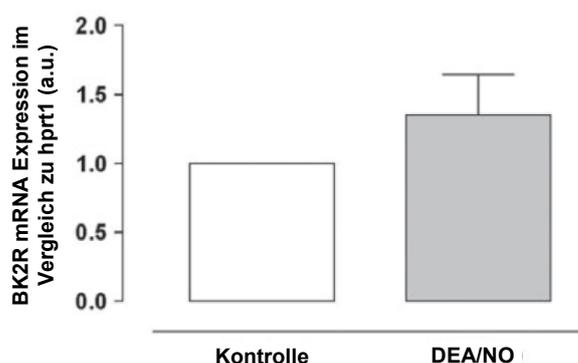


Abbildung 3.1-7 Realtime-RT-PCR-Messung zur Bestimmung der mRNA-Expression des B2 in b.END.3 Zellen nach Behandlung mit DEA/NO (10 μ M, 3 h). Die Standardisierung der mRNA erfolgte durch Koamplifikation des Haushaltsgens hprt1. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt

3.1.2.3 Untersuchungen an Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs)

Als weiteres Zellsystem zur Untersuchung des Einflusses von DEA/NO auf die Proteinexpression des B2 wurden umbilikale Endothelzellen verwendet, die mit 10 μ M des NO Donors DEA/NO für 3 h inkubiert wurden. Die spezifische B2-Expression, bezogen auf die konstitutive Expression von Aktin und im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen ist in Abbildung 3.1-8 dargestellt.

Die umbilikalen Endothelzellen reagierten auf den Zusatz des NO-Donors DEA/NO für 3 h in ähnlicher Weise wie bereits vorher beschriebene Zellsysteme (PAEC, s. 3.1.2.1; bEND). Durch den Zusatz von DEA/NO kam es zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der relativen Proteinexpression (im Vergleich zu Aktin) zwischen unbehandelten (100 %; $n=6$) und behandelten (DEA/NO: $107,8 \pm 10,01$ %; $n=6$; $P=0,4542$).

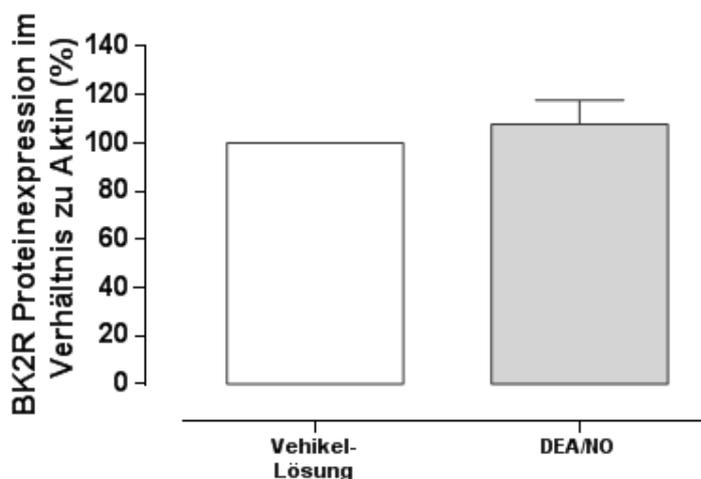


Abbildung 3.1-8 Einfluss von NO auf die B2 Proteinexpression in umbilicalen endothelialen Zellen, nach Inkubation mit dem NO Donor DEA/NO (10 μ M, 3 h). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt, im prozentualen Verhältnis zur Proteinexpression des strukturellen Haushaltsproteins Aktin. Vehikel-Lösung (100 %; n=6; DEA/NO 107,8 \pm 10,01 %; n=6).

3.1.3 EFFEKT VON NO AUF DIE B2 -INDUZIERTER Ca^{2+} SIGNALISIERUNG

3.1.3.1 *Bradykinin induzierte Ca^{2+} - Freisetzung*

Um den Einfluss von Bradykinin auf die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration zu ermitteln, wurden bEND.3 Zellen mit unterschiedlichen Bradykinin-Konzentrationen (0,01 – 1000 μ M) behandelt. Die Ergebnisse (Abbildung 3.1-9) zeigen einer Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration für ansteigende Bradykinin-Konzentrationen (im Bereich von 10 – 1000 μ M). Für die positiven Kontrolle ATP (10 μ M) wurde ein fluoreszentes Signal von 9643 \pm 153 a.u. gemessen, wobei sich die Signale für die Bradykinin-Konzentrationen im Bereich von 2500 – 10000 a.u. befanden. Das ATP-Signal entsprach dabei dem Signal der höchsten Bradykinin-Konzentration (1000 μ M).

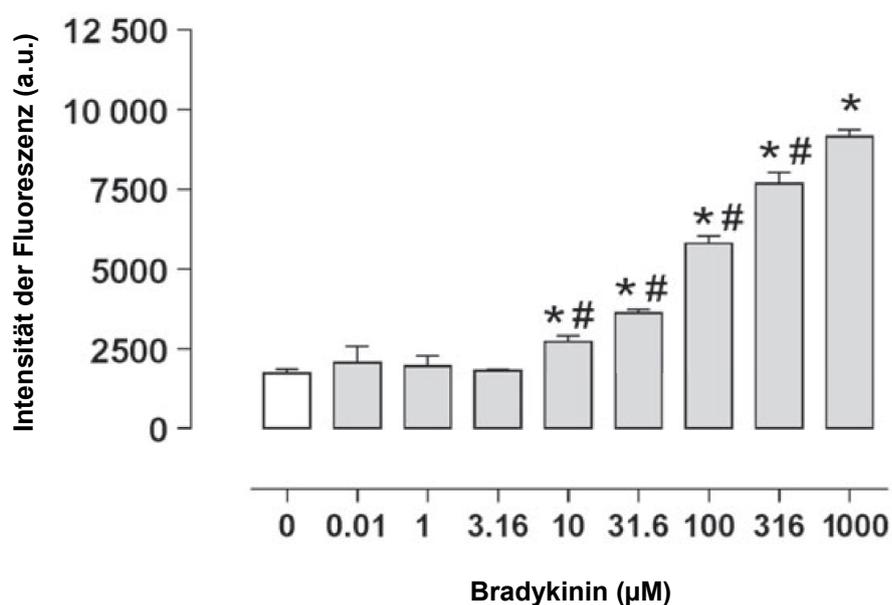


Abbildung 3.1-9 Konzentrationsabhängige Erhöhung der iCa^{2+} durch Bradykinin in bEND.3 Zellen ($p < 0,0001$, einfache ANOVA; * $P < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle; # $P < 0,05$ im Vergleich zur nächsten Konzentrationsstufe). Unter der positiven Kontrolle ATP (10 μM) kam es zu einem fluoreszenten Signal von 9643 ± 153 a.u. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt und die P-Werte wurden mit dem Newman-Keuls Test berechnet, welcher nach einfacher ANOVA durchgeführt wurde. a.u.: willkürliche Einheiten der Fluoreszenz-Intensität.

3.1.3.2 Hemmung des B2 Rezeptors durch Icatibant

Um den Einfluss des Antagonisten Icatibant zu erfassen, wurden die vorherigen Versuche wiederholt. Dabei wurde eine konstante Bradykinin-Konzentration (50 μM) kombiniert mit ansteigenden Konzentrationen von Icatibant (1-100 μM). Dabei kam es mit steigenden Icatibant-Konzentrationen zu einer starken Abnahme der iCa^{2+} (Abbildung 3.1-10), was auf eine Hemmung von B2 durch Icatibant hinweist.

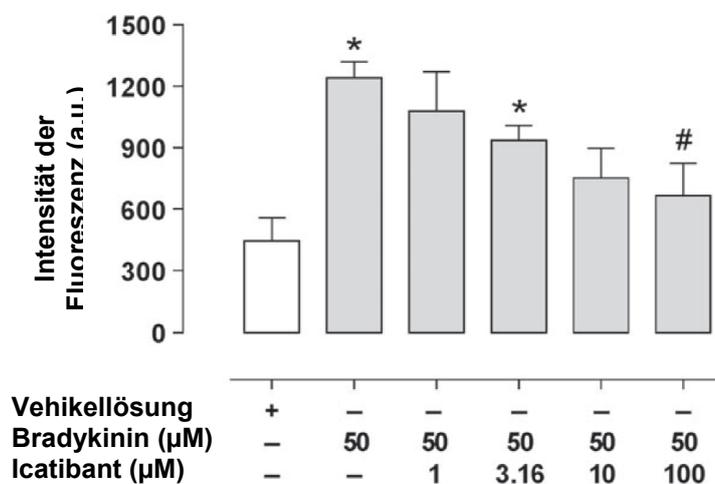


Abbildung 3.1-10 Die durch 50 mM Bradykinin induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration wurde in einer konzentrationsabhängigen Weise gehemmt durch den selektiven B2 Antagonisten Icatibant, was auf eine Abhängigkeit von B2 hinweist ($P=0,0066$, einfache ANOVA, $*P < 0,05$ im Vergleich zur Vehikel-Kontrollösung; $\#P < 0,05$ im Vergleich 50 µM Bradykinin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt und die P-Werte wurden mit dem Newman-Keuls Test berechnet, welcher nach einfacher ANOVA durchgeführt wurde. a.u.: willkürliche Einheiten der Fluoreszenz-Intensität.

3.1.3.3 Effekt von DEA/NO auf die durch Bradykin induzierte Ca^{2+} -Freisetzung

Zur Beurteilung des Einflusses von NO auf die durch Bradykin induzierte Ca^{2+} -Freisetzung, wurden bEND.3 Zellen zunächst mit dem NO-Donor DEA/NO (10 µM; 3 h) vorbehandelt und anschließend mit ansteigenden Bradykinin-Konzentration (3.16 – 100 µM) stimuliert. Die Ergebnisse in Abbildung 3.1-11 zeigen, dass die Anwesenheit von NO keinen Einfluss hat auf die durch Bradykin induzierte Ca^{2+} - Freisetzung. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass NO keinen Einfluss hat auf die durch den B2 vermittelte Phospholipase C Signalkaskade

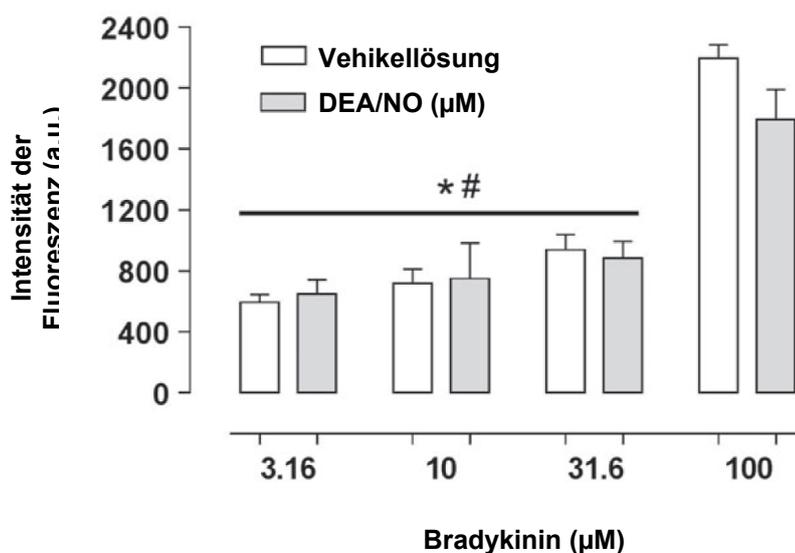


Abbildung 3.1-11 Der durch Bradykinin induzierte Anstieg von iCa^{2+} zeigte keinen Unterschied nach Prä-Inkubation (3 h) von bEND.3 Zellen mit dem NO-Donor DEA/NO (10 µM) ($P < 0,001$, einfache ANOVA; $*P < 0,05$ im Vergleich zu 100 µM Bradykinin; $\#P < 0,05$ im Vergleich 100 µM Bradykinin nach Präinkubation mit DEA/NO. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt und die P-Werte wurden mit dem Newman-Keuls Test berechnet, welcher nach einfacher ANOVA durchgeführt wurde. a.u.: willkürliche Einheiten der Fluoreszenz-Intensität.

3.1.4 EFFEKT DER VASKULÄREN NO BIOVERFÜGBARKEIT AUF DIE B2-PROTEIN-EXPRESSION *IN VIVO*

Um den Effekt der vaskulären NO-Verfügbarkeit auf die B2-Proteinexpression *in vivo* zu bestimmen, wurden Versuche mit verschiedenen Mäuselinien durchgeführt, wobei auch unterschiedliche Gewebearten entnommen wurden (dorsale Haut, Lunge und Myocard des linken Herzventrikels). Dafür wurde eine eNOS Knockout Mauslinie (eNOS^{-/-}) verwendet, sowie eine eNOS-überexprimierende Linie (eNOS^{tg}) mit einer um 3,3-fach erhöhten eNOS-Endothel-spezifischen Überexpression (Suvorava *et al.*, 2005). Der nicht-transgene Stamm eNOSⁿ wurde als Kontrolle verwendet.

Die B2 Proteinexpression in dorsalem Hautgewebe war in den eNOS^{-/-} und C57BL/6-Mäuselinien ähnlich, unabhängig von dem verwendeten Antikörper (Abbildung 3.1-12 A und B). Im Lungengewebe der eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} Mäuselinien wurde ebenfalls kein Unterschied festgestellt bezüglich der B2-Proteinexpression (Abbildung 3.1-12, C und D). Die gleiche Beobachtung wurde bei der Untersuchung des linksventrikulären Myokards von eNOS^{+/+} Mäuselinien gemacht, sowie deren nicht-transgenen Geschwistertiere C57BL/6 (Abbildung 3.1-12 E). In den Zellen des linken Ventrikelmyokards von C57BL/6 Mäusen die 4 Wochen

lang mit L-Nitroarginin (L-NA) behandelt wurden, waren ebenfalls keine wesentliche Veränderung der B2 Proteinexpression festzustellen.

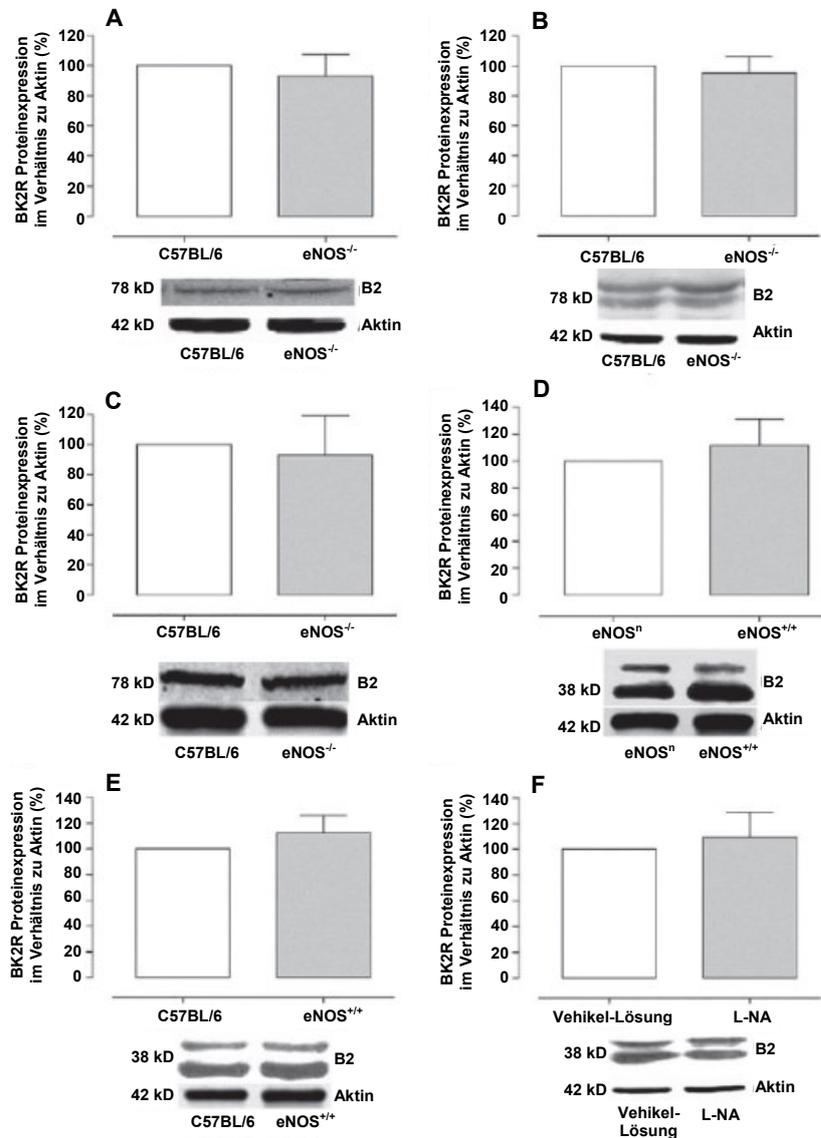


Abbildung 3.1-12 B2-Protein-Expression in der Haut, der Lunge und dem linksventrikulären Herzgewebe verschiedener Mäuselinien. (A und B) B2-Proteinexpression im dorsalen Hautgewebe eNOS^{-/-} Maus bei Verwendung des (A) Kaninchen-AK B2_K (97,61 ± 13,63%, n = 4) im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (100%, n = 4, P = 0,6380), (B) Mäuse-AK B2_M (95,25 ± 10,87%, n = 4) im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (100%, n = 4, P = 0,6775). (C und D) B2-Protein-Expression in Lungengewebe von (C) eNOS^{-/-} Mäusen mit dem B2_K Antikörper (93,0 ± 26,0%, n = 5,) im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (100%, n = 5, P = 0,7930) und (D) eNOS^{+/+} Mäusen mit dem B2_M Antikörper (111,6 ± 18,4%, n = 12) im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren eNOSⁿ (100%, n = 12, p = 0,5639). (E) B2-Proteinexpression im linksventrikulären Herzmuskelgewebe von (E) eNOS^{+/+} Mäusen mit dem B2_M Antikörper (112,2 ± 13,7%, n = 10) im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen (100%, n = 10, p = 0,3968) und in (F) C57BL/6 Mäusen die mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt wurden (111,6 ± 18,4%, n = 12), im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrollen (100%, n = 12, p = 0,5639), und ausgewertet mit dem B2_M Antikörper. Alle Vergleiche basieren auf der Vermessung von Signalen auf demselben Blot. Alle Daten beziehen sich auf Mittelwerte SEM ± Standardfehler und die angegebenen P-Werte wurden berechnet mittels ungepaartem, zweiseitigem t-test. Repräsentative Beispiele von Western Blots sind unterhalb der entsprechenden Graphen gezeigt.

Ähnliche Ergebnisse wurden verzeichnet im Lungengewebe (Abbildung 3.1-13 A) oder Myocard des linken Herzventrikels (Abbildung 3.1-13 B) von C57BL/6 Mäusen nach 4-wöchiger Behandlung mit dem organischen Nitrat PETN, welches als NO-Donor in 2 Konzentrationen eingesetzt wurde (6 mg/Kg/Tag und 60 mg/Kg/Tag).

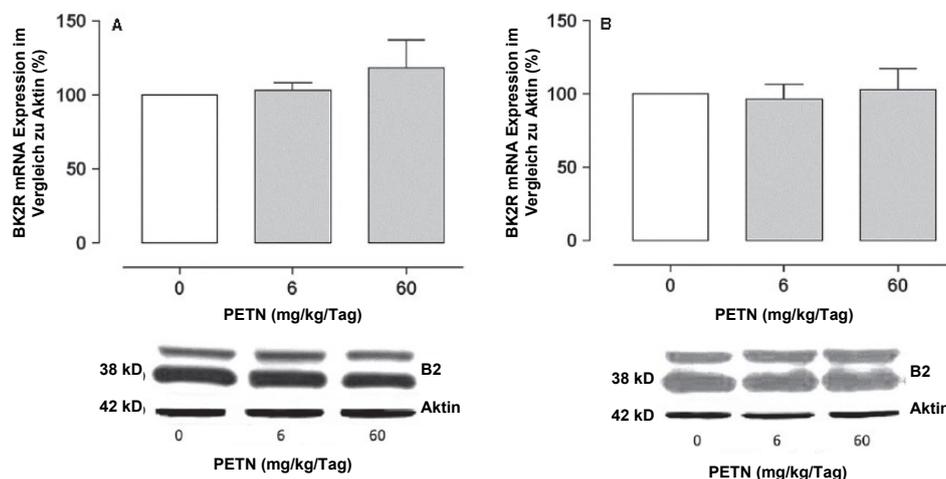


Abbildung 3.1-13 Protein-Expression des BK2 Rezeptors bei Verwendung des B2_M Antikörpers, in (A) Lungengewebe und (B) linksventrikulärem Herzgewebe von Mäusen die mit dem NO-Donor PETN behandelt wurden. (A) Lungengewebe von C57BL/6-Mäuse denen 4 Wochen lang 6 mg/kg/Tag PETN verabreicht wurde ($103,2 \pm 5,28\%$, $n = 5$) oder 60 mg/kg/Tag ($118,4 \pm 18,9\%$, $n = 5$), im Vergleich zur Vehikellösung (100%, $n = 5$, $P = 0,3916$). (B) Linksventrikuläres Herzmuskelgewebe von C57BL/6-Mäusen nach der 4-wöchigen Verabreichung von 6 mg/kg/Tag ($98,6 \pm 10,1\%$, $n = 6$) und 60 mg/kg/Tag ($103,0 \pm 14,3\%$, $n = 6$) im Vergleich zum Träger (100%, $n = 6$, $p = 0,8602$). Alle Vergleiche basieren auf der Auswertung von Signalen auf dem gleichen Blot. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben und die P-Werte wurden durch einseitige ANOVA berechnet. Repräsentative Beispiele der Western-Blots sind an der Unterseite der entsprechenden Graphen dargestellt.

Die zusammenfassende Bewertung der Daten aus Abbildung 3.1-12 und Abbildung 3.1-13 zeigten, dass die B2-Proteinexpression in verschiedenen Geweben von Mäusen nicht durch Veränderungen der vaskulären NO Bioverfügbarkeit reguliert wird. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten der *in-vitro*-Untersuchungen (s. 3.1.2).

3.1.5 WIRKUNG VON ENDOGENEM VASKULÄREM BRADYKININ AUF DIE B2 PROTEINEXPRESSION *IN VIVO*

Um die Wirkung von Bradykinin auf die vaskuläre B2 Proteinexpression *in vivo* zu untersuchen wurden 6 Gruppen von C57BL/6 Mäusen entweder einmal (akut) oder dreimal (chronisch)

behandelt. Dabei wurde Icatibant verabreicht, als kompetitiver Antagonist der Bradykinin-Bindung an B2, oder der C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH), welcher hemmend auf Kallikrein wirkt, und somit die endogene Bradykinin-Bildung hemmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1-14 zusammengefasst.

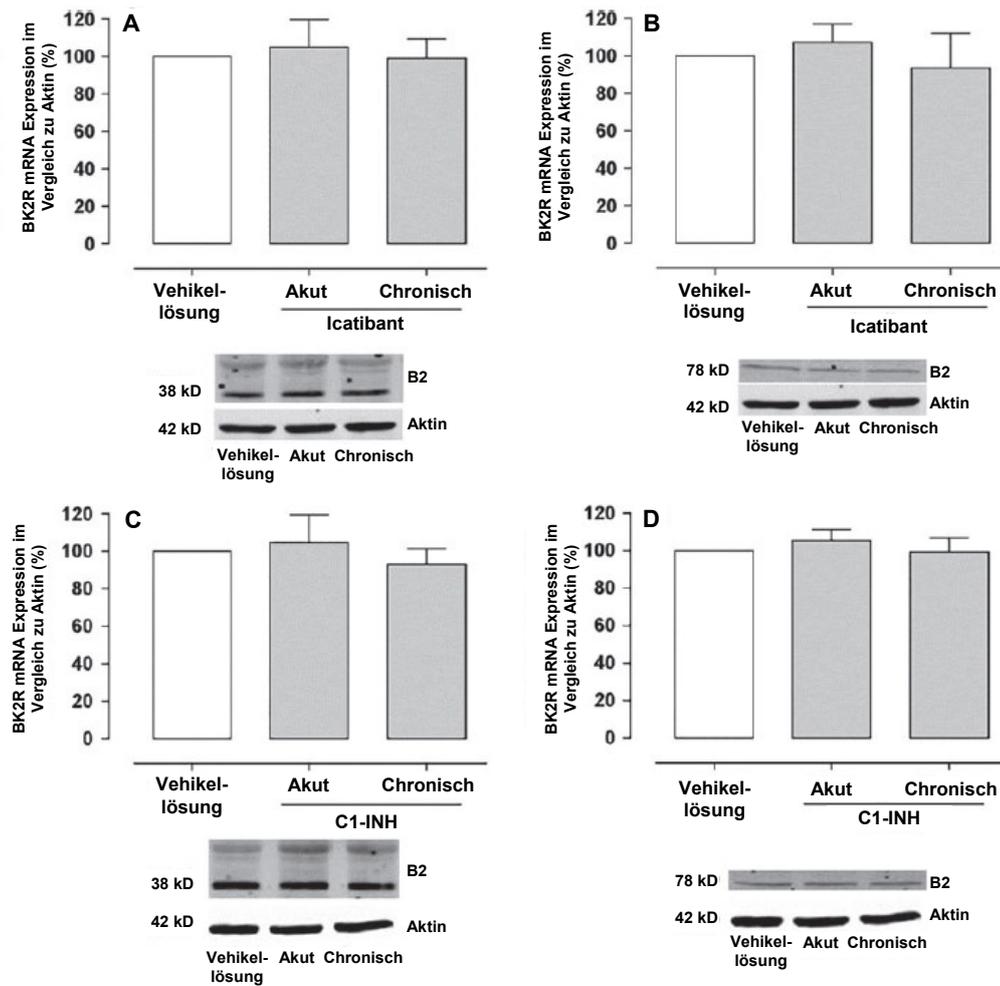


Abbildung 3.1-14 B2 Proteinexpression in Lungengewebe von C57BL/6-Mäusen nach Verabreichung des B2 Antagonisten Icatibant oder des Kallikrein-Inhibitors C1-INH (jeweils n = 5), gemessen 3 h nach einer einzigen i.v. Injektion (akute Verabreichung) oder 3 h nach der letzten von drei i.v. Injektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen (chronische Verabreichung). (A und B) B2-Protein-Expression nach Icatibant-Verabreichung, unter Verwendung des (A) B2_M AK (P = 0,1010) oder (B) B2_K AK (P = 0,3298). (C und D) B2-Proteinexpression nach Verabreichung des C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH) unter Verwendung des B2_M AK (P = 0,3855) oder (D) des B2_M AK (P = 0,3884). Alle Vergleiche basieren auf der Auswertung von Signalen auf dem gleichen Blot. Repräsentative Beispiele der Western-Blots sind an der Unterseite der entsprechenden Graphen dargestellt. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM angegeben und die p-Werte wurden durch einseitige ANOVA berechnet.

Weder Icatibant noch C1-INH führten zu einem signifikanten Effekt was darauf hindeutet dass unter diesen Versuchsbedingungen die Proteinexpression des B2 nicht beeinflusst wird.

3.1.6 BESTIMMUNG DER VASKULÄREN BRADYKININ-AKTIVITÄT AN DER MAUS-AORTA

Bradykinin induzierte eine Vasokonstriktion der Mauseorten mit einem maximalen Effekt bei 1 μ M. (Abbildung 3.1-15 A). Die Entfernung des Endothels verursachte eine starke Reduktion der maximalen Verengung von $25,2 \pm 2,4\%$ der maximalen KCl Reaktion auf $7,9 \pm 2,1\%$, während die Verabreichung von L-Nitroarginin (L-NA) die Kontraktion steigerte (Abbildung 3.1-15 B). Die durch Bradykinin verursachte Kontraktion wurde durch Icatibant oder Diclofenac vollständig gehemmt (Abbildung 3.1-15 A). Dies weist darauf hin, dass die Kontraktion durch endotheliale B2-Aktivierung vermittelt ist und somit abhängig ist von der Cyclooxygenase Aktivität. In eNOS^{-/-} Mäusen war die Vasokonstriktion der Aorten ähnlich wie bei den Aortenringen die mit L-NA behandelt wurden. Bei C57BL/6 und eNOS^{+/+} Mäusen war die kontraktile Reaktivität nach B2-Aktivierung nicht unterschiedlich, obwohl eNOS^{+/+} Mäuse wesentlich mehr eNOS in Endothelzellen exprimieren (Abbildung 3.1-15 C). Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei Mäusen die Veränderung der vaskulären NO Bioverfügbarkeit die B2-Aktivität verändern kann, nicht jedoch deren Proteinexpression.

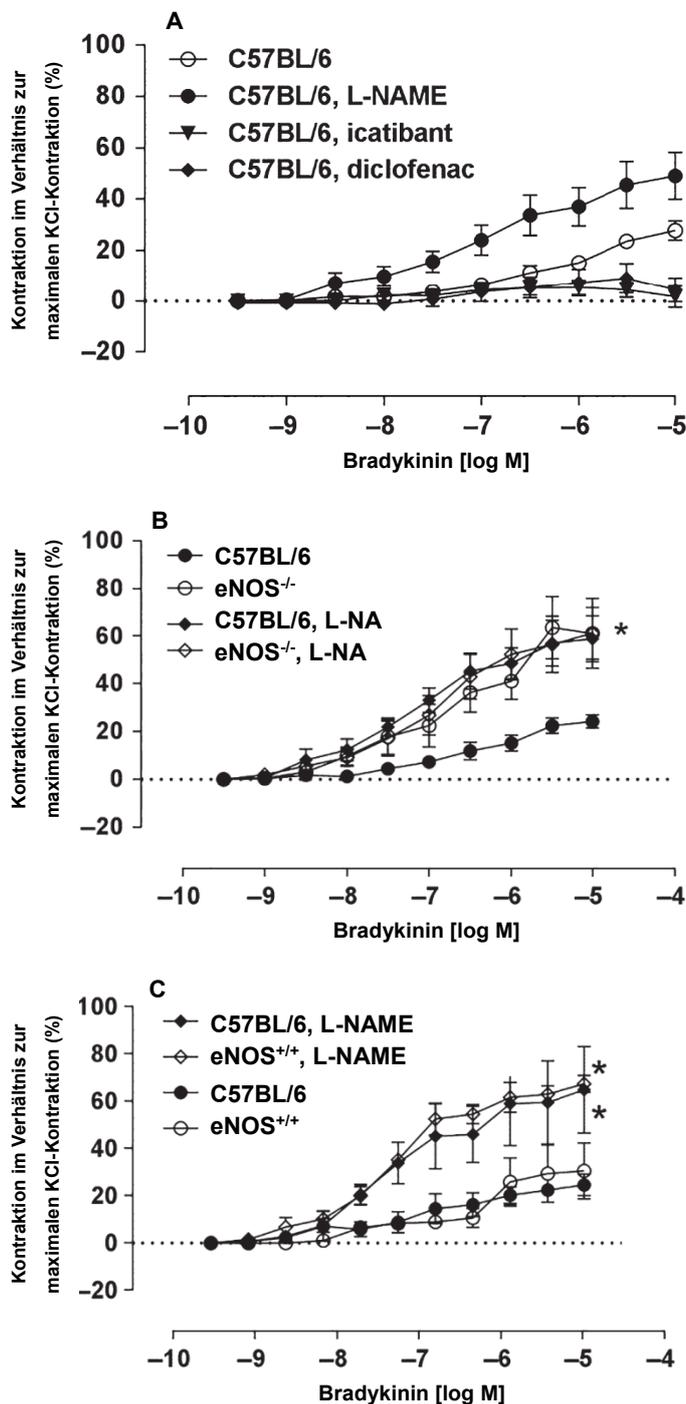


Abbildung 3.1-15

Aktivität von Bradykinin in Aortenringen von Mäusen. (A) Bradykinin induzierte eine Verengung in Aortenringen von C57BL/6-Mäuse (n = 9) (P <0,0001, zweiseitige ANOVA Varianzanalyse) die abhängig war von der Konzentration und der Hemmung von eNOS durch 100 µM L-NA (n = 10), der Hemmung der Cyclooxygenase durch 10 µM Diclofenac (n = 4) oder der Blockade des B2 durch 10 µM Icatibant (n = 4) die dem Organbad hinzugefügt wurden (P<0,0001, zweiseitige ANOVA, *P <0,05 gegenüber C57BL/6-Mäusen, Newman-Keuls-Test).

(B) Bradykinin induzierte eine Verengung der Aortenringe von C57BL/6- (n = 4) und eNOS^{-/-} (n = 4) Mäusen die abhängig war von der Konzentration (P <0,0001, zweiseitige ANOVA) und der Mäuselinie (P <0,0001, zweiseitige ANOVA, * P < 0,05 gegenüber C57BL/6 Mäusen, Newman-Keuls-Test). Behandlung Aortenringe L-NA verstärkte die Verengung in C57BL/6-Mäusen (* P <0,05 gegenüber C57BL/6 Mäusen, Newman-Keuls-Test, n = 4), aber nicht in eNOS^{-/-} (P > 0,05, Newman-Keuls-Test, n = 4).

(C) Bradykinin induzierte eine Verengung in Aortenringen von C57BL/6 (n = 4) und eNOS^{+/+} Mäusen (n = 4), die abhängig war von der Konzentration (P <0,0001, zweiseitige ANOVA) und der Mäuselinie (P <0,0001, zweiseitige ANOVA, * P <0,05 gegenüber C57BL/6 und eNOS^{+/+} Mäusen, Newman-Keuls-Test). Die Hemmung von eNOS durch 100 µM L-NAME die dem Organbad zugesetzt wurden, verstärkte die Verengung in C57BL/6-Mäusen (* P <0,05 gegenüber unbehandelten C57BL/6-Mäusen, Newman-Keuls-Test, n = 4) und in eNOS^{+/+} Mäusen (P <0,05 vs unbehandeltem eNOS^{+/+}, Newman-Keuls-Test, n = 4), wobei es keinen Unterschied gab zwischen C57BL/6 Mäusen und eNOS^{+/+} (P < 0,05, Newman-Keuls-Test, n = 4).

3.2 VERÄNDERUNGEN DER VASKULÄREN PERMEABILITÄT IN DER DORSALEN HAUT VON C57BL/6 MÄUSEN

Unter pathologischen Bedingungen die mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität einhergehen, verlieren die Endothelzellen teilweise ihren engen Kontakt zueinander und das Endothel wird durchlässig für kleine Proteine wie z.B. Albumin. Da in diesem Zustand auch die Extravasation von Albumin gebundenem Evans blue in das Gewebe möglich ist, kann das Ausmaß der Gefäßpermeabilität durch quantitative Messung des ausgetretenen Farbstoffs pro Milligramm Gewebe bestimmt werden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Mittels dieses von Miles (Miles and Miles, 1952) beschriebenen Ansatzes wurden Versuche durchgeführt zur Untersuchung der Bradykinin-vermittelten vaskulären Permeabilität und deren Veränderung durch unterschiedliche NO-Konzentrationen (L-NAME, eNOS(-/-) KO-Mäuse), oxidativen Stress (C101A-eNOS^(-/-)KO-Mäuse) sowie die Wirkstoffe Labradimil, Histamin, Icatibant und Diclofenac.

3.2.1 VALIDIERUNG DER PBS-KONTROLLE

Um den Einfluss der Vehikel-Lösung PBS zu erfassen, wurde zunächst die Evans blue Konzentration aus unbehandelten ausgestanzten dorsalen Hautabschnitten verglichen mit PBS – behandelten Hautabschnitten (n=6) (Abbildung 3.2-1). Dabei wurde festgestellt, dass die Extravasation nach PBS – Behandlung praktisch identisch war wie bei den unbehandelten Kontrolltieren. Daher wurde für alle weiteren Versuche PBS als Kontrolle verwendet.

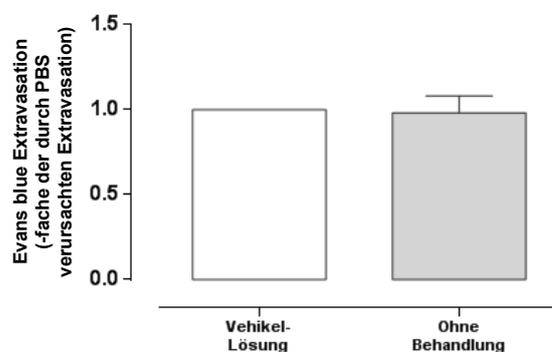


Abbildung 3.2-1 Durch die Vehikel-Lösung PBS induzierte vaskuläre Permeabilität *in vivo*. Vergleich der Extravasation von Albumin-gebundenem Evans blue in der dorsalen Haut von Tieren die mit der Vehikel-Lösung PBS behandelt wurden (n=6), im Vergleich zu nicht behandelten Tieren (n=6).

3.2.2 BRADYKININ-INDUZIERTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Um die vaskuläre Permeabilität von Bradykinin zu ermessen, wurde der Miles-Assay in C57BL/6 Mäusen durchgeführt, wobei den Tieren 30 µl einer 100 µM Bradykinin-Lösung (entspricht einer Stoffmenge von 2 nmol) i.d. injiziert wurde. Zum Vergleich wurde 30 µl einer Histamin-Lösung (100 µM) als positive Kontrolle in benachbarte Hautregionen injiziert, und PBS wurde als negative Vehikel-Kontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2-2 dargestellt.

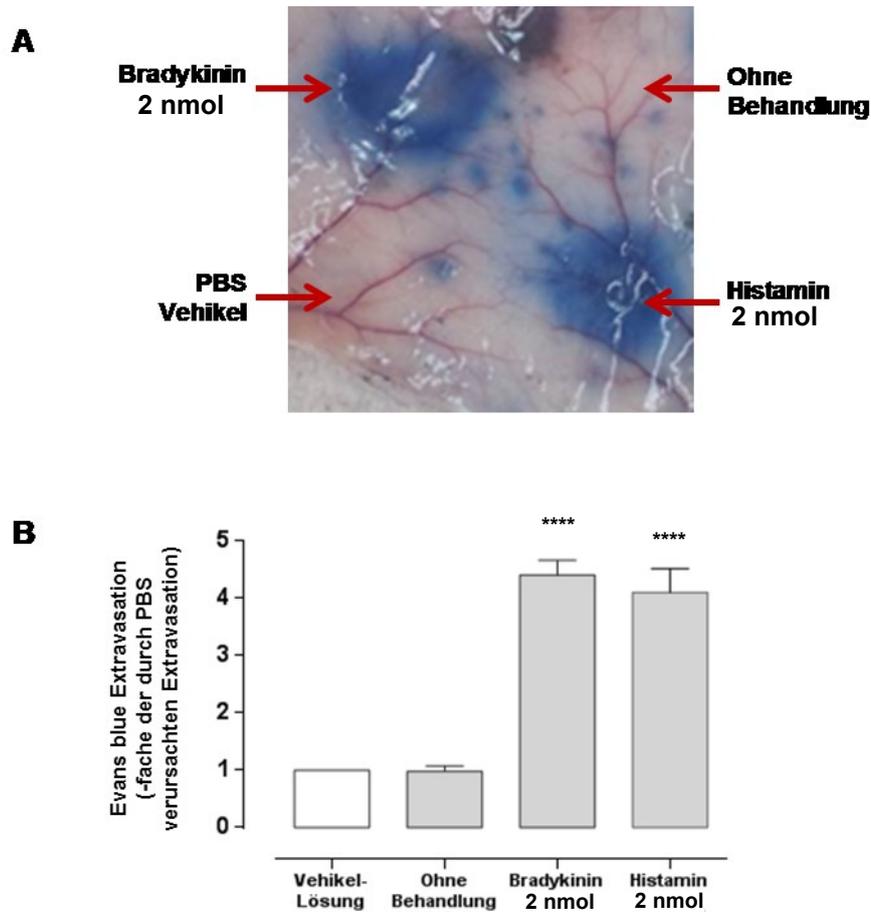


Abbildung 3.2-2 Durch Bradykinin 2 nmol induzierte vaskuläre Permeabilität (n=6), im Vergleich zu Histamin (2 nmol) (n=6), Vehikel-Kontrolle (n=6) und unbehandelten Hautpartien (n=6) in der Mäuselinie C57BL/6 (Miles-Assay). (A) Fotografie der Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut nach i.d. Injektion von Bradykinin (2 nmol), Histamin (2 nmol) und PBS (Vehikel-Kontrolle), im Vergleich zu einer unbehandelten Hautpartie. Die Bilder stellen repräsentative Fotografien dar von 6 unabhängigen Experimenten. (B) Spektrophotometrische Untersuchung der Gefäßpermeabilität, mittels der Bestimmung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue, aus Stanzproben der dorsalen Haut. Die Grafik zeigt die vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation, bezogen auf die durch PBS verursachte Extravasation bzw. unbehandelte Hautproben (**** signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zur Vehikel-Lösung; ##### signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zur unbehandelten Probe; einfache ANOVA; Tukey Test).

Durch Bradykinin wurde eine 4,4-fache Erhöhung ($\pm 0,11$) der Gefäßpermeabilität festgestellt. Dieser Wert war vergleichbar mit der durch Histamin verursachten Extravasation (4,1-fach, $\pm 0,11$).

Mittels weiterer Versuche wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt für unterschiedliche Bradykinin-Konzentrationen (10 – 100 μM ; Abbildung 3.2-3).

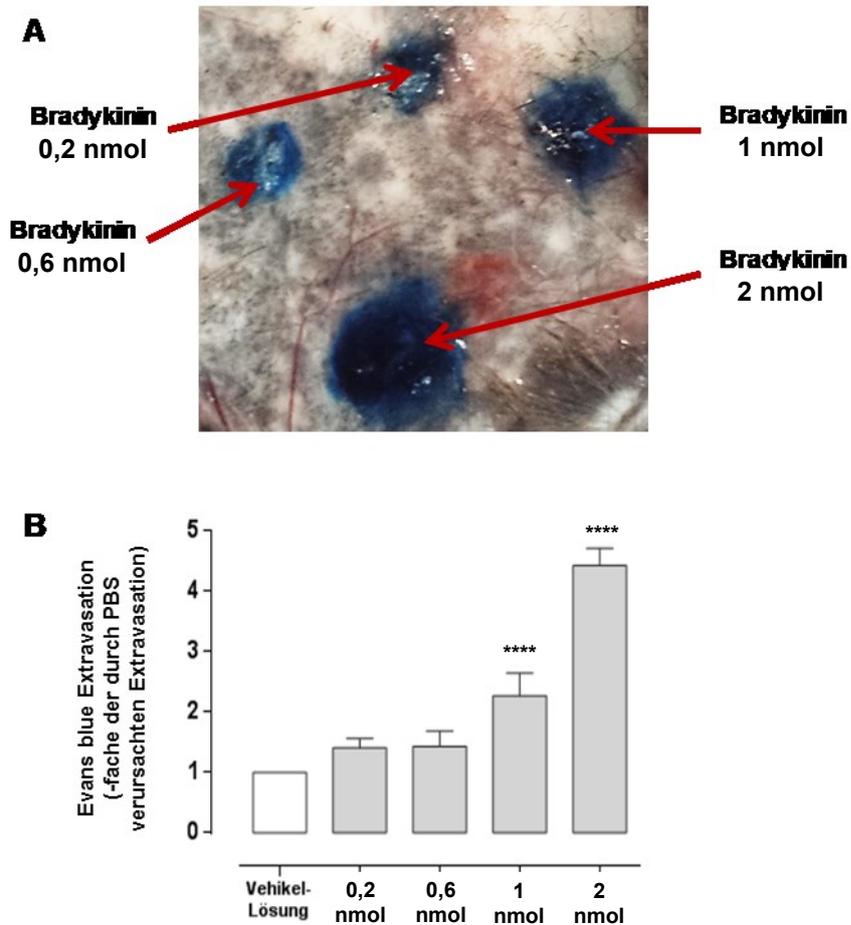


Abbildung 3.2-3 Miles-Assay zur Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach i.d. Injektion von jeweils 30 μ l Bradykinin unterschiedlicher Konzentrationen (0,2 – 2 nmol) in die dorsale Haut von Mäusen der Linie C57BL/6 im Vergleich zur Vehikel-Lösung (PBS) (n= 5 / gestesteter Konzentration).

(A) Fotografie der Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut nach i.d. Injektion von Bradykinin-Lösungen der angegebenen Konzentrationen und PBS (Vehikel-Kontrolle). Die Bilder stellen repräsentative Fotografien dar von 5 unabhängigen Experimenten.

(B) Spektrophotometrische Untersuchung der Gefäßpermeabilität, mittels der Bestimmung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue aus Stanzproben der dorsalen Haut. Die Grafik zeigt die vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation, bezogen auf die durch PBS verursachte Extravasation (**** signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zur Vehikel-Lösung; einfache ANOVA; Tukey Test).

Dabei wurde festgestellt, dass die Permeabilitätssteigerung bei 0,2 nmol Bradykinin etwa $1,41 \pm 0,07$ -fach höher war als die Vehikel-Kontrolle. Bei einer höheren Bradykinin-Konzentration (0,6 nmol) kam es zu keiner weiteren Steigerung der Permeabilität ($1,43 \pm 0,11$). Bei 1 nmol Bradykinin kam es zu einer hoch signifikanten Steigerung ($2,3 \pm 0,11$ -fache des PBS-Wertes), wobei sich dieser Wert verdoppelte bei der Verwendung von 2 nmol Bradykinin ($4,4 \pm 0,13$ -fache des PBS-Wertes), was auf eine hoch signifikante und konzentrationsabhängige Dosis-

Wirkungs-Beziehung der durch Bradykinin induzierten vaskulären Permeabilität im Bereich von 0,2-2 nmol hinweist.

3.2.3 LABRADIMIL-INDUZIERTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Labradimil, (früher auch als RMP-7 bezeichnet) ist ein aus 9 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches als Bradykinin-Agonist selektiv an den B2 bindet, jedoch eine längere Plasmahalbwertszeit als Bradykinin aufweist. Ursprünglich wurde Labradimil entwickelt um die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen. Durch Labradimil kommt es zu den charakteristischen, für Bradykinin bekannten Signalwegen, einschließlich der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und des Phosphatidylinositol-Umsatzes (Emerich *et al.*, 2001).

Zur vergleichenden Untersuchung der Wirkung von Labradimil und Bradykinin mit dem Miles-Assay wurden beide Wirkstoffe i.d. (30 μ l, 2 nmol) in die dorsale Haut von Mäusen der Linie C57BL/6 injiziert (s. 2.6.2). Dabei wurde Histamin als Vergleichssubstanz verwendet. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2-4 zusammengefasst.

Im Vergleich zu der Vehikel-Lösung wurde die vaskuläre Permeabilität statistisch hochsignifikant erhöht, wobei die Wirkung von Bradykinin am höchsten war, gefolgt von Histamin und Labradimil (Bradykinin: $4,41 \pm 0,11$ –fach, $p < 0,0001$; Histamin: $4,11 \pm 0,17$ –fach, $p < 0,0001$; Labradimil $3,7 \pm 0,12$ –fach, $p < 0,0001$). Statistisch signifikante Unterschiede wurden zudem festgestellt zwischen Bradykinin und Labradimil ($p < 0,05$), nicht jedoch zwischen Bradykinin und Histamin ($p = 0,30$), bzw. Histamin und Labradimil ($p = 0,12$).

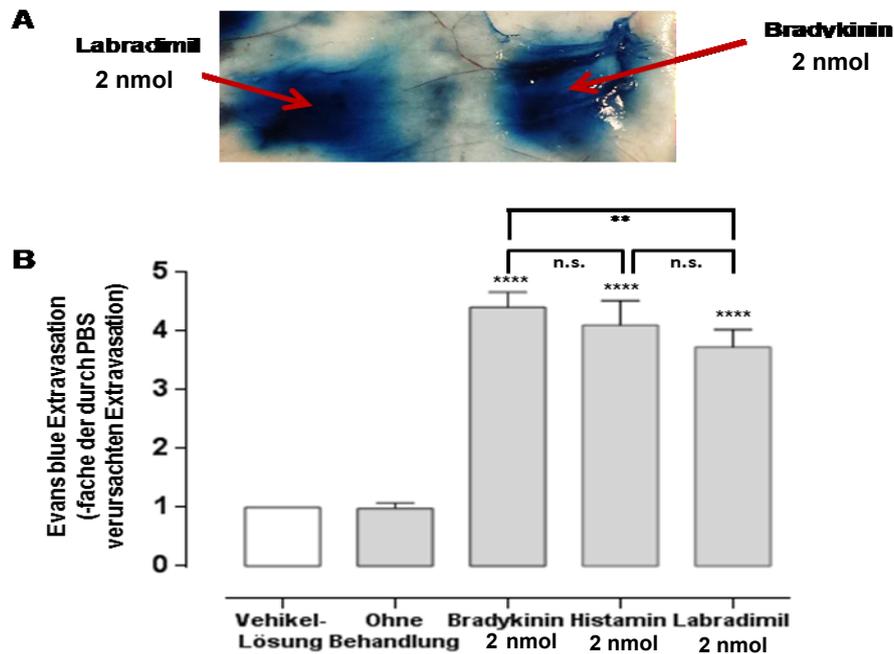


Abbildung 3.2-4 Ergebnisse des Miles-Assay zur Untersuchung der durch Labradimil (30 μ l, 2 nmol) induzierten vaskulären Permeabilität ($n = 6$), im Vergleich zu Bradykinin (30 μ l, 2 nmol ; $n = 6$) Histamin (30 μ l, 2nmol; $n = 6$), der Vehikel-Kontrolle PBS ($n = 6$) und unbehandelten Hautpartien ($n = 6$) in der Mäuselinie C57BL/6.

(A) Fotografie der Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut nach i.d. Injektion von Labradimil (30 μ l, 2 nmol; $n = 6$) und Bradykinin (30 μ l, 2 nmol; $n = 6$). Die Bilder stellen repräsentative Fotografien dar von 6 unabhängigen Experimenten.

(B) Spektrophotometrische Untersuchung der Gefäßpermeabilität, mittels der Bestimmung des Farbstoffgehaltes des mit Formamid extrahierten Evans Blue, aus Stanzproben der dorsalen Haut. Die Grafik zeigt die vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation, nach i.d. Injektion von Labradimil (30 μ l, 2 nmol; $n = 6$), Bradykinin (30 μ l, 2 nmol; $n = 6$) und Histamin (30 μ l, 2 nmol; $n = 6$), bezogen auf die durch PBS verursachte Extravasation bzw. unbehandelte Hautproben. (**** Signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zur Vehikel-Lösung; **** Signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zu unbehandelten Proben; Vergleich zwischen den angegebenen Behandlungen: n.s. (nicht signifikant $p > 0,05$) ** hoch signifikant ($p < 0,01$); einfache ANOVA; Tukey Test).

3.2.4 ICATIBANT HEMMT DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL INDUZIERTER VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Icatibant ist ein selektiver Bradykinin-B2-Rezeptor-Antagonist (Wirth, Heitsch and Schölkens, 1995; Fincham *et al.*, 2009), mit einer ähnlichen Struktur wie das körpereigene Bradykinin und mit Affinität für den B2. Durch die spezifische Bindung und die peptidomimetische Blockade der B2-Rezeptoren kommt es *in vivo* zu einer dosis- und zeitabhängigen Hemmung der durch Bradykinin induzierten Effekte (Rosenkranz, Brunner-Ferber and Knolle, 2007).

Um die Wirkung dieses Antagonisten auf die vaskuläre dermale Permeabilität zu untersuchen, wurden die C57BL/6 Versuchstieren mit Icatibant vorbehandelt (i.v. 16 µg/kg KG, an jeweils 2 aufeinanderfolgenden Tagen). Danach wurden Bradykinin, Labradimil und Histamin i.d. (30 µl, 2 nmol) in die dorsale Haut injiziert, gemäß den Vorgaben zur Durchführung des Miles-Assays (s. 2.6.2). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2-5 zusammengefasst.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 gezeigt, wurde die vaskuläre Permeabilität im Vergleich zu der Vehikel-Lösung statistisch hochsignifikant erhöht, wobei die Wirkung von Bradykinin am höchsten war, gefolgt von Histamin und Labradimil (Bradykinin: $4,41 \pm 0,11$ –fach, $p < 0,0001$; Histamin: $4,11 \pm 0,17$ –fach, $p < 0,0001$; Labradimil $3,7 \pm 0,12$ –fach, $p < 0,0001$). Durch die Vorbehandlung mit Icatibant kam es zur Reduktion der kapillaren Permeabilität bei Behandlung mit Bradykinin (vom $4,41 \pm 0,11$ –fachen auf das $1,71 \pm 0,24$ –fache der für die Vehikel-Lösung gemessenen Permeabilität; $p < 0,0001$). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an Aortenringen von C57BL/6-Mäusen, wobei die durch Bradykinin verursachte Kontraktion durch Icatibant vollständig gehemmt wurde (Abbildung 3.1-15 A).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Behandlung mit Labradimil festgestellt (vom $3,74 \pm 0,12$ –fachen auf das $1,86 \pm 0,19$ –fache der Vehikel-Lösung; $p < 0,0001$). Die durch Icatibant verursachte Reduktion der Extravasation bei Behandlung mit Bradykinin oder Labradimil unterschied sich statistisch nicht voneinander ($p = 0,99$).

Dem gegenüber wurde die Wirkung von Histamin nicht durch die Icatibant-Vorbehandlung beeinflusst, statistisch signifikante Unterschiede wurden nicht festgestellt zwischen den Werten der Extravasation mit oder ohne Icatibant-Vorbehandlung.

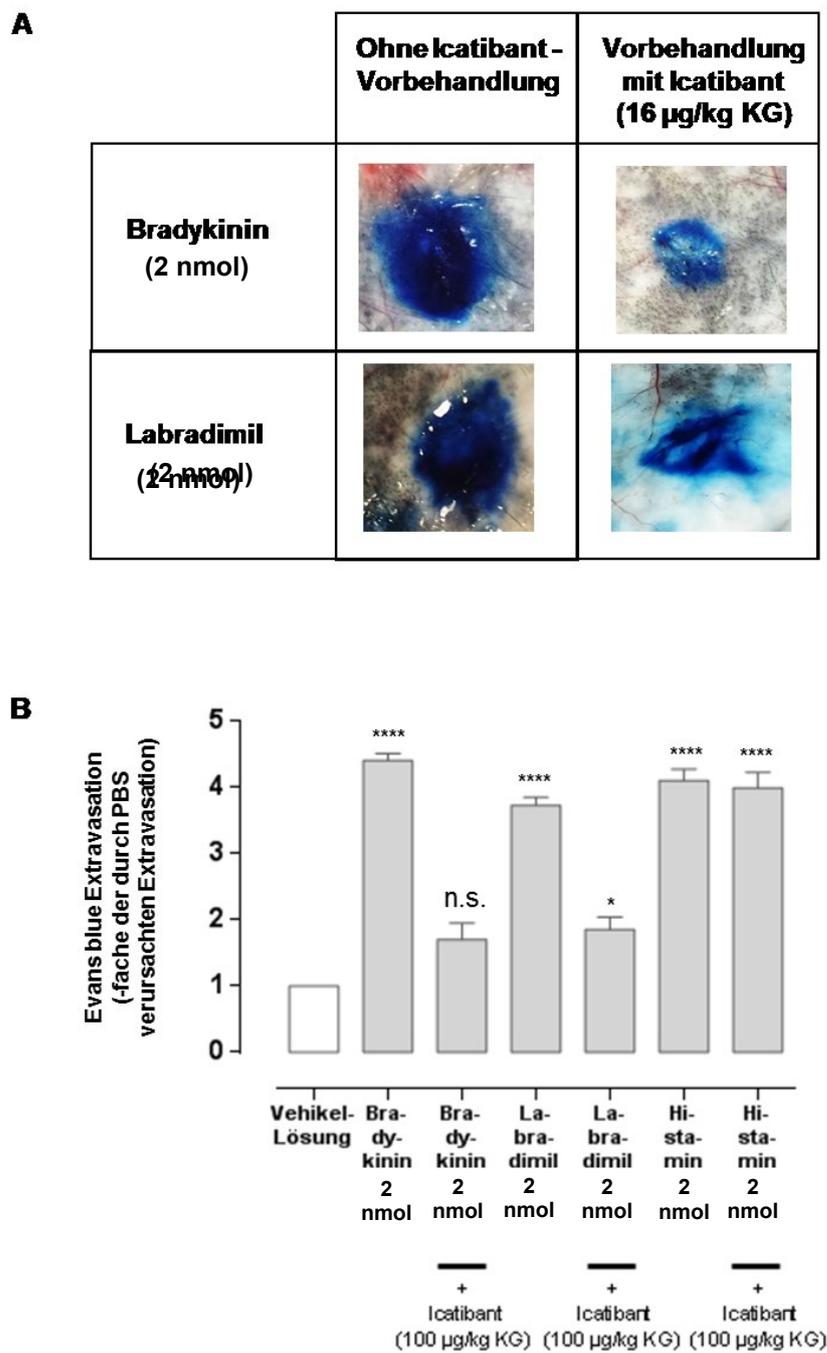


Abbildung 3.2-5 Vaskuläre Extravasation des an Serum-Albumin gebundenem Evans Blau in der dorsalen Haut von Versuchstieren (C57BL/6 Mäuse) durch Bradykinin (30 µl, 2 nmol; n = 6), Labradimil (30 µl, 2 nmol; n = 6) oder Histamin (30 µl, 2 nmol; n = 6), jeweils mit oder ohne Icatibant-Vorbehandlung (i.v. 16 µg/kg KG, an jeweils 2 aufeinanderfolgenden Tagen).

(A) Fotografie der Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut. Die Bilder stellen repräsentative Fotografien dar.

(B) Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation. Die Ergebnisse sind als -fache Induktion der durch PBS verursachten Extravasation ausgedrückt und als Mittelwert ± SD dargestellt.

Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant (p<0,0001); * signifikant (p<0,05); einfache ANOVA; Tukey Test).

3.2.5 DICLOFENAC HEMMT DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL INDUZIERTER VASKULÄRE PERMEABILITÄT

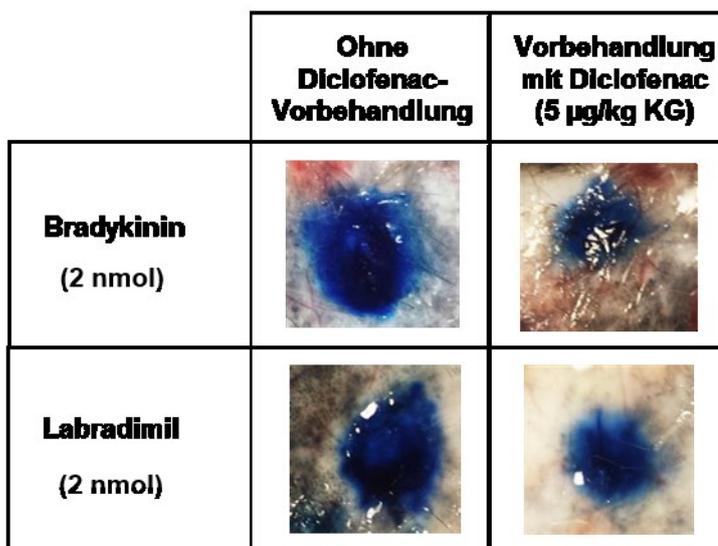
Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass durch den nicht-selektiven Cyclooxygenase-Hemmer Diclofenac (10 μ M) an Aortenringen von C57BL/6-Mäusen ein identischer Effekt nachweisbar ist wie bei Icatibant. Die durch Bradykinin verursachte Kontraktion wurde vollständig gehemmt (Abbildung 3.1-15 A), was auf eine mögliche Beteiligung der Cyclooxygenase hinweist. Um die Wirkung von Diclofenac auf die durch Bradykinin oder Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität zu erfassen, wurden Versuche durchgeführt deren Ergebnisse in Abbildung 3.2-6 dargestellt sind.

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt für Icatibant beschrieben (Abbildung 3.2-5), wurde nach Vorbehandlung mit Diclofenac eine statistisch signifikante Reduktion der durch Bradykinin und Labradimil induzierten vaskulären Extravasation beobachtet ($p < 0,0001$ bzw. $p < 0,001$).

Durch Bradykinin wurde die Permeabilität, im Vergleich zu der Vehikel-Lösung, um den Faktor $4,41 \pm 0,11$ erhöht ($p < 0,0001$), während die Kombination von Bradykinin und Diclofenac eine $2,60 \pm 0,28$ -fache Erhöhung verursachte ($p < 0,001$). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für Labradimil beobachtet, wo es zu einer $3,74 \pm 0,12$ -fachen Erhöhung der Permeabilität der Vehikel-Lösung kam ($p < 0,0001$), die durch Diclofenac-Vorbehandlung auf den $2,44 \pm 0,25$ -fachen Wert der Vehikel-Lösung reduziert wurde ($p < 0,0001$). Bei dem Vergleich der durch Bradykinin und Labradimil verursachten vaskulären Permeabilität wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt (ohne Diclofenac: $p = 0,10$; mit Diclofenac: $p = 0,96$).

Die Ergebnisse bezüglich Bradykinin stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an Aortenringen von C57BL/6-Mäusen, wobei die kontrahierende Wirkung von Bradykinin durch Diclofenac vollständig gehemmt wurde (Abbildung 3.1-15 A).

A



B

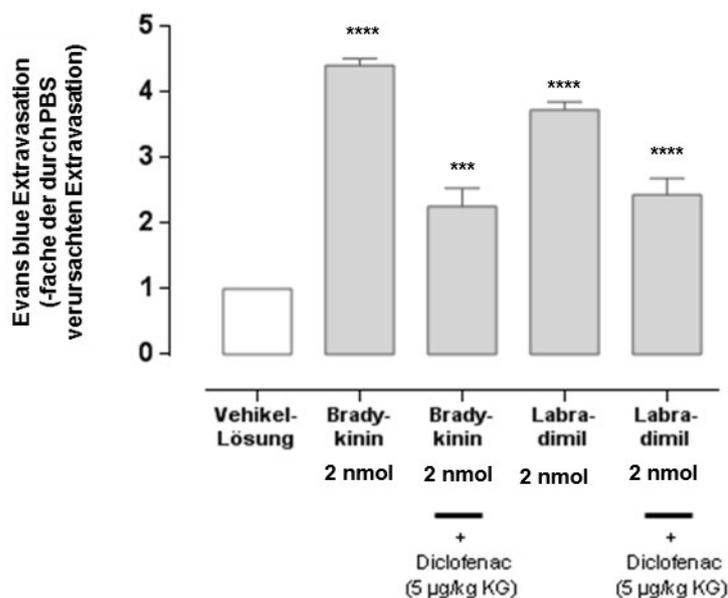


Abbildung 3.2-6

Vaskuläre Extravasation des an Serum-Albumin gebundenem Evans Blau in der dorsalen Haut von Versuchstieren (C57BL/6 Mäuse) durch Bradykinin (30 µl, 2 nmol; n = 6) und Labradimil (30 µl, 2 nmol; n = 6), jeweils mit oder ohne Diclofenac-Vorbehandlung (i.v. 5 µg/kg KG, an jeweils 2 aufeinanderfolgenden Tagen). (A) Fotografie der Evans Blue Extravasation in der dorsalen Haut. Die Bilder stellen repräsentative Fotografien dar. (B) Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation. Die Ergebnisse sind als -fache Induktion der durch PBS verursachten Extravasation ausgedrückt und als Mittelwert ± SD dargestellt. Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant (p<0,0001); *** hoch signifikant (p<0,001); einfache ANOVA; Tukey Test).

3.2.6 L-NAME HAT KEINE WIRKUNG AUF DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL INDUZIERTER VASKULÄRE PERMEABILITÄT

NO wird in der Gefäßwand durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III) gebildet, die in den vaskulären Endothelzellen stark exprimiert wird. Dabei wird die Aminosäure L-Arginin zu Citrullin und NO umgesetzt (Palmer, Ashton and Moncada, 1988; Schmidt *et al.*, 1988; Bredt and Snyder, 1990), im Rahmen einer von NAD(P)H und Ca^{2+} /Calmodulin-vermittelten Reaktion (Mayer *et al.*, 1989; Mülsch, Bassenge and Busse, 1989). Neben der endothelialen eNOS sind die neuronale NOS (nNOS, NOS I) und die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) als Isoenzyme bekannt.

Die NO-Bildung durch diese drei Isoformen kann mittels verschiedene L-Arginin-Analoga gehemmt werden, z.B. N_ω-Nitro-L-Arginin (L-NA) oder L-Nitroarginin-methylester (L-NAME) (Palmer, Ashton and Moncada, 1988; Víteček *et al.*, 2012). Dabei handelt es sich um die ersten synthetischen NOS-Inhibitoren. Ihre Fähigkeit, die NO-Synthese zu blockieren, wurde in den frühen neunziger Jahren beschrieben (Moore *et al.*, 1990; Rees *et al.*, 1990). L-NA wird wegen seiner schlechten Löslichkeit (etwa 4 mmol/L bei neutralem pH) eher selten in biologischen Systemen verwendet. Der Methylester von L-NA (L-NAME) wirkt als schwacher NOS-Inhibitor, wird aber leicht zu L-NA hydrolysiert durch ubiquitär vorhanden Esterasen (Griffith and Kilbourn, 1996). Somit ist die Verwendung von L-NAME sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten vorteilhafter gegenüber L-NA, da mit Bezug auf die Löslichkeit in einer wässrigen Umgebung keine Einschränkungen zu verzeichnen sind (Víteček *et al.*, 2012).

Um die Beteiligung von NO an der Bradykinin- oder Labradimil-induzierten Erhöhung der vasalen Permeabilität zu untersuchen, wurden Versuchstiere der Linie C57BL/6 mit L-NAME vorbehandelt (i.v. 16 mg/kg KG, an jeweils 2 aufeinanderfolgenden Tagen vor dem Miles-Assay), wie bereits in den vorhergehenden Abschnitten für Icatibant (3.2.4) und Diclofenac (3.2.5) beschrieben.

Die Ergebnisse der Abbildung 3.2-7 zeigen dass L-NAME keinen wesentlichen Einfluss hat auf die durch Bradykinin und Labradimil erhöhte Permeabilität, was darauf schließen lässt dass eine vermehrte NO-Verfügbarkeit an der erhöhten Permeabilität nicht beteiligt ist.

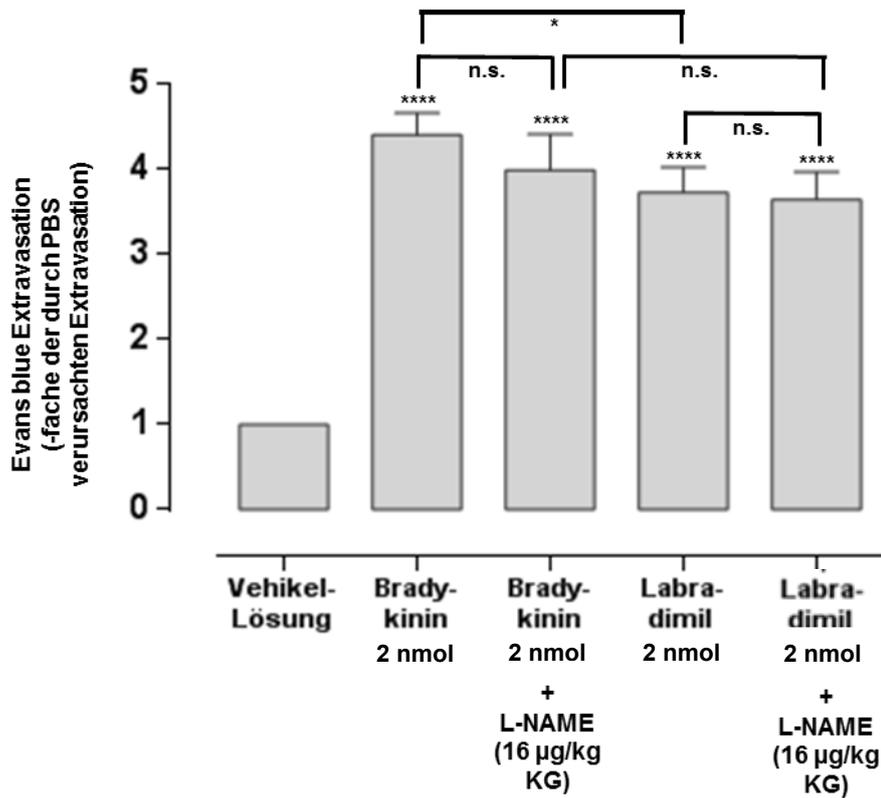


Abbildung 3.2-7 Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation in der dorsalen Haut von Versuchstieren (C57BL/6 Mäuse), nach i.d. Injektion von Labradimil (30 µl, 2 nmol; n = 6) oder Bradykinin (30 µl, 2 nmol; n = 6) mit oder ohne L-NAME-Vorbehandlung (i.v. 16 mg/kg KG, an jeweils 2 aufeinanderfolgenden Tagen). Die Ergebnisse sind als -fache Induktion der durch PBS verursachten Extravasation ausgedrückt und als Mittelwert ± SD dargestellt.
 Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant (p < 0,0001);
 Vergleich zwischen den angegebenen Behandlungen: n.s. (nicht signifikant, p > 0,005) * signifikant (p < 0,05); einfache ANOVA; Tukey Test).

3.3 eNOS^{-/-} MÄUSE ZEIGEN KEINE VERÄNDERTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT DURCH BEHANDLUNG MIT BRADYKININ ODER LABRADIMIL

Um die Rolle von NO bei der Bradykinin-induzierten Extravasation noch eingehender zu untersuchen, wurden weitere Versuche zur Bedeutung der endothelialen eNOS unternommen, unter Verwendung der eNOS Knockout Mauslinie (eNOS^{-/-}). Bei diesen Versuchstieren wurde die eNOS durch einen klassischen Knockout ausgeschaltet, daher produzieren diese Tiere keine eNOS (Shesely *et al.*, 1996).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3-1 zusammengefasst. Wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt wurde (s. 3.2.3, Abbildung 3.2-4), stieg die vaskuläre Extravasation in Tieren der Linie C57BL/6 durch Bradykinin und Labradimil an, um den Faktor 3,74-4,41 im Vergleich zu der Vehikel-Kontrolle PBS. Bei den Versuchstieren der Knockout Mauslinie (eNOS^{-/-}) kam es für beide Wirkstoffe auch zu einem entsprechenden Anstieg der Permeabilität, die sich jedoch statistisch nicht unterschied von den C57BL/6 Versuchstieren. Bei beiden Linien war die Wirkung von Bradykinin etwas höher im Vergleich zu Labradimil, statistisch signifikante Unterschiede zwischen C57BL/6 und eNOS^{-/-} wurden jedoch nicht festgestellt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Produktion von endothelialem NO über eNOS keinen Einfluss hat auf die durch Bradykinin oder Labradimil erhöhte vaskuläre Permeabilität. Die vorherigen Ergebnisse bezüglich der Wirkung von L-NAME auf die durch Bradykinin und Labradimil induzierte vaskuläre Permeabilität (s. 3.2.6) wurden durch die vorliegenden Versuche bestätigt.

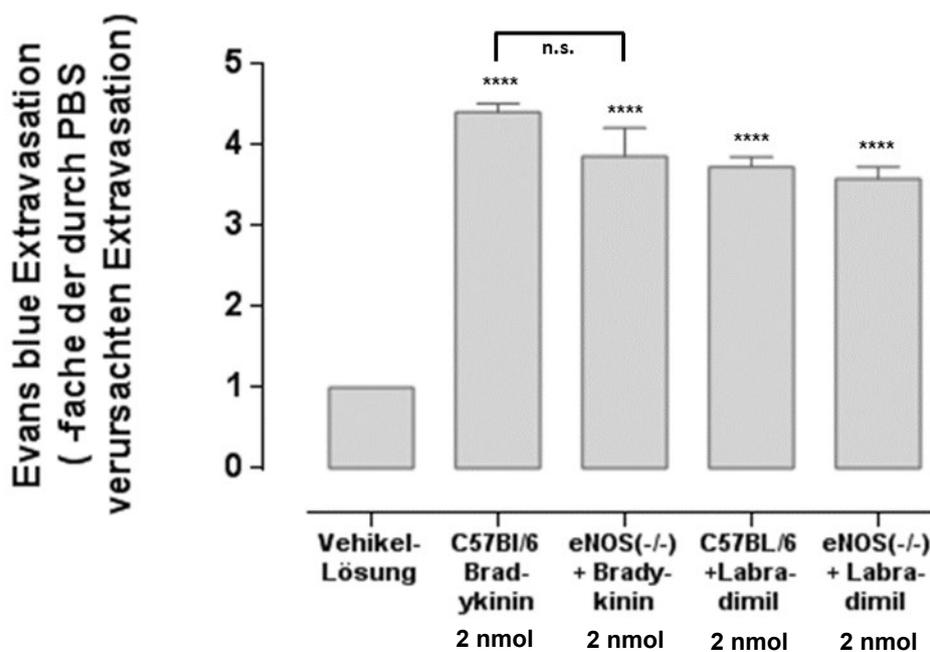


Abbildung 3.3-1 Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation in der dorsalen Haut von Versuchstieren (C57BL/6 und eNOS^{-/-} Mäusen), nach i.d. Injektion von Bradykinin (30 µl, 2 nmol; n = 6) oder Labradimil (30 µl, 2 nmol; n = 6). Die Ergebnisse sind als -fache Induktion der durch PBS verursachten Extravasation ausgedrückt und als Mittelwert ± SD dargestellt. Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant (p<0,0001); Vergleich zwischen den angegebenen Behandlungen: n.s. (nicht signifikant p>0,005); einfache ANOVA; Tukey Test).

3.4 VASKULÄRER OXIDATIVER STRESS HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL BEDINGTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Zur Untersuchung des durch eNOS bedingten oxidativen Stress, wurde die transgene Mauslinie C101A-eNOS-tg (Mu⁺⁺) verwendet (Suvorava *et al.*, 2015). Dafür wurde zunächst ein bovines eNOS cDNA-Fragment (4,1 kb) zwischen den murinen Tie-2 Promotor (2,1 kb) und ein Tie-2 Intron Fragment kloniert, welches als Tie-2 enhancer verwendet wurde, zur Endothelspezifischen Expression. Die zielgerichtete Mutagenese zur Substitution von Cystein durch Alanin wurden durch primer overlap extension PCR durchgeführt. Versuche haben gezeigt, dass es bei der transgenen Mauslinie zu einer geringeren Bildung von NO und Citrullin kommt, bei gleichzeitig erhöhter Synthese von Superoxid und Peroxonitrit (2,3 – 3,7-fach) (Suvorava *et al.*, 2015). Als Kontrolle wurden Mäuse der Linie C57BL/6 verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4-1 dargestellt.

Durch i.d. Injektion von Bradykinin und Labradimil (30 µl, 2 nmol) kam es bei allen Versuchstieren und getesteten Bedingungen zu einer Steigerung der Permeabilität, die zwischen $3,05 \pm 0,36$ und $3,5 \pm 0,5$ –fach erhöht war im Vergleich zu der Vehikel-Kontrolle (statistisch hoch signifikant, $p < 0,0001$).

Zwischen den Mauslinien ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Evans-blue Extravasation und die gleiche Beobachtung wurde gemacht bei dem Vergleich der Wirkstoffe Bradykinin und Labradimil. Demnach hat die Veränderung der eNOS durch die C101A-Mutation und der damit verbundene erhöhte oxidative Stress keinen Einfluss auf die durch i.d. Injektion von Bradykinin und Labradimil (30 µl, 2 nmol) bedingte Erhöhung der vasalen Permeabilität bzw. Evans-blue Extravasation.

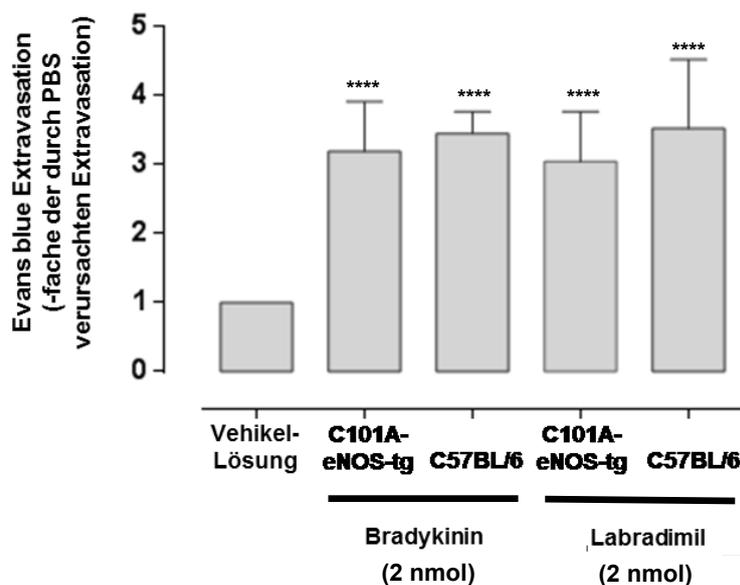


Abbildung 3.4-1 Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation in der dorsalen Haut von Versuchstieren der Linie C101A-eNOS-tg (Mu^{++}) im Vergleich zu der Mäuselinie C57BL/6, nach i.d. Injektion von Bradykinin (30 μ l, 2 nmol) oder Labradimil (30 μ l, 2 nmol). Die Ergebnisse sind als -fache Induktion der durch PBS verursachten Extravasation ausgedrückt und als Mittelwert \pm SD dargestellt (Vehikellösung: n=9; C101A-eNOS-tg + Bradykinin: n=9; C57BL/6 + Bradykinin: n=4; C101A-eNOS-tg + Labradimil: n=9; C57BL/6 + Labradimil: n=4).
Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant ($p < 0,0001$);

3.5 CHARAKTERISIERUNG EINES NEUEN TRANSGENEN MAUSMODELLS MIT ENDOTHELIALER ÜBEREXPRESSION DES BRADYKININ-B2-REZEPTORS

Um die Auswirkung einer erhöhten endothelspezifischen Überexpression des B2 auf die durch Labradimil und Icatibant induzierte Erhöhung der Permeabilität für Evans Blue in dorsalem Hautgewebe der Versuchstiere zu erfassen, wurde eine neue transgene Mauslinie verwendet. Bei diesen Tieren kommt es zur endothelspezifischen Überexpression des humanen B2, der unter Kontrolle des murinen Tie-2-Promotors steht, sowie einem 10 Kb großem Fragment des ersten Introns des Tie-2-Gens (Tie-2-Enhancer), welcher für die endothelspezifische Expression in adulten Mäusen wichtig ist (Dao, 2011).

3.5.1 DIE ÜBEREXPRESSION DES BRADYKININ-2-REZEPTORS ERHÖHT DIE DURCH BRADYKININ VERURSACHTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Um die Bedeutung des B2 für die durch Bradykinin, Labradimil und Histamin induzierte vaskuläre Permeabilität zu erfassen, wurden transgene Versuchstiere mit endothelspezifischer Überexpression des humanen B2 verwendet (B2^{tg} bzw. BK⁺⁺), im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren (B2ⁿ bzw. BKⁿ). Wie in den vorhergehenden Versuchen wurde den Versuchstieren 30 µl einer 2 nmol Bradykinin-, Labradimil-, oder Histaminlösung i.d. injiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5-1 dargestellt.

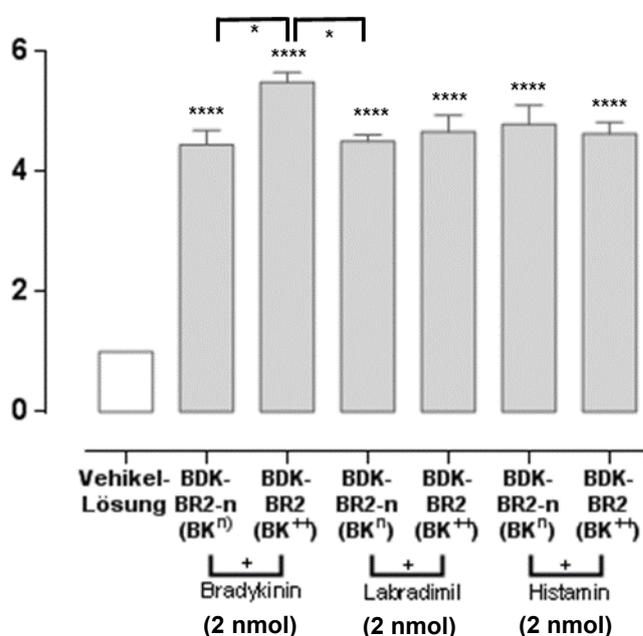


Abbildung 3.5-1 Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation in der dorsalen Haut von Versuchstieren der Linie B2^{tg} (BK⁺⁺) im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren (B2ⁿ bzw. BKⁿ), nach i.d. Injektion von Vehikel-Lösung (PBS, 30 µl, n=7), Bradykinin (30 µl, 2 nmol; n = 7), Labradimil (30 µl, 2 nmol; n = 7) oder Histamin (30 µl, 2 nmol; n = 7). Die Ergebnisse sind als -fache Induktion der durch PBS verursachten Extravasation ausgedrückt und als Mittelwert ± SD dargestellt.

Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant (p<0,0001);

Vergleich zwischen den angegebenen Behandlungen: * signifikant (p<0,05); einfache ANOVA; Tukey Test).

Bei den Versuchstieren der Linie B2^{tg} (BK⁺⁺), mit endothelspezifischen Überexpression des humanen B2 kam es durch i.d. Injektion von Bradykinin (30 µl, 2 nmol) zu einem 5,5 ± 0,16-fachen Anstieg der für die Vehikel-Lösung gemessene Evans-blue Extravasation. Bei den transgen-negativen Geschwistertieren kam es zu einer 4,5 ± 0,24 -fachen Erhöhung des

Referenzwertes der Vehikellösung. Für Bradykinin war der Unterschied zwischen beiden Mäuselinien statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Unter Verwendung von Labradimil oder Histamin kam es bei den transgenen Tieren zu einer geringeren durchschnittlichen Erhöhung der Permeabilität im Vergleich zur Bradykinin-Behandlung. Zusätzlich wurde für jeden der beiden Wirkstoffe kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt bezüglich des Vergleichs der Permeabilität in transgenen Tieren und deren Geschwistertieren.

Somit wurde in den transgenen Tieren eine stärker ausgeprägte Steigerung der Permeabilität durch Bradykinin im Vergleich zu Labradimil und Histamin verursacht. Bei den transgen-negativen Geschwistertieren wurde jedoch kein Unterschied zwischen Bradykinin, Labradimil und Histamin festgestellt.

3.5.2 REDUKTION DER VASKULÄREN PERMEABILITÄT DURCH ICATIBANT IN DER MAUSLINIE B2^{TG}

Um die Wirkung von Bradykinin und Icatibant im transgenen Mausmodell B2^{TG} weiter zu charakterisieren, wurden Versuchstiere und deren nicht-transgene Geschwistertieren mit Icatibant vorbehandelt (100 µg/kg KG). Diese Versuchsreihe wurde parallel mit Bradykinin und Histamin durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5-2 zusammengefasst.

Bei den nicht-transgenen B2ⁿ Versuchstieren kam es durch i.d. Injektion von Bradykinin (30 µl, 2 nmol) zu einer $4,45 \pm 0,24$ -fachen Erhöhung der für die Vehikel-Lösung gemessenen Evans-blue Extravasation. Bei der Mauslinie mit endothelspezifischen Überexpression des humanen B2 der Linie B2^{TG} (BK⁺⁺) war dieser Wert höher ($5,50 \pm 0,16$; $p < 0,05$).

Durch die Vorbehandlung mit Icatibant wurden die genannten Werte in hoch signifikanter Weise reduziert (B2ⁿ: $2,10 \pm 0,14$, $p < 0,0001$ und B2: $2,70 \pm 0,25$, $p < 0,0001$). Bei der Icatibant-bedingten Reduktion der Extravasation wurde jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt zwischen transgenen Tieren und deren Geschwistertieren.

Bei der Behandlung der Tiere mit Histamin statt Bradykinin wurde eine Erhöhung der Extravasation festgestellt im Bereich der 4,5 – 4,7 –fachen Werte der basalen Extravasation. Dabei ergaben sich keinerlei Unterschiede zwischen den Mäuselinien und durch Icatibant kam es zu keiner Reduktion der Extravasation.

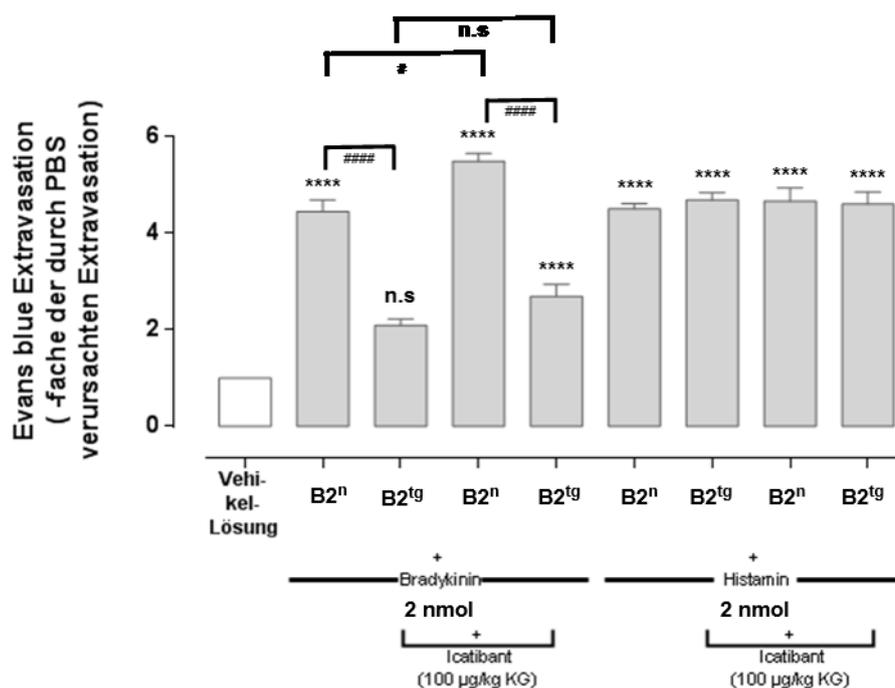


Abbildung 3.5-2 Vergleichende Quantifizierung der Evans blue Extravasation in der dorsalen Haut von Versuchstieren der Linie B2^{tg} (BK⁺⁺) im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren (B2ⁿ bzw. BKⁿ), nach Vorbehandlung mit Icatibant (100 µg/kg KG) und i.d. Injektion von Vehikel-Lösung; Bradykinin oder Histamin. Vehikel-Lösung: n=7; BDKBR2-n + Bradykinin (30 µl, 100 µM; n = 7); BDKBR2-n + Bradykinin (30 µl, 100 µM) + Icatibant (100 µg/kg KG) n = 3; BDKBR2 + Bradykinin (30 µl, 100 µM; n = 7); BDKBR2 + Bradykinin (30 µl, 100 µM) + Icatibant (100 µg/kg KG) n = 6. BDKBR2-n + Histamin (30 µl, 100 µM; n = 7); BDKBR2-n + Histamin (30 µl, 100 µM) + Icatibant (100 µg/kg KG) n = 3; BDKBR2 + Histamin (30 µl, 100 µM; n = 7); BDKBR2 + Histamin (30 µl, 100 µM) + Icatibant (100 µg/kg KG) n = 6.

Vergleich zur Vehikel-Lösung: **** signifikant (p<0,0001); Vergleich zwischen den angegebenen Behandlungen: n.s. nicht signifikant (p>0,05); # signifikant (p<0,05); #### signifikant (p<0,0001); einfache ANOVA, Tukey Test.

3.6 PHYSIOLOGISCHE EXTRAVASATION IM OHRMODELL DER MAUS

Die physiologische Extravasation wurde *in vivo* im Ohrmodell gemessen, unter Verwendung von 8-12 Wochen alten Versuchstieren der B2 überexprimierenden Mäuselinie B2^{tg} und deren Geschwistertiere B2ⁿ. Die Vorteile der Methode bestehen in der schnellen und gut reproduzierbaren Präparation für die 2-Photonen-Mikroskopie, sowie der guten Erreichbarkeit des Ohres.

Den Versuchstieren wurde zunächst der Farbstoff FITC-Dextran (MW 2,000,000, Sigma-Aldrich) in die Schwanzvene injiziert (20 mg/kg/KG, gelöst in 50µl 0,9% NaCl (Braun)). FITC-Dextran ist aufgrund seiner Molekülgröße nicht gewebedurchlässig und wird in den Gefäßen zurückgehalten. Anschließend wurde der gewebedurchlässige Farbstoff Alexa594-Dextran (MW 10.000 Thermo Fisher) in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert (5 mg/kg/KG, gelöst in 50µl 0,9% NaCl (Braun) und das emittierte Fluoreszenzsignal wurde in der gleichen Weise aufgezeichnet.

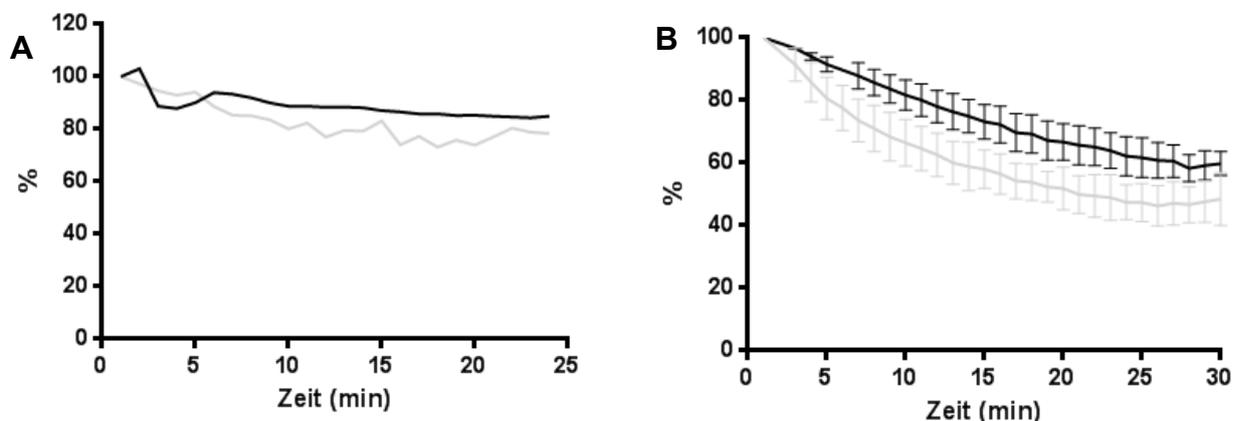


Abbildung 3.6-1 Physiologische Extravasation im Mausmodell mit vergleichender Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen in der B2-überexprimierenden Mäuselinie B2^{tg} (graue Linie; n=5 und den nicht transgenen Geschwistertieren B2ⁿ (schwarze Linie, n =5)
 (A) Prozentualer vaskulärer Verlauf des Fluoreszenzsignals des nicht gewebedurchlässigen Farbstoffs FITC-Dextran (Signalmessung alle 60 sek. über einen Zeitraum von 25 min.)
 (B) Prozentualer vaskulärer Verlauf des Fluoreszenzsignals des gewebedurchlässigen Farbstoffs Alexa594-Dextran (Signalmessung alle 60 sek. über einen Zeitraum von 30 min.)

Gemäß den physikalisch-chemischen Charakteristika des nicht gewebedurchlässigen Farbstoffs FITC-Dextran, wurde weder in den transgenen Versuchstieren noch in den

entsprechenden Geschwistertieren eine wesentliche Abnahme des vaskulären fluoreszenten Signals festgestellt (Abbildung 3.6-1-A). Wenn der Farbstoff Alexa594-Dextran verwendet wurde, so kam es in beiden Mäuselinien im zeitlichen Verlauf (30 min.) zu einer erhöhten Abnahme des fluoreszenten Signals (55 – 70% des ursprünglichen Wertes), was auf seine Gewebedurchlässigkeit zurückzuführen ist. Die Abnahme des fluoreszenten Signals war in der B2 überexprimierenden Mäuselinie B2^{tg} signifikant größer ($p < 0,05$) als in der Geschwistertiere B2ⁿ. Dies weist darauf hin, dass die Überexpression des B2 mit einer Steigerung der vaskulären Permeabilität einhergeht.

4 DISKUSSION

Die Regulierung der B2 Genexpression und Aktivität ist bisher noch nicht ausreichend untersucht. Eine derartige Regulation könnte zur Überstimulierung des BK2 Rezeptors führen, der eine wichtige Rolle spielt bei der Entstehung von Angioödemem mit allergischem oder hereditärem Ursprung (Bas, Hoffmann and Kojda, 2006).

Das Ziel dieser Studie war ein vertieftes Verständnis des pathophysiologischen Potentials der B2 Stimulation. Dafür wurde die Rolle von NO, Bradykinin, C1-INH, Icatibant und Diclofenac untersucht bezüglich der endothelialen Expression und Aktivität von B2 bzw. der involvierten Signalwege. Ein weiteres Ziel bestand darin, die damit assoziierten phänotypischen Änderungen zu evaluieren, durch Messung der Aortenkonstriktion in transgenen Mäusemodellen, sowie durch die Bestimmung der vaskulären Permeabilität mittels des Miles-Assays und der 2-Photonen-Mikroskopie. Da eine direkte Untersuchung dieser Fragen am Menschen nicht möglich ist, basierte der experimentelle Aufbau auf endothelialen Zellen (porcine Aorten-Endothelzellen, murine zerebrale Endothelzellen, endotheliale umbilikale Zellen) sowie auf verschiedenen Organen von Mäuselinien (Lunge, linksventrikuläres Gewebe, Haut, Ohr, thorakale Aortenringe).

Die damit verbundenen Fragestellungen sind nachfolgend aufgeführt, wobei die Ergebnisse der durchgeführten Studie diskutiert werden in Anbetracht aktueller Forschungsergebnisse zu den jeweilig bearbeiteten Themen:

- Welches ist die Wirkung von NO, Bradykinin, C1-INH oder Icatibant auf die Proteinexpression und Aktivität des B2?
- Welches sind die phänotypischen Veränderungen, in Bezug auf Aortenkonstriktion und vaskuläre Permeabilität, die sich aus einer veränderten NO-Bioverfügbarkeit ergeben, und welchen Einfluss hat die Behandlung mit Bradykinin, Labradimil und Histamin, in Kombination mit Icatibant, L-NAME oder Diclofenac auf die Bradykinin-vermittelten Effekte?

4.1 WIRKUNG VON NO, BRADYKININ, C1-INH ODER ICATIBANT AUF DIE PROTEINEXPRESSION UND AKTIVITÄT DES B2

4.1.1 VALIDIERUNG VERSCHIEDENER ANTI-B2-ANTIKÖRPER

Im Bereich der Proteinbiochemie dient der Western Blot zur qualitativen Analyse und dem semiquantitativen Nachweis einzelner Proteinen und Protein-Veränderungen (Renart, Reiser and Stark, 1979). Western-Blotting ist auch das Standardverfahren zur Validierung von Antikörpern, wobei die Antikörperspezifität durch die Anwesenheit einer Bande bestätigt wird, die dem vorhergesagten Molekulargewicht des Zielproteins entspricht. Da jedoch viele Proteine ähnliche Molekulargewichte aufweisen, ist eine Bande mit der richtigen Größe kein ausreichender Nachweis des gesuchten Zielproteins. Zudem ist die Kinetik der Antikörper-Antigen-Bindung kontextabhängig, daher muss die Validierung in einer möglichst anwendungsspezifischen Art und Weise durchgeführt werden.

Während des Western-Blotting-Verfahrens werden Proteine zumeist denaturiert und somit können post-translationale Modifikationen an dem nativen Protein experimentell nicht dargestellt werden. Ferner ist ein Western-Blot auch abhängig von der relativen Konzentration des Zielproteins in Bezug auf anderweitige Proteine der zu untersuchenden Probe. Selbst hoch spezifische und validierte Antikörper können eine Kreuzreaktivität mit Proteinen der Probe aufweisen, die nicht dem Zielprotein entsprechen. Nachdem die Wahrscheinlichkeit eines korrekten Nachweises des Zielproteins mit ansteigender Konzentration zunimmt, kann es notwendig sein, Zellysate zu verwenden bei denen das zu untersuchende Protein überexprimiert ist. Ein weiterer Ansatz zum Nachweis der Antikörper-Spezifität im Western-Blot ist die Verwendung von Zellysaten aus Zelllinien welche das Zielprotein exprimieren oder nicht. Negative Kontrollzelllinien können auch durch Verwendung von RNA-Interferenz (RNAi) abgeleitet werden, zur zielgerichteten Abschaltung von Genen (Älgenäs *et al.*, 2014).

Die Bindung an das Zielmolekül und eine geringe Kreuzreaktivität sind die beiden grundlegenden Kriterien welche funktionelle Antikörper erfüllen müssen. Dabei ist die Spezifität eines Antikörpers abhängig von den physikalischen Eigenschaften der Bindungsstelle, aber auch den Versuchsbedingungen des Western-Blots. Bei der enormen Komplexität des gesamten Proteoms eines Organismus, besteht immer die Möglichkeit der Reaktion mit ähnlichen Proteinen. Zur Validierung von Antikörpern ist die Western-Blot Analyse ein häufig verwendetes Verfahren (Burnette, 1981), denn damit kann die Größe des Zielproteins bestimmt werden und eine eventuell vorliegende Kreuzreaktivität des Antikörpers festgestellt werden. Die WB-Analyse wird als die gängigste Validierungsmethode für

Antikörper betrachtet, obwohl mit dieser Methode verschiedene Einschränkungen verbunden sind.

Dementsprechend hat das Europäische Netzwerk für Antikörper einen Leitfaden (www.euromabnet.com/guidelines/) für die Validierung von Antikörpern veröffentlicht (Roncador *et al.*, 2016). Folgende Aspekte sind bei der Validierung erforderlich:

- Reaktivität mit dem Zielprotein
- Spezifität mit dem Zielprotein
- Nachweis der Eignung in den zu untersuchenden Zell- und Gewebearten
- Nachweis von Reaktivität und Spezifität in der(n) zu untersuchenden Art(en)
- Negative experimentelle Kontrolle für nicht-spezifische Reaktivität

Gemäß dieses Leitfadens sollten im Idealfall stets unterschiedliche Antikörper parallel untersucht werden, zumal ähnliche Muster der Antikörper-Reaktivität die Validierung der Daten bestätigen. Im Idealfall sollten mehrere Antikörper getestet werden, unter Einschluss von 2 positiven und 2 negativen Zelllinien oder Gewebearten, wobei die für die Studie relevante Zelllinie oder Gewebeart mit einbezogen wird. Dies ist besonders wichtig, wenn Zelllinien und Gewebearten von unterschiedlichen Organismen verwendet werden, da hier die Möglichkeit der unspezifischen Bindung besonders hoch ist. Wenn Antikörper gegen Proteine der Maus verwendet werden, dann sollten stets die entsprechenden KO-Linien auch mit untersucht werden (sofern es sich auch um einen Verlust des Epitops handelt und nicht nur um einen Funktionsverlust z.B. durch Trunkierung).

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden monoklonalen Antikörper B2_M (Maus, Bindung an nicht-glykosylierten B2) und B2_K (Kaninchen, Bindung an glykosylierten B2) eingesetzt. Zur Validierung beider Antikörper wurden verschiedene Western-Blot-Experimente in Zelllinien und Mäusegewebe durchgeführt, um deren Spezifität bezüglich der Bindung an B2 abzuschätzen. Um den Einfluss der DEA/NO-Behandlung auf die Antikörper-Bindung zu bewerten, wurden die Vorversuche in Zelllinien mit unbehandelten Zellen durchgeführt, im Vergleich zu Zellen die einer 3-stündigen DEA/NO-Behandlung unterzogen wurden. In der murinen cerebralen Endothelzelllinie bEND.3 und in PAEC-Zellen wurde eine spezifische Bindung des Antikörpers B2_M beobachtet. Die erwartete Doppelbande bei 42 kD erwies sich jedoch als geringer (**Abbildung 3.1-1 A und B, s. 3.1.1**). Dies beruht auf der Tatsache dass die Migration des Zielproteins im Gel nicht nur von der Proteingröße beeinflusst wird, sondern auch durch die Ladung der Proteine, den Grad der Denaturierung sowie der Anwesenheit/Abwesenheit von hydrophoben Regionen. Daher können sich falsche Schlüsse ergeben aus dem einfachen Vergleich mit einem Proteinmarker. Proteine können zudem posttranslationale Modifikationen aufweisen (z.B. Glykosylierung), die das scheinbare

Molekulargewicht in der SDS-PAGE beeinflussen. Daher ist auch keine klare Beziehung vorhanden zwischen dem Molekulargewicht das aus der Genom-Sequenz vorausgesagt wird und dem tatsächlichen Genprodukt mit post- translationalen Modifikationen. Je nachdem welches Epitop mit dem Antikörper interagiert, besteht zudem die Möglichkeit dass mehr als ein Protein aus der gleichen Proteinfamilie erkannt wird. Dies kann das Vorhandensein von 2 Banden erklären. So ergab z.B. die systematische Western-Blot-Validierung von 13.000 Antikörper mit Lysaten aus humanem Plasma, Zelllinien und Gewebearten (unter standardisierten Bedingungen) eine spezifische Markierung für 45% der untersuchten Antikörper. Proteinbanden mit unerwarteten Größen wurden in 43% der Fälle festgestellt, bei 12% konnte keine Markierung erzielt werden (Älgenäs *et al.*, 2014).

Für den B2_K-Antikörper war nur eine spezifische Bande in bEND.3 Zellen nachweisbar (**Abbildung 3.1-1 C, s. 3.1.1**), nicht jedoch in PAEC Zellen (**Abbildung 3.1-1-D, s. 3.1.1**), was möglicherweise auf eine Variation bei der Arten-Spezifität hinweist zumal es sich um ein provines Zelllysate handelt und einen Kaninchen-Antikörper.

Die weiteren Validierungen wurden mit Zellaufschlüssen aus Lungen- und Hautgewebe der Mäuselinien C57BL/6 und eNOS^{-/-} durchgeführt, wobei die Linie B2^{-/-} als Kontrolle eingesetzt wurde. Für die Linien C57BL/6 und eNOS^{-/-} konnte erneut eine spezifische Bindung beider Antikörper nachgewiesen werden, unabhängig von dem verwendeten Zelllysate (**Abbildung 3.1-2, s. 4.1.1**). Erneut wurde im Fall des B2_M eine Doppelbande mit geringerer Molekülgröße festgestellt, was auf die bereits erwähnten Gründe zurückgeführt werden könnte. In der Negativkontrolle (Linie B2^{-/-}) war eine sehr schwach ausgeprägte Bande für B2_K nachweisbar, bei Einsatz des B2_M war keine Bande vorhanden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die bessere Spezifität des B2_M, der auch im Verlaufe aller weiteren Versuche verwendet wurde.

4.1.2 DER EINFLUSS VON NO AUF DIE ENDOTHELIALE B2 EXPRESSION IN KULTIVierten ZELLEN

Die biologischen Wirkungen von NO sind zahlreich und komplex. Stickstoffmonoxid wurde als erstes gasförmiges Signalmolekül entdeckt und wirkt an verschiedenen zellulären Prozessen, die vor allem in Gefäßzellen stattfinden (SoRelle, 1998). Später wurde auch die Bedeutung von NO es in Entwicklungsprozessen gezeigt, sowie dessen Regulation einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen (Christopherson and Bredt, 1997; MacMicking, Xie and Nathan, 1997; Hibbs and Bastian, 1999; Bogdan, Röllinghoff and Diefenbach, 2000; Mayer, 2000; Bogdan, 2001a, 2001b). NO spielt eine Schlüsselrolle bei der physiologischen Regulation des kardiovaskulären Systems, da Anomalien bei der NO-Produktion oder Bioverfügbarkeit Krankheiten wie Bluthochdruck, Arteriosklerose und Angiogenese-assoziierten Störungen (Moncada and Higgs, 2006; Pacher, Beckman and Liaudet, 2007; Vanhoutte, 2009; Vanhoutte *et al.*, 2009) vorausgehen bzw. diese begleiten. Stickstoffmonoxid übt auch physiologische Funktionen im Nerven- und Immunsystem aus, die für die Regulierung des Verhaltens wichtig sind. Darüber hinaus ist bekannt dass NO die Magen-Darm-Motilität steuert und auch beteiligt ist an Abwehrmechanismen gegenüber Infektionskrankheiten und Tumoren (Hibbs *et al.*, 1988; Bredt, Hwang and Snyder, 1990; Bredt and Snyder, 1992; Bogdan, 2001a; Napoli and Ignarro, 2001; Toda and Nakanishi-Toda, 2011; Toda, Ayajiki and Okamura, 2012).

Der vasodilatatorische Effekt von NO wurde beschrieben durch die Aktivierung der löslichen Isoform der Guanylylcyclase (sGC), der mit der Bildung von cGMP einhergeht, sowie der nachfolgenden Aktivierung von Ionenkanälen und cGMP-abhängigen Kinasen (Zhao *et al.*, 1999; Bellamy *et al.*, 2000). Außer sGC wurden jedoch in den vergangenen Jahren zahlreiche andere Zielmoleküle identifiziert, von denen viele Teil intrazellulärer Signalketten sind, die zur Aktivierung oder Repression zahlreicher Gene beitragen. Diese werden vermittelt durch die Modulation von Transkriptionsfaktoren, der Translation oder die Stabilität der mRNA oder post-translationalen Modifikationen primärer Genprodukt. Ein Nachweis von DNA-Elementen innerhalb der Promotorregion eukaryotischer Gene, die direkt auf NO reagieren gibt es nach unserem gegenwärtigen Kenntnisstand bisher noch nicht.

Es ist bekannt, dass NO in der Blutgefäßwand durch die endotheliale NOS (eNOS) hauptsächlich aus L-Arginin gebildet wird. Zusätzlich gibt es jedoch weitere Mechanismen der vaskulären NO-Synthese (Andrew and Mayer, 1999; Zweier, Samouilov and Kuppasamy, 1999; Chen, Pittman and Popel, 2008; Zhao, Vanhoutte and Leung, 2013). Als die Gefäßfunktion regulierende Isoform der NO-Synthasen (Boo *et al.*, 2002; Förstermann and

Münzel, 2006) wird die Aktivität von eNOS durch verschiedene Stimuli reguliert. Dazu gehören Scherkräfte (Rubanyi, Romero and Vanhoutte, 1986; Kuchan, Jo and Frangos, 1994; Xiao *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1999; Boo *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2010; Kolluru *et al.*, 2010), Acetylcholin (Chen Hi, Chiang and Jen; Xu, Tong and Eisenach, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Kellogg *et al.*, 2005), Bradykinin (Davisson *et al.*, 1996; Danser *et al.*, 1998; Coppo and Amore, 2000; Bae *et al.*, 2003), Histamin (Mannaioni *et al.*; Kishi, Nakaya and Ito, 1998; Lantoine *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003; Mondillo *et al.*, 2009) und 17β -Estradiol (Caulin-Glaser *et al.*, 1997; Nekooeian *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Selles *et al.*, 2001; Miyazaki-Akita *et al.*, 2007), wobei Ca-abhängige und Ca-unabhängige Signalwege involviert sind.

Bradykinin vermittelt über die Bindung an den B1 und B2 die Freisetzung der NO und Prostaglandinen als vasodilatatorischen Mediatoren. Durch die Bradykinin-vermittelte Aktivierung des B2 kommt es zur Aktivierung der MAPK Kaskade (Phospholipase C, PLC β ; Proteinkinase C, PKC und MAP Kinase) über G_{aq}. Dabei werden auch eNOS und PLA₂ aktiviert. (s. auch Abbildung 1.2-5) (Moreau *et al.*, 2005; Bas, Adams, *et al.*, 2007; Maurer *et al.*, 2011; Couture, Blaes and Girolami, 2014). Ursprünglich ging man davon aus, dass eNOS über den B2 mittels eines Mechanismus reguliert wurde, der über ein G-Protein vermittelt wurde. Die Ergebnisse von Ju *et al.* (Ju *et al.*, 1998) haben jedoch gezeigt, dass die eNOS auch über eine direkte Interaktion mit dem B2 reguliert wird. Durch in vitro-Versuche konnten die Autoren zeigen, dass ein Glutathion S-transferase Fusionsprotein welches die 4. intrazelluläre Domäne des B2 enthielt, an eine rekombinante eNOS bindet. Dabei wurde eine selektive Hemmung der Aktivität von eNOS durch das Fusionsprotein festgestellt. Auch ein synthetisches Peptid der 4. intrazellulären Domäne des B2 hemmte die Aktivität der eNOS. Weitere Versuche bestätigten die Interaktion zwischen eNOS und der B2 durch Koimmunopräzipitation aus endothelialen Zellsaten und unter Verwendung von Antikörpern gegen B2 oder eNOS (Venema, 2002). Reversible inhibitorische Interaktionen finden demnach nicht nur zwischen eNOS und Caveolin-1 statt, sondern auch mit dem B2. Wurden endotheliale Zellen mit BK behandelt, so kam es zu einer schnellen Dissoziation des eNOS-B2.

Die Regulation des vasodilatatorischen Effekts von NO ist in Abbildung 4.1-1 veranschaulicht. Die eNOS katalysiert in Gegenwart des Kofaktors BH₄ die Oxidation von L-Arginin zu N-Hydroxyarginin und schließlich den Abbau zu L-Citrullin und NO (Alp and Channon, 2004). Zudem kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die zu einer transienten Tyrosin-Phosphorylierung führt, gefolgt von einem Anstieg an Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol. Dies ist verbunden mit einer erhöhten intrazellulären Freisetzung von Ca²⁺ und einem vermehrten Ca²⁺-Einstrom (Adams *et al.*, 1989), wodurch eNOS aus den Caveoli freigesetzt wird (Feron and Balligand, 2006), oder die Transkription der eNOS wird hochreguliert (Emanuelli *et al.*, 2004).

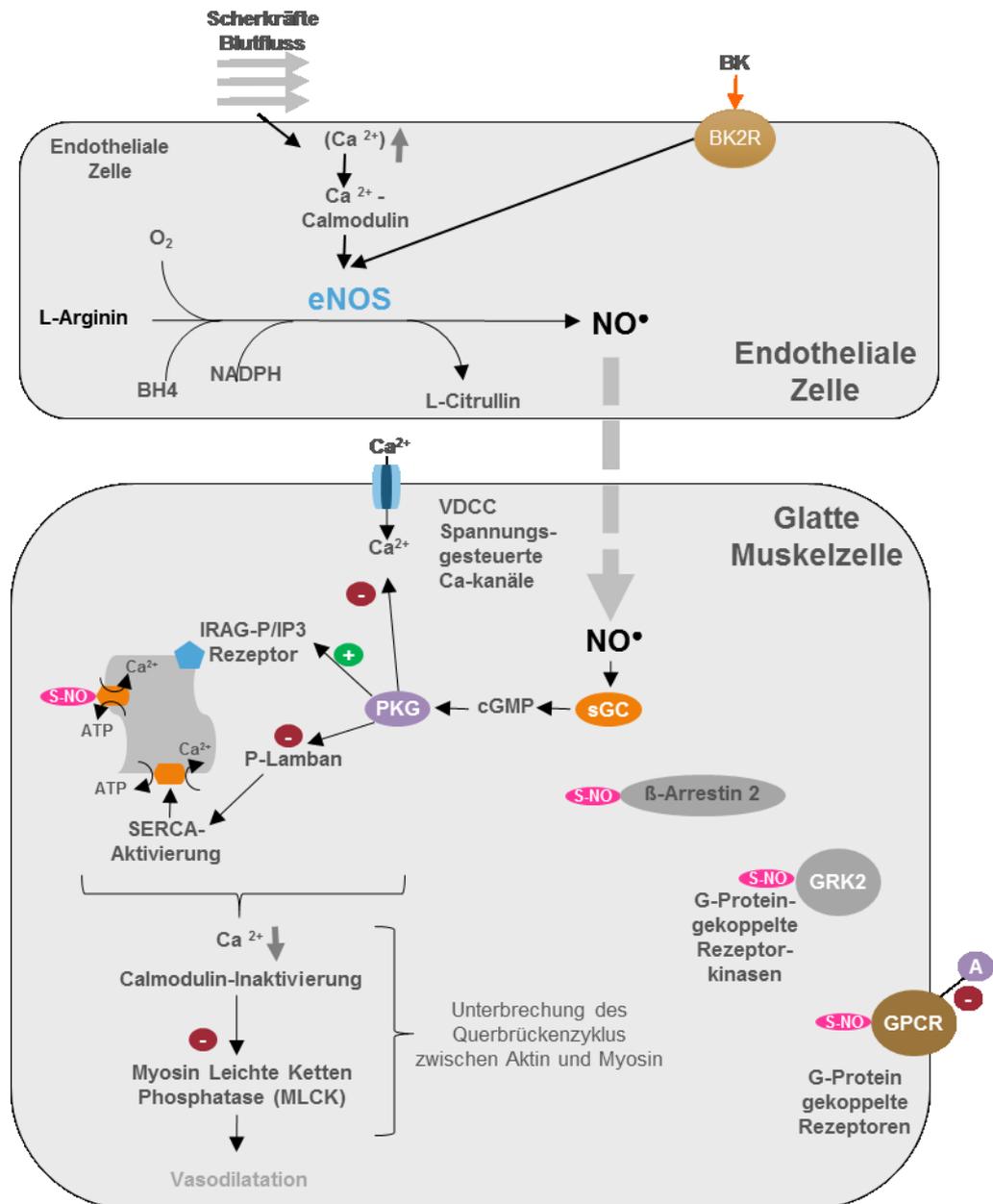


Abbildung 4.1-1 Regulation des Gefäßtonus durch Stickstoffmonoxid (NO). NO reguliert den Gefäßtonus durch drei verschiedene Signalwege. I: Stimulierung der NO löslichen Guanylat-Cyclase (sGC) in den vaskulären glatten Muskelzellen mit cGMP-Synthese. Dadurch wird die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, die den Ca^{2+} -Einstrom über Spannungsgesteuerten Ca-Kanäle (VDCC) verhindert, sowie auch die Ca^{2+} -Freisetzung über den Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3)-Rezeptor (IP3R). PKG wirkt auch auf die Ca-ATPase des Sarcoplasmatischen Retikulum (SERCA) und fördert die Wiederaufnahme von zytosolischem Ca in das Sarcoplasmatische Retikulum (SR). Dadurch sinkt die intrazelluläre Ca-Konzentration und Calmodulin wird inaktiviert, wodurch die Myosin Leichte Ketten Phosphatase (MLCK) nicht mehr aktiviert werden kann. Daraus ergibt sich eine Unterbrechung des Querbrückenzyklus zwischen Aktin und Myosin und es kommt zur Vasodilatation. S-nitrosylierung durch NO. S-Nitrosylierung steigert die Aktivität der SERCA, wodurch es zu einer beschleunigten intrazellulären Ca-Reduktion kommt, welche zur zellulären Entspannung beiträgt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) können durch NO direkt nitrosyliert werden, wodurch die Bindung von Liganden an den Rezeptor verhindert wird. Die S-Nitrosylierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) verhindert die Desensibilisierung und Internalisierung von β -Adrenozeptoren und die S-Nitrosylierung von β -Arrestin 2 erhöht die Internalisierung des Rezeptors (Quellen: (Oliveira-Paula, Lacchini and Tanus-Santos, 2015; Zhao, Vanhoutte and Leung, 2015))

Die Diffusion von NO durch die Membran der glatten Gefäßmuskelzellen verursacht die Aktivierung der Guanylatzyklase, welche die Konversion von Guanosin triphosphat in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert. cGMP aktiviert die Proteinkinase G-1 (PKG1), die verschiedene zelluläre Proteine phosphoryliert. Dazu gehören 1,4,5 Inositoltriphosphat (IP3) und das IP3-Rezeptor assoziierte cGMP-Kinase Substrat IRAG, welche zu einer Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beitragen. PKG wirkt auch auf die Ca-ATPase des Sarco-/Endoplasmatischen Retikulum (SERCA) und fördert die Wiederaufnahme von zytosolischem Ca^{2+} in das Sarcoplasmatische Retikulum (SR). Eine weitere Wirkung der PKG beruht auf der Hemmung des Ca^{2+} -Einstroms über spannungsgesteuerte Ca-Kanäle (VDCC). Insgesamt nimmt daher die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stark ab, und es kommt nicht mehr über die Calmodulin-vermittelte Aktivierung der Myosin Leichte Ketten Phosphatase (MLCK), was zur Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur führt.

Vasodilatatorische Effekte werden aber auch über S-nitrosylierte Proteine vermittelt, wobei es zu einer reversiblen Bindung von NO an Thiol-Gruppen kommt (in der Regel der Aminosäure Cystein). Von besonderer Bedeutung für den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur, wird durch die S-Nitrosylierung die Expression und Funktion von G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) reguliert (Whalen *et al.*, 2007; Daaka, 2012), z.B. der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2), die β -Adrenozeptoren phosphoryliert und deren Desensibilisierung und Internalisierung induziert. Somit ändern NO und S-Nitrosothiole den Verlust der β -adrenergen Signalisierung *in vivo* durch S-Nitrosylierung von GRK2, was zu einer Verringerung der GRK2-vermittelten Phosphorylierung von β -Adrenorezeptoren führt, sowie zu einer Abnahme der Rezeptor-Desensibilisierung und Internalisierung (Whalen, Johnson and Lewis, 2000; Whalen *et al.*, 2007).

In der klinischen Forschung wird bei Patienten die an Herz-Kreislauf- Erkrankungen leiden davon ausgegangen, dass die durch ACE-H bedingte Verstärkung einer durch Acetylcholin und/oder Hyperämie induzierten Endothel-abhängigen Vasodilatation auf eine erhöhte vaskuläre NO Bioverfügbarkeit hinweist. Insofern stellt sich die Frage nach der Regulation der eNOS-Signaltransduktionskaskade bei der medikamentös induzierten Störung des natürlichen Abbaus von Bradykinin, die durch Verabreichung von ACE-H zustande kommt. Es wäre möglich, dass die Regulierung der B2 zu dem HAE und ACE-H induziertem Angioödem beitragen kann, bzw. auch die Wirksamkeit von Wirkstoffen wie C1-INH oder Icatibant beeinflusst.

Um diese Hypothese einer NO-vermittelten Regulation des B2 zu untersuchen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit zunächst verschiedene Zellsysteme verwendet, z.B. porcine Aortenendothelzellen (PAEC), murine cerebrale Endothelzellen (b.END) und endotheliale

umbilikale Zellen (HUVEC). Der Einsatz unterschiedlicher Zellsysteme beabsichtigte die Erfassung eventueller Unterschiede bei der Ansprechbarkeit des B2 auf eine NO-vermittelte Regulation. Dabei wurden spezifische Gleichgewichts-Konzentrationen (steady-state level) von NO verändert durch den Zusatz (100 μM) des kurz wirksamen NO Donors DEA/NO (3 h Inkubation) sowie des lange wirkenden NO-Donors DETA/NO für bis zu 24 h.

Nach Inkubation mit dem NO-Donor DEA/NO für 3 h wurde in keiner der genannten Zellarten eine statistisch signifikante Veränderung der relativen Proteinexpression des B2 festgestellt (s. Abbildung 3.1-3 (**3.1.2.1**), Abbildung 3.1-5 (**3.1.2.2**), Abbildung 3.1-8 (**3.1.2.3**)). Auch bei dem Einsatz des NO Donors DETA/NO zur längerfristigen konstanten NO-Generation über 3h oder 24 h in bEND.3 Zellen, kam es nicht zu einer vermehrten Proteinsynthese von B2 (s. Abbildung 3.1-6; **3.1.2.2**). Dabei wurde in diesen Zellen kein Unterschied festgestellt bezüglich der Wirkung der beiden NO Donoren DEA/NO und DETA/NO (s. Abbildung 3.1-5 und Abbildung 3.1-6; **3.1.2.2**). Die Wirkung des NO Donors DEA/NO wurde in bEND.3 Zellen sowohl auf Ebene der Transkription (Real-Time PCR) als auch der Proteinexpression (Western Blot) untersucht. Unter Zusatz von DEA/NO (10 μM , 3 h) wurde keine statistisch signifikante Erhöhung der Expression von m-RNA oder Protein des B2 festgestellt (s. Abbildung 3.1-5 und Abbildung 3.1-7; **3.1.2.2**). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass NO generell keine rückkoppelnde regulatorische Wirkung auf die vaskuläre B2 Expression hat. Dies scheint ein generelles zelluläres Geschehen zu sein, zumal es sich um Zellen unterschiedlicher Organe sowie Organismen handelt (Schwein (PAEC), Maus (bEND.3) und *H. sapiens* (HUVECs)). Unsere Versuche in PAEC haben zudem gezeigt, dass eine 3-stündige Inkubation der Zellen mit BK (100 μM) keinen statistisch signifikanten Einfluss hat auf die Proteinexpression, sondern es zu einer leichten jedoch nicht signifikanten Erhöhung der Expression des B2 kommt, von 100 % (Vehikel-Lösung) auf $122,8 \pm 21,7\%$ (s. Abbildung 3.1-4, (**3.1.2.1**)).

In unseren Untersuchungen hat jedoch selbst eine NO-Konzentration die etwa 1000-mal höher war als die Gleichgewichtskonzentration von NO im humanen Gefäßsystem *in vivo* (Vallance *et al.*, 1995; Kojda *et al.*, 1998) die B2 Expression in PAEC und bEnd.3 Zellen nicht erhöht. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Versuche aus unserem Labor, wobei PAEC Zellen und porcine glatte Muskelzellen der Aorta mit dem NO-Donor S-nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) behandelt wurden. Eine Wirkung von NO auf die vaskuläre Expression von B2 konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Kocgirli *et al.*, 2010). Dem gegenüber wiesen jedoch bereits mehrere Autoren nach, dass die Bioverfügbarkeit von endotheliale NO die Expression verschiedener Proteine reguliert.

Mit ihren Untersuchungen konnten Fukai *et al.* (Fukai *et al.*, 2000) zeigen, dass die durch den NO-Donor erhöhte NO-Bioverfügbarkeit die Expression der extrazellulären Superoxid-

Dismutase (ecSOD) aus glatten Gefäßmuskelzellen der humanen Aorta in einer Zeit- und Dosisabhängigen Weise (0-24 h; 10 – 100 μM) erhöht. Der biologische Hintergrund dieser wichtigen Regulation besteht in der Tatsache dass NO sowohl ein Biosignal darstellt, als auch ein toxisches Radikal mit freien Elektronenpaaren. Daher kann es bei der Anwesenheit von Superoxid-Radikalen (O_2^*) zur Bildung des hoch reaktiven Peroxinitrits kommen, welches Schäden an Enzymen, DNA, Mitochondrien und Membranen verursacht. Gleichzeitig können auch Signalkaskaden verändert beziehungsweise gestört werden, was mit der Einleitung von apoptotischen oder nekrotischen Prozessen in Zusammenhang gebracht wird, sowie auch mit kardiovaskulären Erkrankungen, sowie Schmerz, Neurodegeneration, Alterung und Erkrankungen des Immunsystems. Die extrazelluläre Superoxid-Dismutase (ecSOD) stellte daher einen wichtigen zellulären Schutzmechanismus dar. Wenn in den Versuchen von Fukai et al., (2000) die Guanylatcyclyase gehemmt wurde durch den Inhibitor ODQ und die Proteinkinase G mittels des Inhibitors Rp-8-CPT-cGMP, dann wurde die durch DETA-NO vermittelte Erhöhung der Expression der extrazellulären Superoxid-Dismutase (ecSOD) nicht beobachtet. Dabei konnte auch gezeigt werden dass der regulatorische Effekt von NO über cGMP vermittelt wird, nicht jedoch über cAMP. Die Wirkung von NO auf die ecSOD Expression wurde durch Inhibition der MAP-Kinase-p38, nicht jedoch der MAP-Kinase-Kinase-p42/44 verhindert, wodurch die Mitwirkung der MAP-Kinase-p38 an der Signalkaskade zur NO-vermittelten Wirkung auf ecSOD gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse wurden auch von Oppermann et al. (Oppermann *et al.*, 2009) bestätigt und haben gezeigt, dass die NO-Bioverfügbarkeit die Expression und Aktivität der ecSOD reguliert. Dabei stellte sich heraus, dass die vermehrte NO-Freisetzung durch PETN oder die Verwendung einer eNOS^{+/+} Mäuselinie zu einem 2,5 bis 3,6-fachen Anstieg der ecSOD Proteinexpression im Lungen- und Aortengewebe führte. Eine erhöhte Expression der mRNA wurde jedoch nicht festgestellt, was auf eine post-translationale Regulation hinweist. Eine alternative Erklärung wäre die ecSOD Proteinsynthese in anderen Organen oder Geweben mit anschließendem Transport in das Lungen- bzw. Aortengewebe.

Weitere Beispiele belegen die Bedeutung des NO-vermittelten Mediatorsystems bei der Regulation der Expression vasoprotektiver Proteine. So wurde im Rahmen der Dissertation von Dao (Dao, 2011) untersucht, ob das körperliche Training die Expression arterieller Proteine wie B2 oder AT2-Rezeptor reguliert. Dazu wurden C57Bl/6- und transgene Mäuse unterschiedlichen Trainingsprotokollen (erzwungen oder freiwillig) ausgesetzt. Nach beiden Trainingsformen ergab die quantitative Auswertung der Western-Blots eine signifikante Hochregulation des AT2-Rezeptors im Vergleich zu den untrainierten Kontrolltieren. Es stellte sich zudem heraus, dass dies verursacht wurde durch die trainings-induzierte Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit, zumal es in trainierten eNOS^{-/-} - Mäusen durch körperliches Training zu keiner Veränderung der AT2-Rezeptor-Expression kam. Die trainingsbedingte veränderte NO-

Bioverfügbarkeit hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Expression der antioxidativ wirksamen Hämoxigenase bzw. des B2. Obwohl in den Versuchen von Dao Labortiere der Linie C57BL/6 statt Zelllinien verwendet wurden und die NO-Bioverfügbarkeit durch körperliches Training verändert wurde (und nicht durch DEA/NO bzw. DETA/NO), steht die nicht vorhandenen Regulation der B2-Expression durch NO in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen.

4.1.3 EFFEKT VON NO AUF DIE B2 -INDUZIERTER CA²⁺ SIGNALGEBUNG

Die intrazytoplasmatischen Konzentration des freien Calciums wird im Wesentlichen durch die folgenden Mechanismen reguliert (Rang *et al.*, 2007).

- Calcium-Transporter und Ionenkanäle in der Plasmamembran
- Calcium-Aufnahme in intrazelluläre Speicher
- Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

Dabei befindet sich in einer ruhenden Zelle der größte Anteil des intrazellulären Calciums im endoplasmatischen Retikulum oder dem sarkoendoplasmatischen Retikulum als zellulären Speichern.

Intrazelluläre Calcium-Konzentration können gemessen werden durch Verwendung von calciumsensitiven Farbstoffen. Diese sollten eine nicht-invasive Messung der Ca²⁺-Konzentration ermöglichen und eine hohe Selektivität für die Bindung an Ca²⁺-Ionen haben. Zusätzlich sollten derartige Farbstoffe eine gute Zellgängigkeit haben, um Zellwände oder Membranen effektiv zu durchdringen, wobei sie jedoch auch keine Wechselwirkungen mit zellulären Vorgängen eingehen sollten. Ca-sensitive Farbstoffe haben nach Ca²⁺-Bindung eine erhöhte Fluoreszenz und werden bei vielen Untersuchungen zur Calcium-vermittelten Signalübertragung verwendet die mit intrazellulärem Ca²⁺-Zufluss bzw. -Freisetzung oder -Speicherung einhergehen. Das Fluoreszenzsignal aus diesen Zellen wird dann in der Regel mittels Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Assays, Fluoreszenz-Mikroskopie oder Durchflusszytometrie gemessen.

Wie bereits erläutert (siehe 4.1.2), führt die Bindung von BK an B1 und B2 zu einer G_{αq}-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C (PLCβ), Proteinkinase C (PKC) und MAP Kinase, wobei die eNOS aktiviert wird. Endothelzellen bilden in vivo eine Schnittstelle zwischen fließendem Blut und Gefäßgewebe, und wirken regulierend auf humorale und physikalische Reize indem Signalmoleküle freigesetzt werden, die entspannend oder

kontrahierend auf die Gefäßmuskelzellen wirken, und dadurch zur vaskulären Homöostase beitragen. Wie bereits dargestellt, (s. **4.1.2**), ist die Aktivierung der B1 und B2 mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verbunden, die durch Ca^{2+} Einstrom über Ionenkanäle und durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern vermittelt wird. Durch die Erhöhung der NO-Konzentration in den Endothelzellen und Diffusion in die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur kommt es dort zur Regulation des Gefäßtonus. Die im Rahmen der bereits vorgestellten Signalwege sinkende intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration (s. **Abbildung 1.2-5, 4.1.2** und **Abbildung 4.1-1**) trägt zur zellulären Entspannung bei, indem der Querbrückenzyklus zwischen Aktin und Myosin unterbrochen wird.

Über den B2 bewirkt BK eine transitorische Mobilisierung von nukleoplasmatischem Ca^{2+} (Savard *et al.*, 2008). Im Rahmen unserer Versuche wurde gezeigt dass die beschriebenen Mechanismen in endothelialen bEND.3 Zellen vorkommen, die mit unterschiedlichen BK-Konzentrationen (0,01 – 1000 μM) behandelt wurden. Wie erwartet, ging mit steigenden BK-Konzentrationen eine Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration einher (**Abbildung 3.1-9, s. 3.1.3.1**). Dieser Signalweg ist nicht nur auf Endothelzellen beschränkt, und wurde z.B. auch in der Neuroblastom-Glioblastom-Zelllinie NG108-15 beschrieben (Imanishi *et al.*, 2006).

Icatibant ist ein hoch selektiver B2 Antagonist (Wirth, Heitsch and Schölkens, 1995; Fincham *et al.*, 2009), der Affinität für den B2 hat, nicht jedoch für den B1 oder andere Peptid-Rezeptoren (Rhaleb *et al.*, 1992). Dadurch hemmt Icatibant die durch BK induzierte Vasodilatation (Cockcroft *et al.*, 1994) und wird bei der Behandlung des HAE eingesetzt, wodurch es zu einer signifikanten Verringerung des Zeitraums bis zum Abklingen der ödematösen Symptome kommt, im Vergleich zu herkömmlichen Therapien (Cicardi *et al.*, 2010; Lumry *et al.*, 2011). In unseren Versuchen führte der Zusatz steigender Icatibant-Konzentrationen (1-100 μM), in Kombination mit einer konstanten BK-Konzentration (50 μM) zu einer starken und konzentrationsabhängigen Abnahme der $i\text{Ca}^{2+}$ - Konzentration (**Abbildung 3.1-10, s. 3.1.3.2**), was auf eine Hemmung von B2 durch Icatibant hinweist. Dieser Effekt wird über die Bindung von BK an den B2 vermittelt, in Übereinstimmung mit der früheren Beschreibung von Icatibant als hoch selektiven, kompetitiven und schnell wirksamen Antagonisten des B2 (Cruden and Newby, 2008; Banerji, 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben auch gezeigt, dass NO keinen Einfluss auf die Mobilisierung von $i\text{Ca}^{2+}$ aus intrazellulären Pools hat. Der durch BK induzierte Anstieg von $i\text{Ca}^{2+}$ wurde nicht statistisch signifikant verändert durch Prä-Inkubation (3 h) von bEND.3 Zellen mit dem NO-Donator DEA/NO (10 μM) (**Abbildung 3.1-11 s. 3.1.3.3**). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stimmen überein mit der Tatsache, dass NO die durch $\text{G}_{\alpha\text{q}}$ -Protein abhängige BK-Signalisierung nicht moduliert (Bas *et al.*, 2010), und auch den BK-induzierten Signalweg

über PLC nicht beeinflusst. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen stimmen auch überein mit den Daten von Savard et al. (Savard *et al.*, 2008), die eine transitorische nukleoplasmatische Mobilisierung von iCa zeigten, welche nur durch den B2 Antagonisten HOE 140 blockiert wurden, nicht jedoch durch den B1 Antagonisten R954. Dabei wurde die Mobilisierung von iCa nur in C57/Bl6 Mäusen beobachtet, nicht jedoch in B2-KO Mäusen.

4.1.4 EFFEKT DER VASKULÄREN NO BIOVERFÜGBARKEIT AUF DIE B2-PROTEIN-EXPRESSION *IN VIVO*

Kinine wie BK, LysBK oder Kollidin sind extrazellulär gebildete proinflammatorische Peptide, die in Reaktion auf pathologische Reize gebildet werden und über G-Protein -gekoppelten Rezeptoren B1 und B2 wirken. Diese Rezeptoren sind physiologisch durch die Stimuli und ihre gemeinsame Beteiligung an einer Vielzahl von Entzündungsreaktionen gekennzeichnet (z.B. Vasodilatation, vaskuläre Permeabilität, Hyperalgesie und Schmerzen). Der funktionelle Unterschied zwischen beiden Rezeptoren liegt vor allem in der Expression und Regulation. Der B2 wird überwiegend konstitutiv exprimiert und unterliegt einer raschen und homologen Desensibilisierung nach Stimulation durch den Agonisten. Der B1-Rezeptor wird durch deutlich weniger Agonist desensibilisiert. Diese unterschiedliche Regulation stimmt überein mit den Ergebnissen die belegen, dass der B2 bei allgemeinen und kurzfristigen Entzündungs- und Schmerzreaktionen beteiligt ist, während B1 an den langfristigen Reaktionen beteiligt ist. Die Entwicklung verschiedener peptidischer und nicht-peptidischer Antagonisten in Tiermodellen hat ergeben, dass beide Rezeptoren potenzielle Ziele sind bei entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel Sepsis, allergischem Asthma, Rhinitis oder entzündlichen Ödemen (Dray and Perkins, 1993; Ongali *et al.*, 2003).

Zahlreiche Faktoren regulieren die Expression des B2. Die Hochregulation der mRNA und des B2 Proteins durch proinflammatorische Zytokine ist seit langem bekannt. Interferon- γ ist aktiv in humanen T24 Harnblasenkarzinom-Zellen (Lung *et al.*, 1998). IL-1 β und TNF- α induzieren die Hochregulation des B2 in humanen embryonalen Lungenfibroblasten der Zelllinie HEL299. Durch Bindungsassays mit radioaktiv markiertem des-Arg(10)-Kallidin und BK wurde von Haddad et al. (Haddad *et al.*, 2000) gezeigt, dass sowohl IL-1 β als auch TNF- α eine rasche und vorübergehende Erhöhung der mRNA-Expression der beiden BK-Rezeptoren induziert, wobei der Anstieg nach 2 Stunden maximal war. Die Hochregulation der B2 durch TNF-alpha wird über den p38 MAPK und/oder PKA Signalweg vermittelt. Dabei handelt es sich um eine post-transkriptionale Regulation. Scherrer et al. (Scherrer *et al.*, 1999) untersuchten die

Wirkung des Glukokortikoids Methylprednisolon (10^{-5} M) auf die Regulierung der B2-Expression in trachealen glatten Muskelzellen des Hamsters. Auch hier wurde eine vorübergehende Hochregulation festgestellt. Nach 6-stündiger Behandlung stieg die Anzahl der B2 an, und erreichte nach 12 Stunden erneut den Basalwert. Funktionale und molekulare Ansätze belegten auch die regulatorischen Effekte von Östrogenen auf die Expression und Funktion des B2 in Ratten. Nach Ovariectomie wurde eine reduzierte vasodilatatorische Antwort auf BK festgestellt. Durch Östrogen-Gabe wurde die normale Reaktion auf des-Arg⁹-BK, Acetylcholin und Prostaglandin E₂ wiederhergestellt. Da Kinine einen kardioprotektiven Effekt haben, könnte die Abnahme ihrer vasodilatatorischen Aktivität zu dem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen nach der Menopause beitragen (Madeddu *et al.*, 1997). Die Expression des B2 wird auch durch Glukose reguliert. In glatten Gefäßmuskelzellen (Aorta) von Ratten wurde 24 h nach Glukose-Zugabe (25 mM) eine 40%-ige Erhöhung der B2 festgestellt, wobei es zur erhöhten mRNA-Expression bereits 4 Stunden nach Glukose-Zugabe kam. Der Glukose-vermittelte Mechanismus beruhte auf einer Steigerung der PKC-Aktivität, wobei es zur Translokation der PKC-Isoformen β_1 , β_2 , ϵ und ζ kam. Diese Ergebnisse wurden bestätigt durch die Hemmung der PKC-Aktivität, wobei ein erneuter Glukose-Zusatz den B2-Level nicht erhöhte (Christopher *et al.*, 2001). Auch für Wachstumsfaktoren (z.B. Platelet-derived growth factor, PDGF) die als Mitogene bei vaskulären Verletzungen freigesetzt werden, wurde eine Zeit- und Dosisabhängige Erhöhung der Expression der B2 mRNA (6 - 7-fach nach 2 - 4 h) und der B2-Proteinexpression (2 - 4-fach nach 6 - 12 h) nachgewiesen. Bereits 1 h nach PDGF-Zugabe begann die Zunahme der B2-Expression (Dixon, Sharma and Dennis, 1996). Auch in Spinalganglien wurde mittels RT-PCR und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eine geringe Expression der B2 m-RNA gezeigt, die aber durch die Zugabe des Nervenwachstumsfaktors stark hochreguliert wurde. Genauso war auch die Proteinexpression des B2 auf den wachsenden Axonen gering, wie durch Immunofluoreszenz-Versuche mit einem B2-spezifischen Antikörper nachgewiesen wurde. Nach Zugabe des Nervenwachstumsfaktors erhöhte sich die Expression stark. Dieser Nachweis wurde auch mit anderen Gewebearten durchgeführt (verletzte Nerven, Haut, Muskeln) (Lee *et al.*, 2002). Liesmaa *et al.* (Liesmaa *et al.*, 2007) untersuchten den Effekt von Lovastatin auf die Expression der B2 in humanen koronaren Endothelzellen mittels RT-PCR, Western blot und immunocytochemischen Untersuchungen. Lovastatin induzierte eine Zeit- und konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression beider BK-Rezeptoren in den kultivierten Zellen. Nach 12 Stunden kam es zu einer starken Expression (> 11-fach), die nach 24 Stunden wieder auf Basalwerte abfiel. Ein Langzeiteffekt (bis zu 72 h) mit erhöhter BKR-Expression wurde auch festgestellt. Damit ging ein Anstieg der B2 einher, sowie ein zeitabhängiger zellulärer Anstieg des cGMP, als Mediator des BK-NO-vermittelten Signalwegs. Von den gleichen Autoren wurde auch in den gleichen Zelllinien nachgewiesen,

dass Sauerstoffmangel auch zu einer erhöhten m-RNA Expression des B2 führte. In kardialen mikrovaskulären Endothelzellen der Ratte wurde gezeigt, dass es bei einem Sauerstoffgehalt von 5% O₂ zu einer vierfachen Erhöhung der B2-Expression (mRNA und Protein) führte, während eine schwere Hypoxie (1% O₂) die B2-mRNA Expression nur geringfügig hemmte (Liesmaa *et al.*, 2009).

Die aufgeführten Mechanismen zur erhöhten B2-Expression beziehen die Transkriptionsfaktoren p53, KLF-4, und cAMP response element binding protein (CREB), und/oder CREB-binding protein (CBP) mit ein. Es ist zudem bekannt, dass die Phosphorylierung von CREB nach der Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen mit NO-Donoren zustande kommt. Dieser Effekt wird wahrscheinlich vermittelt durch cGMP-abhängige Hemmung der Phosphodiesterase III und anschließender Akkumulation von cAMP (Steinbicker *et al.*, 2011)

Der Effekt der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit auf die B2-Proteinexpression *in vivo* wurde auch in verschiedenen Organen (dorsale Haut, Lunge, linksventrikuläres Myocard) von Versuchstieren der Linien C57BL/6, eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} untersucht (**Abbildung 3.1-12, s. 3.1.4.**) Bei der eNOS^{-/-} Mäuselinie (Knockout) wurde eNOS durch einen klassischen Knockout ausgeschaltet, daher produzieren diese Tiere keine eNOS (Shesely *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu, handelt es sich bei der eNOS-überexprimierenden Linie (eNOS^{+/+}) um Tiere mit einer endothelspezifischen Überexpression der eNOS im Gefäßgewebe (Suvorava *et al.*, 2005). Weder in der Haut (**Abbildung 3.1-12, A und B, s. 3.1.4.**), noch im Lungengewebe (**Abbildung 3.1-12, C und D**) oder linksventrikulärem Herzgewebe (**Abbildung 3.1-12, E und F s. 3.1.4.**) wurde eine signifikant veränderte Proteinexpression des B2 festgestellt. Die in transgenen Mäuselinien veränderte Bioverfügbarkeit von NO führte generell zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich der Proteinexpression von B2. Dies Ergebnis wurde auch in unterschiedlichen Gewebearten festgestellt, was darauf hinweist dass es sich um ein allgemeines zelluläres Geschehen handelt, welches unabhängig von dem untersuchten Organ ist. Die hier vorliegenden *in vivo* Daten in sehr gefäßreichem Gewebe wie Lunge, Herzmuskel und Haut aus verschiedenen Mausmodellen mit überexprimierter oder deletierter eNOS stimmen mit den Ergebnissen zur B2 Expression in PAEC und bEnd.3 Zellen überein. Dies ist eine weitere Bestätigung der Tatsache, dass der über NO-cGMP vermittelte Signalweg nicht an der Regulation der B2 Genexpression in Endothelzellen beteiligt ist.

4.1.5 WIRKUNG VON ENDOGENEM VASKULÄREM BRADYKININ AUF DIE B2 PROTEINEXPRESSION *IN VIVO*

Verschiedene Autoren haben die Auswirkungen einer anhaltenden BK-Aktivierung des B2 untersucht. So wurde bereits von Blaukat et al. (Blaukat *et al.*, 1996) gezeigt, dass eine anhaltende BK-Aktivierung des B2 mit einer funktionalen Desensibilisierung einhergeht, die mit der Phosphorylierung/Dephosphorylierung des Rezeptors verbunden ist sowie mit Zyklen von Endocytose und erneuter Expression auf der Membranoberfläche. Die Kinin-abhängige Phosphorylierung des B2 war rasch und transient, wobei sie mit der Kinetik der Desensibilisierung/Sensibilisierung des Rezeptors einherging, wie durch Radioliganden-Assays und die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} nachgewiesen wurde. In humanen Fibroblasten wurden B2 Rezeptoren nach längerer BK-Exposition (>12 h) herunterreguliert, wobei die Autoren zur Erklärung ihrer Beobachtungen einen kombinierten Mechanismus aus transkriptionaler Repression und beschleunigtem Abbau des Rezeptors vorschlugen (Blaukat *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu führte eine kürzere 3-stündige Stimulierung mit BK nicht zu einem nachweisbaren Abbau eines Fusionsproteins aus Kaninchen-B2 und GFP, obwohl eine fortbestehende Endozytose beobachtet wurde (Bachvarov et al., 2001). Ein zusätzlicher Agonisten-unabhängiger Mechanismus wurde für die B2 Herunterregulation bei entzündlichen Prozessen vorgeschlagen. Daran waren mehrere extrazelluläre Proteasen beteiligt, einschließlich Gewebekallikrein und durch aktivierte Neutrophile sezernierte Proteasen, die ein B2-GFP Fusionsprotein in intakten Zellen in wenigen Minuten abbauten (Marceau *et al.*, 2002; Houle *et al.*, 2003). Die Untersuchung der molekularen Mechanismen von Enquist et al. (Enquist *et al.*, 2007) zeigten zudem, dass Kinine in humanen embryonalen Lungenfibroblasten die Endozytose der Rezeptoren dahingehend verändern, dass B2 auf der Zelloberfläche reduziert wird, während B1 vermehrt exprimiert wird. B2 ist ohne BK-Aktivierung ein stabiles Protein der Plasmamembran. Nach BK-Stimulierung und Arrestin-Bindung wird der Rezeptor schnell über Clathrin-Bindung und Membraninvagination internalisiert. Nach Zusatz des Agonisten erfolgt jedoch ein schnelles Recycling. Dem gegenüber erwies sich B1 als konstitutiver G-Protein-gebundener Rezeptor, der ohne Agonisten-Stimulation konstitutiv internalisiert über einen Clathrin-abhängigen Signalweg, aber ohne Beteiligung von β -Arrestin. Die Agonisten-Bindung stabilisierte vorübergehend den B1 und verzögerte somit die Endozytose (Enquist *et al.*, 2007). In isolierten Zellkernen aus Leberzellen der Ratte konnten Savard et al. (Savard *et al.*, 2008) zeigen, dass BK die Aktivierung/Phosphorylierung der Proteinkinase Akt hervorruft, sowie die Acetylierung des Histons H3. Durch Chromatin-Immunpräzipitation wurde die Bindung des acetylierten H3-Komplexes, nicht jedoch des B2, an die Promotorregion des pro- inflammatorischen iNOS-Gens nachgewiesen. Damit wurde

ein neuer BK-vermittelter intrakriner Signalweg mit nachgeschalteten Effektoren in Leberzellen der Ratte nachgewiesen. Mittels des Two-Hybrid-Systems konnte zudem gezeigt werden, dass der B2 von HEK293 Zellen mit Lamin C interagiert, einem von zahlreichen Laminen die im Zellkern eukaryotischer Zellen über membrangebundene Proteine mit der inneren Kernmembran verankert ist. Weder der Zusatz von BK noch das Vorhandensein des Kernlokalisierungssignals hatten Einfluss auf die nukleäre Lokalisierung bzw. Translokation von B2. Somit wurde vorgeschlagen, dass auch die Heterodimerisierung des B2 mit Lamin C eine wichtige Rolle spielt bei der zellulären Signalisierung und physiologischen Funktion (Takano and Matsuyama, 2014; Takano *et al.*, 2014).

Pesquero *et al.* (Pesquero *et al.*, 1994) identifizierten die genomische Struktur des B2 und fanden keine Hinweise auf ein klassische Domäne der Transkriptions-Initiation. Sie berichteten jedoch von einer 1143-bp langen Region in der putativen Promotor-Region des B2 von Ratten, welche die Expression eines fusionierten Luciferase-Reportergens in NG108-15 Zellen ermöglichte. Diese Region enthält auch ein cAMP-responsives Element, die zur signifikanten Transkription nach Stimulation mit 8-bromo-cAMP führte (Pesquero *et al.*, 1996). Die Aktivität des Promotors wurde auch durch BK erhöht. In den darauffolgenden Jahren identifizierte die gleiche Arbeitsgruppe mehrere regulatorische Elemente in einem 4.6-kb langen Fragment der 5'-flankierenden Sequenz des Promotors von B2 von Ratten (Baptista *et al.*, 2002). Die *in silico* Analyse zeigte mehrfache potenzielle Bindungsstellen für mehrere Transkriptionsfaktoren auf, z.B.: GATA-1, E2F, Egr-2, IL-6 aktivierendes Protein, SP-1, ras, NF-kB, p53, SEF-1, cAMP-response element binding protein (CREB), sterol regulatory element binding protein (SREBP), Interferon und Östrogen.

Aus früheren Studien geht hervor, dass eine langfristige medikamentöse Therapie mit C1-INH die Häufigkeit der Angioödeme in HAE Patienten erhöhen könnte (Bork and Hardt, 2009). Obwohl die Wirksamkeit von C1-INH bei dieser Erkrankung nachgewiesen wurde, und auch eine klinische Erfahrung von etwa 30 Jahren vorliegt (Bork and Barnstedt, 2001; Cicardi *et al.*, 2010), wurde die langfristige Wirksamkeit und Sicherheit nur für eine monofiltrierte Zubereitung in einer kontrollierten Studie untersucht. C1-INH hemmt Kallikrein, den Hageman-Faktor (Faktor XII) und Plasmin. Kallikrein und der Hageman-Faktor sind entscheidend an der endogenen Bildung von BK beteiligt, in einer positiven Rückkopplungsschleife (Kaplan, 2010a; Kaplan and Joseph, 2010). Daher hemmt C1-INH die endogene BK-Synthese und es wurde bereits früher gezeigt, dass humaner C1-INH, in den Konzentrationen der hier vorliegenden Untersuchungen, die BK-induzierte Extravasation bei Mäusen stark verringert (Han *et al.*, 2002). Dennoch hatte C1-INH keine Wirkung auf die B2 Expression in C57BL/6-Mäusen, was darauf hindeutet, dass das Ausmaß der B2-Aktivierung *in vivo* keine Auswirkungen auf die B2-Expression hat, unabhängig davon welche B2 Signalwege aktiviert sind. Diese Ergebnisse

stehen in Übereinstimmung mit unserer Beobachtung, dass Icatibant keine Wirkung auf die *in vivo* Expression von B2 hatte.

Icatibant ist ein selektiver BK-B2-Rezeptor-Antagonist (Wirth, Heitsch and Schölkens, 1995; Fincham *et al.*, 2009), mit einer ähnliche Struktur wie das körpereigene BK und mit Affinität für den B2. Durch die spezifische Bindung und die peptidomimetische Blockade von B2 kommt es *in vivo* zu einer dosis- und zeitabhängigen Hemmung der durch BK induzierten Effekte (Rosenkranz, Brunner-Ferber and Knolle, 2007). Icatibant hemmt B2-induzierte Signalisierung, ist wirksam für die Behandlung von HAE (Cicardi *et al.*, 2010) und auch zur Therapie von AÖ die durch ACE-Inhibitoren induziert sind (Bas *et al.*, 2015).

In unseren Untersuchungen stellte sich daher die Frage, in wie weit endogen vorhandenes BK einen Einfluss auf die Expression der B2 mRNA im Lungengewebe der Mäuselinie C57BL76 hat. Dazu wurde die BK-Bioverfügbarkeit verändert, einerseits durch die Verabreichung von Icatibant als hoch selektivem B2-Antagonisten (**s. Abbildung 3.1-14 A und B, s. 3.1.5**) und andererseits durch die Blockade der BK-Synthese mit C1-INH, dem wichtigsten physiologischen Hemmer (**s. Abbildung 3.1-14 C und D, s. 3.1.5**). Für beide Wirkstoffe wurden keine signifikanten Veränderungen der B2-Expression festgestellt, weder bei akuter (eine einzige i.v. Injektion und Bestimmung der Proteinexpression nach 3 h) noch bei chronischer Verabreichung (i.v. Injektionen an 3 aufeinander folgenden Tagen mit anschließender Bestimmung der Proteinexpression). Es zeigte sich zudem, dass der Nachweis der B2 unveränderten Proteinexpression mit mehreren Antikörpern zum selben Ergebnis führte und unabhängig von dem verwendeten Antikörper (Maus oder Kaninchen) war (Khosravani *et al.*, 2015).

Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Han *et al.* (Han *et al.*, 2002), die belegten dass es für C1-INH keinen Zusammenhang gibt zwischen dem Ausmaß der B2-Aktivierung *in vivo* und der B2-Expression. Unsere Ergebnisse stimmen auch überein mit den Ergebnissen der Dissertation von Dao (Dao, 2011), wobei der Frage nachgegangen wurde ob die vasoprotektiven Effekte des körperlichen Trainings (2 Trainingsprotokolle) ebenfalls über eine Beteiligung des B2 vermittelt werden. Auch hier wurde nachgewiesen, dass sich die B2-Expression nicht veränderte. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass eine geänderte BK-Bioverfügbarkeit einen Einfluss auf die Expression der B2 hat.

4.1.6 BESTIMMUNG DER VASKULÄREN BRADYKININ-AKTIVITÄT AN DER MAUS-AORTA

Bisher liegen nur wenige Daten vor bezüglich BK-vermittelter vasokonstriktiver Effekte an Aortenringen von C57BL/6-Mäusen. In der Arbeit von Felipe et al. (Felipe *et al.*, 2007) wurde nachgewiesen, dass abdominale Aortenringe von C57BL/6-Mäuse auf BK mit einer konzentrationsabhängigen Verengung reagieren, wie durch isometrische Messungen nachgewiesen wurde. Dabei waren die Effekte von BK unabhängig von der Anwesenheit eines intakten Endothels und die Kontraktion wurde auch nicht verändert durch die Zugabe von L-NAME. Demnach schließen die Autoren einen NO-abhängigen vasodilatatorischen Effekt aus, welcher die vasokonstriktorische Wirkung von BK abmildern würde. Durch Icatibant wurde die Verengung fast vollständig aufgehoben, was die Bedeutung von BK für diesen Effekt bestätigte. Durch die Zugabe von Indomethacin, einem nichtselektiven Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) wurde der kontraktile Effekt von BK signifikant erniedrigt, was die Beteiligung vasokonstriktorisch wirksamer Prostanoiden nahelegt. Gleichzeitig konnten die Autoren die funktionale Expression von B2 in der Gefäßwand nachweisen, wobei die Expression des B1 nur etwa 10 % der B2-Expression betrug. Dieser Effekt scheint jedoch gewebespezifisch zu sein, denn Felipe et al. (2007) konnten keine derartigen BK-vermittelten vasokonstriktorischen Effekte in der thorakalen Aorta feststellen. Ähnliche Ergebnisse einer geringen Vasokonstriktion der thorakalen Aorta im Vergleich zur abdominalen Aorta ergab auch die Untersuchung von vasokonstriktorischen Effekten die durch Angiotensin II und Endothelin-1 ausgelöst wurden (Russell and Watts, 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, dass BK einen konzentrationsabhängigen vasokonstriktorischen Effekt in Aortenringen von C57BL/6-Mäusen ausübt. Diese Wirkung war am höchsten bei 1 μ M BK und die Entfernung des Endothels führte zu einer starken Reduktion der maximalen Kontraktion (von $25,5 \pm 2,4$ % auf $7,9 \pm 2,1$ % der maximalen KCl-Wirkung). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Felipe et al (2007) konnte auch hier gezeigt werden, dass die durch BK induzierte B2-abhängige Vasokonstriktion über den B2-Rezeptor vermittelt wird, zumal die Zugabe von Icatibant die Vasokonstriktion reduzierte (**s. Abbildung 3.1-15 A, s.3.1.6**). Zudem wurde durch die Zugabe von Diclofenac, einem Wirkstoff der wie Indomethacin COX-1 und COX-2 hemmt, eine vollständige Hemmung des kontraktilen Effektes von BK nachgewiesen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Stimulation von B2 in der thorakalen Aorta von Mäusen der Zelllinie C57BL/6 ein Cyclooxygenase-Produkt freisetzt, welches die Vasokonstriktion vermittelt. Eine ähnliche Beobachtung wurde mit Acetylcholin in Hamster-Aortenringen gemacht (Wong *et al.*, 2009). Diese Autoren konnten zeigen, dass die Endothel – abhängige Kontraktion durch Acetylcholin

nach Hemmung der NO-Produktion ausgelöst wurde. Nach Verabreichung von COX-2 – Hemmern (nicht jedoch COX-1-Hemmern) oder durch Thromboxan-Rezeptor Antagonisten wurden die durch Acetylcholin verursachten Kontraktionen vermieden. Die Wirkung von Acetylcholin ging mit einer Freisetzung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Prostacyclin (PGI_2) einher, wobei es zu Kontraktionen nur durch relevante Konzentrationen von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ kam.

Wurden die Aortenringe mit BK und L-NAME behandelt, einem NOS-Inhibitor mit struktureller Analogie zu L-Arginin, trat eine Verstärkung des vasokonstriktorisches Effektes auf (**s. Abbildung 3.1-15 A, s.3.1.6**). Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch weitere Untersuchungen die zeigten, dass die durch BK verursachte Aortakonstriktion sich fast verdoppelte nach Hemmung der NOS durch L-NA oder in eNOS^{-/-} Mäusen. Aortenringe die mit L-NA behandelt wurden, zeigten eine erhöhte vasokonstriktorisches Reaktion auf BK, auf ein Niveau welches in der thorakalen Aorta von eNOS^{-/-} Mäusen beobachtet wurde (**s. Abbildung 3.1-15 B, s.3.1.6**). Daher waren die Reaktionen der Aorta auf die B2-Aktivierung abhängig von der eNOS-Aktivität, zumal die durch BK induzierte NO-Bildung der Vasokonstriktion entgegenwirkt. Diese Ergebnisse stimmen jedoch nicht überein mit den Daten von Felipe et al., (2007), die keinen zusätzlichen vasokonstriktorisches Effekt durch L-NAME feststellten.

Diese Effekte waren jedoch ähnlich in Aortenringen von Mausstämmen mit auffallend unterschiedlicher Bioverfügbarkeit von vaskulärem NO. In der eNOS-überexprimierenden Linie (eNOS^{+/+}) ist die Expression der eNOS um den Faktor 3,3 erhöht (Suvorava *et al.*, 2005). Trotzdem kam es nicht zu einer verstärkten NO-Produktion, welche der BK-vermittelten Vasokonstriktion entgegenwirken würde. Die Vasokonstriktion der durch BK oder BK + L-NAME verursachten Aortakonstriktion in Mäusen der Linien C57BL/6 und eNOS^{+/+} war vergleichbar. Somit scheint die Wirkung von NO auf die B2-induzierte Aortakonstriktion in der Mäuselinie C57BL/6 limitiert zu sein, und könnte wahrscheinlich noch zusätzlichen regulatorische Mechanismen unterliegen. Dies Ergebnis schließt jedoch nicht eine Rolle von NO bei der BK-induzierten Extravasation und/oder Angioödem nicht aus.

4.2 VERÄNDERUNGEN DER VASKULÄREN PERMEABILITÄT IN DER DORSALEN HAUT VON C57BL/6 MÄUSEN

Verschiedene Entzündungsmediatoren können die mikrovaskuläre endotheliale Permeabilität für Makromoleküle schnell erhöhen. Unter pathologischen Bedingungen, die mit einer erhöhten Gefäßpermeabilität einhergehen, verlieren die Endothelzellen teilweise ihren engen Kontakt zueinander und das Endothel wird durchlässig für kleine Proteine wie z.B. Albumin. Da in diesem Zustand auch die Extravasation von Albumin-gebundenem Evans blue in das Gewebe möglich ist, kann das Ausmaß der Gefäßpermeabilität durch quantitative Messung des ausgetretenen Farbstoffs pro Milligramm Gewebe bestimmt werden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Mittels dieses von Miles (Miles and Miles, 1952) beschriebenen Ansatzes wurden Versuche mit dorsalen Hautabschnitten der Mauslinien C57BL/6, eNOS^{-/-}, eNOS^{tg} (Mu⁺⁺) und B2^{tg} durchgeführt, zur Untersuchung der BK-vermittelten vaskulären Permeabilität und deren Veränderung durch unterschiedliche NO-Konzentrationen (L-NAME, eNOS^{-/-} KO-Mäuse), oxidativen Stress (C101A-eNOS^{-/-} KO-Mäuse) sowie die Wirkstoffe Labradimil, Histamin, Icatibant und Diclofenac.

4.2.1 BRADYKININ- UND LABRADIMIL-INDUZIERTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Bradykinin und Histamin sind wichtige ödematogene Faktoren. Die Beteiligung der PKC (**Abbildung 1.2-4, s. 1.2.2.**) an der Signalkaskade zur endothelialen Permeabilität ist seit vielen Jahren bekannt, wobei auch nachgewiesen wurde dass die Hemmung der PKC zu einer Reduktion der Hyperpermeabilität führte (Murray, Heistad and Mayhan, 1991; Kobayashi *et al.*, 1994). In der Publikation von Feletou (Félétou, Bonnardel and Canet, 1996) wurde erstmals gezeigt, dass BK die mikrovaskuläre Permeabilität in den Backentaschen des Hamsters induziert. Diese mikroskopischen Beobachtungen wurden mit anästhesierten Tieren durchgeführt, und die Extravasation wurde durch die Verwendung von FITC-Dextran als Gewebe-undurchlässigem Farbstoff nachgewiesen. Durch Verwendung des B2 Antagonisten Icatibant wurde die Beteiligung des B2 an diesem Geschehen bestätigt.

Die bisher bekannten Signalwege sind von Durán *et al.* (Duran, Breslin and Sanchez, 2010) zusammengefasst worden. Demnach aktiviert die Bindung proinflammatorischer Agonisten an ihre Rezeptoren eine Vielzahl von intrazellulären sekundären Signalstoffen, welche Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern lösen und weitere Proteine aktivieren, wie z.B. die Serin-Threonin Kinase Akt und ERK-1/2. Das Gesamtergebnis ist eine Funktionszustandsänderung im

Phosphorylierungs-Zustand von eNOS mit erhöhter NO-Produktion, die eine erhöhte Durchlässigkeit der mikrovaskulären Barriere begünstigt (Duran, Breslin and Sanchez, 2010). Bradykinin aktiviert zudem auch die Calmodulin-abhängige Kinase II, welche die Phosphorylierungsstelle der eNOS (Ser-1177) aktiviert und somit auch auf diesem Weg zur NO-Synthese beiträgt (Fleming *et al.*, 2001).

Bradykinin übt auch eine direkte Wirkung auf die Claudine der Tight junctions (**s. 1.3.1.2**) aus, die im mikrovaskulären Endothel spezialisierter Gewebearten vorkommen, zum Beispiel der Blut-Hirn- oder Blut-Retina-Schranke und eine zusätzliche Barrierefunktion für kleinere Moleküle (<1 kDa) darstellen. Immunzytochemische Versuche und Western Blot Ergebnisse zeigten, dass BK in einer Konzentration von 10^{-5} M eine reduzierte Expression von Claudin-5 verursachte. Dabei kam es jedoch nicht zu einer erhöhten Expression von B2 in den untersuchten Mikrogefäßen des Rattengehirns. Eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung wurde auch beobachtet; Agonisten der IP3-Rezeptoren und der Ryanodin-Rezeptoren (IP3 und Caffein) erhöhten die durch BK induzierte Herunterregulation von Claudin 5, während Antagonisten dieser beiden Rezeptoren (2-APB und Ryanodin), den Effekt von BK auf Claudin aufhoben (Zhou *et al.*, 2014).

In unseren Versuchen konnten wir mittels des Miles Assays zeigen, dass BK (100 μ M, 30 μ l) im dorsalen Hautgewebe von Mäusen der Linie C57BL/6 eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität verursachte, die statistisch signifikant war $P < 0,0001$ und in der gleichen Größenordnung wie Histamin lag (**Abbildung 3.2-2, s. 3.2.2**). Für ansteigende BK-Konzentrationen ergab sich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, die ab einer Konzentration von 10 μ M im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle statistisch signifikant war (**Abbildung 3.2-3, s. 3.2.2**). Im Vergleich zu Histamin und Labradimil verursachte BK die stärkste Extravasation, ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nur zwischen BK und Labradimil (**Abbildung 3.2-4, s. 3.2.3**). Unsere Ergebnisse bestätigen daher die Ergebnisse der Untersuchungen von Boric *et al.*, (1987) und Murray *et al.* (1991). Bereits 1987 beschrieben Boric *et al.* (Borić, Roblero and Durán, 1987) die *in vivo* Effekte von BK auf die transvaskuläre Passage von Makromolekülen im Kremastermuskel von Ratten, wobei FITC-Dextran 150 als makromolekularer Marker verwendet wurde. Wenn BK topisch aufgetragen wurde (10^{-8} – 10^{-7} M), konnte nach wenigen Minuten die Passage von FITC-Dextran 150 aus dem Gewebe beobachtet werden. Auch in der Backentasche des Hamsters, als einem alternativen Modell zur vaskulären Permeabilität, wurde die Extravasation nach BK-Zusatz (10^{-6} M) beobachtet (Murray *et al.*, 1991).

4.2.2 DIE WIRKUNG VON ICATIBANT UND DICLOFENAC AUF DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL INDUZIERTER VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Die generelle Bedeutung der mikrovaskulären Permeabilität im Kontext der NO-Kaskade wurde in der Übersichtsarbeit von Durán et al. (2010) zusammengefasst. Gemäß diesen Autoren aktiviert die Bindung von pro-inflammatorischen Agonisten wie VEGF an ihre Rezeptoren eine Vielzahl von intrazellulären Signalstoffen, die zur Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern führen, sowie auch zur Aktivierung von PKC, Akt/PKB und ERK-1/2. Das Gesamtergebnis ist eine Änderung der Phosphorylierung von eNOS und eine erhöhte NO-Produktion, wodurch es zur Begünstigung einer erhöhten Durchlässigkeit der mikrovaskulären Barriere kommt. Mehrere Elemente zur Entstehung des Gesamtsignals sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt, wie z. B. die Signalkette von NO zu den Änderungen der zellulären Verbindungen bzw. des Zytoskeletts, die letztendlich den hyperpermeablen Zustand herstellen. Die Interaktionen von proinflammatorischen Agonisten mit ihren spezifischen Rezeptoren führen zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen und Phospholipasen (A, D und C). Die Aktivierung von PLA_2 kann über den Lipoxygenase-Signalweg zur Bildung von Leukotrienen führen, insbesondere LTC_4 , welches die NOS aktiviert und die Kapillarpermeabilität erhöht. Andererseits aktiviert PLA_2 über den Cyclooxygenase-Signalweg die Thromboxansynthase und bedingt daher den vasokonstriktorischen Effekt in den Gefäßen der Hamsterbacke (Durán and Dillon, 1990; Duran, Breslin and Sanchez, 2010).

Durch Vorbehandlung mit dem selektiven B2 Antagonisten Icatibant (i.v., 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG, an jeweils 2 aufeinander folgenden Tagen) kam es zu einer signifikanten Reduktion der durch BK vermittelten Steigerung der Permeabilität, die sich nicht mehr statistisch signifikant unterschied von den Werten der Vehikellösung (**Abbildung 3.2-5, s. 3.2.4**). Icatibant ist ein hoch selektiver, kompetitiver und schnell wirksamer Antagonist des B2 (Cruden and Newby, 2008; Banerji, 2010) und die Hemmung der Permeabilität nach Rezeptor-Blockade ist ein Beleg für die Beteiligung des B2 am Signalweg der zur BK-vermittelten vaskulären Permeabilität führt. In dieser Versuchsreihe wurde zudem gezeigt, dass auch Labradimil als B2 – Agonist zu einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität führt, die in der Größenordnung der durch Bradykinin verursachten Extravasation lag (**Abbildung 3.2-5, s. 3.2.4**). Auch hier kam es durch die Verwendung von Icatibant zu einer Reduktion der Extravasation, was wiederum die Ergebnisse zur BK-vermittelten Steigerung der Permeabilität belegt. Da die Histaminvermittelte Extravasation vor allem über den H1-Rezeptor vermittelt wird, (Clough, Bennett and Church, 1998), war die ausbleibende Wirkung von Icatibant erwartet (**Abbildung 3.2-5, s. 3.2.4**). Die Wirkung von Icatibant als Antagonist des B2 wurde in der vorliegenden Arbeit auch in anderen Testsystemen nachgewiesen (Lungengewebe von C57BL/6 Mäusen, s. 3.1.5,

Aortenringe von C57BL/6 Mäusen, s. **3.1.6**). Sie stehen in Übereinstimmung und entsprechen den erwarteten Ergebnissen. Ähnliche Ergebnisse, d.h. eine signifikante Reduktion der BK- und Labradimil- vermittelten Steigerung der Permeabilität wurden nach der Vorbehandlung der Versuchstiere mit dem nicht-selektiven Cyclooxygenase-Hemmer Diclofenac (5 mg/kg KG) erzielt (**Abbildung 3.2-5, s. 3.2.4**). Diese Ergebnisse bestätigen die Beteiligung des PLA₂-vermittelten Cyclooxygenase-Signalwegs bei der Regulierung der Permeabilität in Mikrogefäßen der Haut von C57BL/6 Mäusen. Die Ergebnisse unserer Versuche haben gezeigt, dass die Hemmung der Synthese vasokonstriktorisch wirksamer Prostanoiden nicht nur die Konstriktion von Aortenringen im Mäusemodell C57BL/6 verhindert (s. **3.1.6**), sondern auch die durch BK vermittelte Permeabilität. Demnach könnte es hier über einen cAMP-vermittelten Signalweg, wahrscheinlich auch unter Beteiligung der p38 MAPK, zur BK-vermittelten Hyperpermeabilität gekommen sein (Durán et al., 2010).

4.2.3 DIE WIRKUNG EINER VERÄNDERTEN NO-BIOVERFÜGBARKEIT AUF DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL INDUZIERTER VASKULÄRE PERMEABILITÄT

Die ersten experimentellen Nachweise einer Beteiligung von NO am Transport von Makromolekülen durch intakte Mikrogefäße wurden in den frühen 1990er Jahren veröffentlicht und erbrachten teilweise kontroverse Ergebnisse (Hughes, Williams and Brain, 1990; Kubes and Granger, 1992; Mayhan, 1992; Yuan *et al.*, 1992). Mayhan (Mayhan, 1992) zeigte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie dass BK zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität in Gefäßen der Hamsterbacke führt. Wurde das Gewebe jedoch L-NAME ausgesetzt (0,01, 0,1, und 1,0 µM), kam es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität. Studien in intestinalen Mikrogefäßen zeigten, dass NO wichtig ist für den Erhalt einer dichten Mikrogefäßbarriere, zumal die NOS-Hemmung mit L-Arginin-Analoga den Durchtritt von Makromolekülen erhöhte (Kubes and Granger, 1992; Kurose *et al.*, 1993). In anderen Gewebearten, isolierten Venolen, einzelnen Kapillaren sowie in endothelialen monozellulären Schichten wurde jedoch auch gezeigt dass die Aktivität der eNOS, als Reaktion auf inflammatorische Stimuli, die mikrovaskuläre Permeabilität erhöht (Hughes, Williams and Brain, 1990; Mayhan, 1992; Yuan *et al.*, 1992, 1993; Ramírez *et al.*, 1995; Ramírez, Kim and Durán, 1996; Wu *et al.*, 1999; Lal *et al.*, 2001). Wong et al. (Wong, Dorovini-Zis and Vincent, 2004) zeigten, dass die durch Zytokine (TNF-α, IL-1β, IFN-γ) oder Lipopolysaccharide erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch NO reduziert wurde, unter Beteiligung einer cGMP-vermittelten molekularen Aktivierung. Die Wirkung von NO und BK wurde auch mit immunohistochemischen Methoden in terminalen mesenterialen Gefäßen

von Ratten untersucht, wobei FITC-dextran (70 kDa) als Marker des makromolekularen Transports verwendet wurde. Bei diesen Versuchen wurde durch BK (100 nM) eine Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität um 168 % festgestellt. Die Hemmung der NO-Synthese durch L-NA (300 µM) hatte nur einen geringen Effekt (Erhöhung um 25 %). Bei dem kombinierte Einsatz von BK und L-NA kam es jedoch zu einer starken Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität um 607 % (Arnhold *et al.*, 1999).

Gemäß dem von Durán *et al.* (2010) vorgeschlagenen Modell zur Beteiligung von eNOS bzw. NO an der mikrovaskulären Permeabilität ist eNOS mit Caveolin verbunden, lokalisiert an membranären Caveoli. Wenn proinflammatorische Signale endotheliale Zellen erreichen, lösen sich Caveoli von der Plasmamembran und es kommt zur Internalisierung von eNOS, welches von Caveolin-1 dissoziiert und phosphoryliert werden kann, was zur erhöhten NO-Produktion führt. NO könnte dann an weitere intrazelluläre Zielmoleküle binden, welche in weiteren Signalwegen die mikrovaskuläre Permeabilität erhöhen.

In unseren Untersuchungen wurde keine biologische Wirkung des eNOS Inhibitors L-NAME (i.v., 16 µg/ kg KG) auf die durch BK oder Labradimil verursachte Steigerung der Permeabilität in dorsalem Hautgewebe der Mauslinie C57BL/6 beobachtet (**Abbildung 3.2-7, s. 3.2.6**). Somit bestätigen die Ergebnisse unsere Untersuchungen nicht die Untersuchungen von Mayhan *et al.* (1992), bei denen L-NAME zu einer statistisch signifikanten Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität in Gefäßen der Hamsterbacke führte. Bei der Untersuchung von terminalen mesenterialen Gefäßen von Ratten war dieser Effekt jedoch gegenteilig, es kam beim kombinierten Einsatz von BK und L-NA zu einer starken Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität.

Unsere Ergebnisse zum ausbleibenden Effekt von L-NAME auf die Extravasation im dorsalen Hautgewebe der Mäuselinie C57BL/6 wurden in weiteren Versuchen mit transgenen Tieren validiert, unter Verwendung der transgenen eNOS KO Mäuselinie eNOS^{-/-} im Vergleich zu den nicht transgenen Geschwistertieren C57BL/6. Die Ergebnisse (**Abbildung 3.3-1, s. 3.3**) bestätigten die bereits früher nachgewiesene Evans Blue Extravasation bei Zusatz von BK oder Labradimil (100 µM) in der Mäuselinie C57BL/6. Bei den Tieren die keine eNOS exprimierten (Mäuselinie eNOS^{-/-}) kam es zu keiner Änderung der Permeabilität, die Werte für BK und Labradimil waren vergleichbar mit den Ergebnissen der nicht transgenen Geschwistertiere C57BL/6. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Daten vorhergehender Versuche (**Abbildung 3.2-7, s. 3.2.6**), die zeigten dass der eNOS Inhibitor L-NAME (i.v., 16 µg/ kg KG) keinen Einfluss hat auf die durch BK oder Labradimil verursachte Steigerung der Permeabilität in dorsalem Hautgewebe der Mauslinie C57BL/6.

Somit scheint die eNOS bzw. NO unter den von uns getesteten experimentellen Bedingungen nicht beteiligt zu sein an der Änderung der mikrovaskulären Permeabilität die durch BK verursacht wurde in dorsalem Hautgewebe der Mäuselinien C57BL/6 bzw. eNOS^{-/-}. Unsere Ergebnisse bestätigen auch nicht die Untersuchungen von Predescu et al., (Predescu *et al.*, 2005), die in Lungengefäßen der Mäuselinien C57BL/6 bzw. eNOS^{-/-} nach L-NAME-Behandlung den mikroskopischen Nachweis der Öffnung von interendothelialen Verbindungen führen konnten. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch keine vorherige Behandlung mit BK durchgeführt. Generell könnten unsere abweichenden Ergebnisse bedingt sein durch die unterschiedliche Wirkung von L-NAME bzw. L-NA in verschiedenen Gefäß- bzw. Gewebe- oder Tierarten. Als weitere Gründe für unterschiedliche Ergebnisse wurden von Durán et al. (2010) die spezifischen experimentellen Bedingungen angeführt, die hier wahrscheinlich auch eine Rolle spielen.

4.2.4 DIE WIRKUNG VON VASKULÄREM OXIDATIVEM STRESS UND DER ERHÖHTEN B2 EXPRESSION AUF DIE DURCH BRADYKININ UND LABRADIMIL INDUZIERTE VASKULÄRE PERMEABILITÄT

In transgenen Versuchstieren (eNOS^{-/-} KO-Mäuse) verursachte die i.d. Injektion von BK und Labradimil (30 µl, 100 µM) keine Veränderung der vasalen Permeabilität im Vergleich zu den nicht transgenen Geschwistertieren. In weiteren Versuchen wurde daher untersucht, ob ein durch eNOS bedingter oxidativer Stress in der durch BK ausgelösten Signalkette zur gesteigerten Permeabilität involviert sein könnte. Dafür wurde die transgene Mauslinie C101A-eNOS-tg (Mu⁺⁺) verwendet (Suvorava *et al.*, 2015), bei der eine geringere NO- und Citrullin-Bildung besteht, bei gleichzeitig erhöhter Synthese von Superoxid und Peroxonitrit (**Abbildung 3.4-1, s. 3.4**). Die Ergebnisse zeigten auch hier, dass die veränderte NO-Bioverfügbarkeit bei gleichzeitig erhöhtem oxidativem Stress keinen Einfluss hat auf die durch BK oder Icatibant verursachte mikrovaskuläre Permeabilität.

Zusätzlich wurde das Modell einer spezifischen Überexpression des B2 verwendet, um zu untersuchen ob eine genetische bzw. pharmakologische Aktivierung der endothelialen B2 Signalkaskade zur gesteigerten Extravasation beiträgt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die BK-vermittelte Permeabilität von der Expression des Rezeptors abhängig ist, zumal es in einer transgenen Mauslinie mit überexprimiertem B2 (B2^{tg}) zu einer höheren Permeabilität bei den transgenen Tieren kam im Vergleich zu den nicht-transgenen Geschwistertieren (p<0,05)

(Abbildung 3.5-1, s.3.5.1). Durch Vorbehandlung mit Icatibant kam es bei beiden Tierlinien zur signifikanten Reduktion der Permeabilität, wobei der vorher beschriebene Unterschied zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren nicht mehr nachweisbar war. Die durch Histamin verursachte Permeabilität wurde auch hier, wie erwartet, nicht verändert durch den Einsatz von Icatibant **(Abbildung 3.5-2, s. 3.5.2).**

Die Bedeutung des B2 an der Regulation der vaskulären Permeabilität wurde zusätzlich belegt durch die Messung der Gewebepерmeabilität *in vivo* mittels der 2-Photonen-Mikroskopie **(Abbildung 3.6-1, s. 3.6).** Bei Verwendung des Farbstoffes Alexa594-Dextran in beiden Mäuselinien kam es im zeitlichen Verlauf (30 min.) zu einer Abnahme des fluoreszenten Signals (55 – 70% des ursprünglichen Wertes), was auf seine Gewebedurchlässigkeit zurückzuführen ist. In der B2 überexprimierenden Mäuselinie B2^{tg} war jedoch die Abnahme des fluoreszenten Signals signifikant höher ($p < 0,05$) als in der Geschwisterlinie B2ⁿ (3.6), was eine erhöhte Extravasation durch B2-Überexpression belegt. Diese bislang noch vorläufigen Ergebnisse stimmen überein mit den Daten unserer vorherigen Versuchsergebnisse, wonach die BK-vermittelte Extravasation im dorsalen Hautgewebe der B2 überexprimierenden Mäuselinie B2^{tg} höher ist als in der Mäuselinie C57BL/6.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle der Veränderungen der Bradykinin-Aktivität im hereditären Angioödem und ACE-Hemmer induziertem Angioödem ist bislang nicht gut verstanden. Dies beinhaltet auch die Regulierung der Expression des Bradykinin-2-Rezeptors. Ob und in wie weit es zu Änderungen der Empfindlichkeit des Bradykinin-2-Rezeptors nach längerer Stimulation mit Bradykinin kommt, ist bisher ebenso wenig bekannt und das gleiche gilt für die Synthese von vaskulärem NO als Reaktion auf die Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Rolle von NO, Bradykinin, C1-Inhibitor, Icatibant und Diclofenac zu untersuchen bezüglich der endothelialen Expression und Aktivität des Bradykinin-2-Rezeptors bzw. der involvierten Signalwege. Ein weiteres Ziel bestand darin, die damit assoziierten phänotypischen Änderungen zu evaluieren, durch Messung der Aortenkonstriktion, sowie durch die Bestimmung der vaskulären Permeabilität mittels des Miles-Assays und der 2-Photonen-Mikroskopie. Da eine direkte Untersuchung dieser Fragen am Menschen nicht möglich ist, basierte der experimentelle Aufbau auf endothelialen Zellen (porcine Aorten-Endothelzellen, murine zerebrale Endothelzellen, endotheliale umbilikale Zellen) sowie auf verschiedenen Organen von Mäuselinien (Lunge, linksventrikuläres Gewebe, Haut, Ohr, thorakale Aortenringe).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die m-RNA- und Proteinexpression des Bradykinin-2-Rezeptors nicht verändert wurde durch Behandlung unterschiedlicher Zellen (PAEC, bEND.3 und HUVEC) mit Bradykinin oder den NO-Donatoren DEA/NO und DETA/NO. Auch die Veränderung der NO-Bioverfügbarkeit in Lungengewebe, linksventrikulärem Herzgewebe oder Hautgewebe durch Vorbehandlung mit dem NO-Donator PETN, Hemmung der eNOS durch L-NA oder Verwendung der transgenen Mäuselinie eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Bradykinin-2-Rezeptors. Die gleichen Ergebnisse wurden beobachtet im Lungengewebe der Maus wenn die Bradykinin-Synthese mit C1-Inhibitor blockiert wurde oder bei Verwendung des Bradykinin-Antagonisten Icatibant. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben zudem gezeigt, dass NO keinen Einfluss hat auf die Mobilisierung von iCa aus intrazellulären Pools. Der durch Bradykinin induzierte Anstieg von iCa wurde nicht verändert durch Prä-Inkubation von bEND.3 Zellen mit dem NO-Donator DEA/NO.

Phänotypischen Änderungen wurden erfasst durch Messung der Aortenkonstriktion, sowie durch die Bestimmung der vaskulären Permeabilität mittels des Miles-Assays und der 2-Photonen-Mikroskopie. Die Aortenring-Konstriktionen in der Mäuselinie C57BL/6 wurde durch Bradykinin induziert und über den Bradykinin-2-Rezeptor vermittelt. Dabei wurde die Konstriktion durch NO abgeschwächt und durch Diclofenac bzw. Icatibant aufgehoben, was auf die Bedeutung der eNOS und Cyclooxygenase hinweist für die funktionale Aktivierung des Bradykinin-2-Rezeptors. Auch die vaskuläre Permeabilität von dorsalem Hautgewebe in der Mäuselinie C57BL/6 wurde durch Bradykinin erhöht und die gleiche Beobachtung wurde für Histamin und Labradimil gemacht. Die Aufhebung der vaskulären Permeabilität durch Diclofenac bzw. Icatibant zeigte erneut die Vermittlung dieser Reaktion über den Bradykinin-2-Rezeptor. Im Gegensatz zu den Versuchen in Aortenringen kam es durch die Variation der NO-Bioverfügbarkeit (Hemmung der eNOS mittels L-NAME oder eNOS-Überexpression in der Mäuselinie eNOS^{+/+}) zu keiner Änderung der Permeabilität. Vaskulärer oxidativer Stress hatte auch keinen Einfluss auf die durch Bradykinin bedingte vaskuläre Permeabilität. Die endothelspezifische Überexpression des humanen Bradykinin-2-Rezeptors in transgenen Versuchstieren (B2^{tg} bzw. BK⁺⁺) war jedoch mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität verbunden, was sowohl im Miles-Assay als auch mittels 2-Photon Mikroskopie gezeigt werden konnte.

Die Daten der vorliegenden Untersuchung haben somit gezeigt, dass Bradykinin, NO, C1-INH oder Icatibant keine Änderung der Proteinexpression des Bradykinin-2-Rezeptors verursachen. Somit ist eine Veränderung der Expression von B2 vermutlich nicht an der Pathogenese des Angioödems beteiligt. Zudem hat NO auch keine Wirkung auf die Bradykinin-vermittelte vaskuläre Extravasation im dorsalen Hautgewebe der Maus, aber die erhöhte endotheliale Expression des humanen Bradykinin-2-Rezeptors in transgenen Mäusen führte zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und könnte ein wichtiger Faktor sein bei der Pathogenese des Bradykinin-induzierten Angioödems. Zukünftige Ansätze, mit einer effektiven experimentellen Verknüpfung von physiologischen, molekularbiologischen Methoden und nicht-invasiven Darstellungen von funktionalen und strukturellen Aspekten biologischer Vorgänge werden weitere Fortschritte erbringen für das vertiefte Verständnis der involvierten biologischen Mechanismen und Faktoren.

6 SUMMARY

The role of transformation of bradykinin activity in hereditary angioedema and ACE inhibitor-induced angioedema has not yet been well recognized. This also includes regulation of the expression of the bradykinin B2 receptor. Until now, it has been little known whether and to what extent the changes in the sensitivity of the bradykinin B2 receptor after prolonged stimulation with bradykinin can happen. The same applies to the synthesis of vascular NO in response to the activation of the bradykinin B2 receptor. The aim of this work was to analyze the role of NO, bradykinin, C1 inhibitor, Icatibant and Diclofenac regarding the endothelial expression and activity of the bradykinin B2 receptor and involved signaling pathways. Another objective was to evaluate associated phenotypic changes by measuring aortic constriction as well as by determining vascular permeability using the Miles assay and two-photon microscopy. Since a direct examination of these issues on humans is not possible, the experimental setup is based on endothelial cells (porcine aortic endothelial cells, murine cerebral endothelial cells, endothelial umbilical cells) and on various organs of mouse lines (lung, left ventricular tissue, skin, ear, thoracic aortic rings).

The results of this work showed that the mRNA and protein expression of the bradykinin B2 receptor was not altered by treatment of different cells (PAEC, bEND.3 and HUVEC) with bradykinin or the NO donors DEA/NO and DETA/NO. The change of NO bioavailability in the pulmonary tissue, the left ventricular heart tissue or the dermal tissue by pretreatment with the NO-donor PETN, inhibition of eNOS by LNA or use of the transgenic mouse line eNOS $-/-$ and eNOS $+/+$ had no effect on the protein expression of the bradykinin B2 receptor. The same results were observed in the mouse pulmonary tissue when bradykinin synthesis was blocked with C1 inhibitor or when using the bradykinin antagonist Icatibant. The results of the present work demonstrated that NO has no influence on mobilization of ICa from intracellular pools. The bradykinin-induced increase in ICa was not altered by pre-incubation of bEND.3 cells with the NO donor DEA/NO.

Phenotypic changes were detected by measuring aortic constriction as well as by determining vascular permeability using the Miles assay and two-photon microscopy. The aortic ring constrictions in the mouse line C57BL/6 were induced by bradykinin and mediated via the bradykinin B2 receptor. The constriction was attenuated by NO and abolished by Diclofenac or Icatibant indicating the importance of eNOS and cyclooxygenase for the functional activation of the bradykinin B2 receptor. Also, the vascular permeability of the dorsal dermal tissue in the

mouse line C57BL/6 was increased by bradykinin and the same observation was made for histamine and labradimil. The removal of vascular permeability by Diclofenac or Icatibant again demonstrated the mediation of this response via the bradykinin B2 receptor. In contrast to the experiments in aortic rings, variation of the NO bioavailability (inhibition of eNOS by means of L-NAME or eNOS overexpression in the mouse line eNOS +/+) did not change the permeability. Vascular oxidative stress also had no effect on bradykinin-induced vascular permeability. However, endothelium-specific overexpression of the human bradykinin B2 receptor in transgenic test animals (B2tg and BK ++) was associated with increased vascular permeability that could be demonstrated both in the Miles assay and by two-photon microscopy.

Thus, the data of the present study demonstrated that bradykinin, NO, C1-INH or Icatibant cause no change in protein expression of the bradykinin B2 receptor. Therefore, the change in the expression of B2 is probably not involved in the pathogenesis of angioedema. In addition, NO also has no effect on bradykinin-mediated vascular extravasation in the mouse dorsal dermal tissue, but the increased endothelial expression of the human bradykinin B2 receptor in transgenic mice resulted in increased vascular permeability and could be an important factor in the pathogenesis of the mouse Bradykinin-induced angioedema. Future approaches with an effective experimental combination of physiological, molecular biological methods and non-invasive representations of functional and structural aspects of biological processes will provide further progress for deep understanding of involved biological mechanisms and factors.

7 BIBLIOGRAFIE

Abelous, J. E. and Bardier, E. (1909) 'Les substances hypotensives de l'urine humaine normale', *CR Soc Biol*, 66, pp. 511–520.

Adams, D. J. *et al.* (1989) 'Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3(12), pp. 2389–400.

Agostoni, A. *et al.* (2004) 'Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond.', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 114(3 Suppl), pp. S51-131. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.047.

Agostoni, A. and Cicardi, M. (2001) 'Drug-induced angioedema without urticaria.', *Drug safety*, 24(8), pp. 599–606.

Aktan, F. (2004) 'iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation', *Life Sciences*, 75(6), pp. 639–653. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042.

Alfie, M. E. *et al.* (1996) 'Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice.', *Biochemical and biophysical research communications*, 224(3), pp. 625–30. doi: 10.1006/bbrc.1996.1076.

Alfie, M. E. *et al.* (1997) 'Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors.', *Hypertension*, 29(1 Pt 2), pp. 483–7.

Älgenäs, C. *et al.* (2014) 'Antibody performance in western blot applications is context-dependent', *Biotechnology Journal*, 9(3), pp. 435–445. doi: 10.1002/biot.201300341.

Alp, N. J. and Channon, K. M. (2004) 'Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(3), pp. 413–20. doi: 10.1161/01.ATV.0000110785.96039.f6.

Andrew, P. J. and Mayer, B. (1999) 'Enzymatic function of nitric oxide synthases.', *Cardiovascular research*, 43(3), pp. 521–31.

Andrews, A. M. *et al.* (2010) 'Direct, real-time measurement of shear stress-induced nitric oxide produced from endothelial cells in vitro.', *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 23(4), pp. 335–42. doi: 10.1016/j.niox.2010.08.003.

Arnhold, S. *et al.* (1999) 'Nitric oxide decreases microvascular permeability in bradykinin stimulated and nonstimulated conditions.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 33(6), pp. 938–47.

Austin, C. E. *et al.* (1997) 'Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways.', *The Journal of biological chemistry*, 272(17), pp. 11420–5.

Bachvarov, D. R. *et al.* (1996) 'Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1).', *Genomics*, 33(3), pp. 374–81. doi: 10.1006/geno.1996.0213.

Bachvarov, D. R. *et al.* (1998) 'Characterization of two polymorphic sites in the human kinin B1 receptor gene: altered frequency of an allele in patients with a history of end-stage renal failure.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 9(4), pp. 598–604.

Bae, S. W. *et al.* (2003) 'Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway.', *Biochemical and biophysical research communications*, 306(4), pp. 981–7.

Banerji, A. *et al.* (2008) 'Multicenter study of patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema who present to the emergency department', *Annals of Allergy*,

- Asthma & Immunology*, 100(4), pp. 327–332. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60594-7.
- Banerji, A. (2010) 'Current treatment of hereditary angioedema: An update on clinical studies.', *Allergy and asthma proceedings: the official journal of regional and state allergy societies*, 31(5), pp. 398–406. doi: 10.2500/aap.2010.31.3387.
- Baptista, H. A. *et al.* (2002) 'Transcriptional regulation of the rat bradykinin B2 receptor gene: identification of a silencer element.', *Molecular pharmacology*, 62(6), pp. 1344–55.
- Bas, M. *et al.* (2004) '[ACE inhibitor-induced angioedema in the head and neck region. A matter of time?].', *HNO*, 52(10), pp. 886–90. doi: 10.1007/s00106-003-1017-5.
- Bas, M., Hoffmann, T., *et al.* (2007) 'Das ACE-Hemmer-induzierte Angioödem', *Laryngo-Rhino-Otologie*, 86(11), pp. 804–812. doi: 10.1055/s-2007-966932.
- Bas, M., Adams, V., *et al.* (2007) 'Nonallergic angioedema: Role of bradykinin', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 62(8), pp. 842–856. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01427.x.
- Bas, M. *et al.* (2010) 'Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series.', *Annals of emergency medicine*, 56(3), pp. 278–82. doi: 10.1016/j.annemergmed.2010.03.032.
- Bas, M. *et al.* (2015) 'A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema', *N Engl J Med*, 372(5), pp. 418–425. doi: 10.1056/NEJMoa1312524.
- Bas, M., Hoffmann, T. K. and Kojda, G. (2006) 'Evaluation and management of angioedema of the head and neck.', *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 14(3), pp. 170–5. doi: 10.1097/01.moo.0000193202.85837.7d.
- Basei, F. L. *et al.* (2012) 'Endothelium dependent expression and underlying mechanisms of des-Arg⁹-bradykinin-induced B₁R-mediated vasoconstriction in rat portal vein.', *Peptides*, 37(2), pp. 216–24. doi: 10.1016/j.peptides.2012.07.020.
- Baskurt, O. K., Yalcin, O. and Meiselman, H. J. (2004) 'Hemorheology and vascular control mechanisms.', *Clinical hemorheology and microcirculation*, 30(3–4), pp. 169–78.
- Bates, D. O. and Jones, R. O. P. (2003) 'The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing', *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2(2), pp. 107–120. doi: 10.1177/1534734603256626.
- Beaubien, G. *et al.* (1991) 'Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein.', *Biochemistry*, 30(6), pp. 1628–35.
- Beck, K. F. *et al.* (1999) 'Inducible NO synthase: role in cellular signalling.', *The Journal of experimental biology*, 202(Pt 6), pp. 645–653.
- Bellamy, T. C. *et al.* (2000) 'Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), pp. 2928–33.
- Bertuglia, S. (2004) 'Role of nitric oxide in capillary perfusion and oxygen delivery regulation during systemic hypoxia', *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 288(2), pp. H525–H531. doi: 10.1152/ajpheart.00426.2005.
- Bezalel, S. *et al.* (2015) 'Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema.', *The American journal of medicine*, 128(2), pp. 120–5. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.07.011.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. and Worthy, K. (1992) 'Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases.', *Pharmacological reviews*, 44(1), pp. 1–80.
- Bhupatiraju, C. *et al.* (2012) 'Association and interaction of -58C>T and ±9 bp polymorphisms of BDKRB2 gene causing susceptibility to essential hypertension.', *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)*, 34(3), pp. 230–5. doi: 10.3109/10641963.2011.631653.

- Björkqvist, J. *et al.* (2015) 'Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III', *Journal of Clinical Investigation*, 125(8), pp. 3132–3146. doi: 10.1172/JCI77139.
- Blaukat, A. *et al.* (1996) 'Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts.', *The Journal of biological chemistry*, 271(50), pp. 32366–74.
- Blaukat, A. *et al.* (2003) 'Downregulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 284(6), pp. H1909–H1916. doi: 10.1152/ajpheart.00034.2003.
- Bluestein, H. M. *et al.* (2009) 'Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema in a community hospital emergency department.', *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 103(6), pp. 502–7. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60267-0.
- Böckmann, S. and Paegelow, I. (2000) 'Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes.', *Journal of leukocyte biology*, 68(5), pp. 587–592.
- Boesiger, J. *et al.* (1998) 'Mast cells can secrete vascular permeability factor/ vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression.', *The Journal of experimental medicine*, 188(6), pp. 1135–45.
- Bogdan (2001a) 'Nitric oxide and the immune response.', *Nature immunology*, 2(10), pp. 907–16. doi: 10.1038/ni1001-907.
- Bogdan (2001b) 'Nitric oxide and the regulation of gene expression', *Trends in Cell Biology*, 11(2), pp. 66–75. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01900-0.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000) 'Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity.', *Current opinion in immunology*, 12(1), pp. 64–76.
- Boo, Y. C. *et al.* (2002) 'Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A.', *The Journal of biological chemistry*, 277(5), pp. 3388–96. doi: 10.1074/jbc.M108789200.
- Borić, M. P., Roblero, J. S. and Durán, W. N. (1987) 'Quantitation of bradykinin-induced microvascular leakage of FITC-dextran in rat cremaster muscle.', *Microvascular research*, 33(3), pp. 397–412.
- Bork, K. (2010) 'Recurrent angioedema and the threat of asphyxiation.', *Deutsches Ärzteblatt international*, 107(23), pp. 408–14. doi: 10.3238/arztebl.2010.0408.
- Bork, K. *et al.* (2012) 'Hereditäres Angioödem durch C1-Inhibitor-Mangel', *Allergo Journal*, 21(2), pp. 109–120. doi: 10.1007/s15007-012-0046-3.
- Bork, K. and Barnstedt, S. E. (2001) 'Treatment of 193 episodes of laryngeal edema with C1 inhibitor concentrate in patients with hereditary angioedema.', *Archives of internal medicine*, 161(5), pp. 714–8.
- Bork, K. and Hardt, J. (2009) 'Hereditary angioedema: increased number of attacks after frequent treatments with C1 inhibitor concentrate.', *The American journal of medicine*, 122(8), pp. 780–3. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.02.024.
- Borkowski, J. A. *et al.* (1995) 'Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons.', *The Journal of biological chemistry*, 270(23), pp. 13706–10.
- Bovenzi, V. *et al.* (2010) 'Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli.', *Journal of cellular physiology*, 222(1), pp. 168–76. doi:

10.1002/jcp.21933.

Bowen, T. *et al.* (2004) 'Canadian 2003 International Consensus Algorithm for the Diagnosis, Therapy, and Management of Hereditary Angioedema', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(3), pp. 629–637. doi: 10.1016/j.jaci.2004.06.043.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–54.

Braun, A. *et al.* (1996) 'Polymorphisms in the gene for the human B2-bradykinin receptor. New tools in assessing a genetic risk for bradykinin-associated diseases', *Immunopharmacology*, 33, pp. 32–35.

Bredt, D. S., Hwang, P. M. and Snyder, S. H. (1990) 'Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.', *Nature*, 347(6295), pp. 768–70. doi: 10.1038/347768a0.

Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1990) 'Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), pp. 682–5.

Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992) 'Nitric oxide, a novel neuronal messenger', *Neuron*. Elsevier, 8(1), pp. 3–11. doi: 10.1016/0896-6273(92)90104-L.

Briner, V. A., Tsai, P. and Schrier, R. W. (1993) 'Bradykinin: potential for vascular constriction in the presence of endothelial injury.', *The American journal of physiology*, 264(2 Pt 2), pp. F322-7.

Brochu, I. *et al.* (2002) 'Role of endothelin receptors in the hypertensive state of kinin B(2) knockout mice subjected to a high-salt diet.', *Clinical science (London, England : 1979)*, 103 Suppl, p. 380S–384S. doi: 10.1042/CS103S380S.

Brovkovych, V. *et al.* (2011) 'A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase.', *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(2), pp. 258–69. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00992.x.

Brown, L. F. *et al.* (1992) 'Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing.', *The Journal of experimental medicine*, 176(5), pp. 1375–9.

Brown, L. F. *et al.* (1997) 'Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine.', *EXS*, 79, pp. 233–69.

Brown, N. J. *et al.* (1996) 'Black Americans have an increased rate of angiotensin converting enzyme inhibitor-associated angioedema*', *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 60(1), pp. 8–13. doi: 10.1016/S0009-9236(96)90161-7.

Burnette, W. N. (1981) "'Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.', *Analytical biochemistry*, 112(2), pp. 195–203.

Busse, P. J. and Buckland, M. S. (2013) 'Non-histaminergic angioedema: focus on bradykinin-mediated angioedema.', *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 43(4), pp. 385–94. doi: 10.1111/cea.12019.

Cahalan, M. D. *et al.* (2002) 'Two-photon tissue imaging: seeing the immune system in a fresh light.', *Nature reviews. Immunology*, 2(11), pp. 872–80. doi: 10.1038/nri935.

Carman, C. V. *et al.* (2007) 'Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes', *Immunity*, 26(6), pp. 784–797. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.015.

Carman, C. V. and Springer, T. A. (2004) 'A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them.', *The Journal of cell biology*,

167(2), pp. 377–88. doi: 10.1083/jcb.200404129.

Caulin-Glaser, T. *et al.* (1997) '17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization.', *Circulation research*, 81(5), pp. 885–92.

Chai, K. X. *et al.* (1996) 'Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1.', *Genomics*, 31(1), pp. 51–7. doi: 10.1006/geno.1996.0008.

Chao, J. *et al.* (1998) 'Human kallikrein gene delivery attenuates hypertension, cardiac hypertrophy, and renal injury in Dahl salt-sensitive rats.', *Human gene therapy*, 9(1), pp. 21–31. doi: 10.1089/hum.1998.9.1-21.

Chao, J. *et al.* (2006) 'The tissue kallikrein-kinin system protects against cardiovascular and renal diseases and ischemic stroke independently of blood pressure reduction.', *Biological chemistry*, 387(6), pp. 665–75. doi: 10.1515/BC.2006.085.

Chao, J. *et al.* (2007) 'Kinin infusion prevents renal inflammation, apoptosis, and fibrosis via inhibition of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activity.', *Hypertension*, 49(3), pp. 490–7. doi: 10.1161/01.HYP.0000255925.01707.eb.

Chen, K., Pittman, R. N. and Popel, A. S. (2008) 'Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective.', *Antioxidants & redox signaling*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 10(7), pp. 1185–98. doi: 10.1089/ars.2007.1959.

Chen, Z. *et al.* (1999) 'Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen.', *The Journal of clinical investigation*, 103(3), pp. 401–6. doi: 10.1172/JCI5347.

Chen Hi, H. -i., Chiang, I.-P. and Jen, C. J. 'Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats.', *Journal of biomedical science*, 3(6), pp. 454–460.

Chiang, W.-C. *et al.* (2006) 'Early activation of bradykinin B2 receptor aggravates reactive oxygen species generation and renal damage in ischemia/reperfusion injury.', *Free radical biology & medicine*, 41(8), pp. 1304–14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.011.

Chiang, W.-C. *et al.* (2007) 'Bradykinin enhances reactive oxygen species generation, mitochondrial injury, and cell death induced by ATP depletion--a role of the phospholipase C-Ca(2+) pathway.', *Free radical biology & medicine*, 43(5), pp. 702–10. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.032.

Chidlow, J. H. and Sessa, W. C. (2010) 'Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation.', *Cardiovascular research*, 86(2), pp. 219–25. doi: 10.1093/cvr/cvq075.

Christopher, J. *et al.* (2001) 'Regulation of B(2)-kinin receptors by glucose in vascular smooth muscle cells.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280(4), pp. H1537–46.

Christopherson, K. S. and Bretz, D. S. (1997) 'Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease.', *The Journal of clinical investigation*, 100(10), pp. 2424–9. doi: 10.1172/JCI119783.

Cicardi, M. *et al.* (2010) 'Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema.', *The New England journal of medicine*, 363(6), pp. 532–41. doi: 10.1056/NEJMoa0906393.

Claesson-Welsh, L. and Welsh, M. (2013) 'VEGFA and tumour angiogenesis.', *Journal of internal medicine*, 273(2), pp. 114–27. doi: 10.1111/joim.12019.

- Clough, G. F., Bennett, A. R. and Church, M. K. (1998) 'Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging.', *The British journal of dermatology*, 138(5), pp. 806–14.
- Cochrane, C. G. and Revak, S. D. (1980) 'Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein.', *The Journal of experimental medicine*, 152(3), pp. 608–19.
- Cockcroft, J. R. *et al.* (1994) 'Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist.', *British journal of clinical pharmacology*, 38(4), pp. 317–21.
- Coelho, M. M. *et al.* (1997) 'Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats.', *British journal of pharmacology*, 121(2), pp. 296–302. doi: 10.1038/sj.bjp.0701110.
- Cohen, R. A. *et al.* (1997) 'Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), pp. 4193–8.
- Cohn, J. ., McDaniels, C. and Richards, N. (2012) 'Prompt reversal of airway obstruction secondary to angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) induced angioedema by ecallantide: a case report', *J Clin Immunol*, 129(Suppl. 1), p. AB828.
- Coppo, R. and Amore, A. (2000) 'Importance of the bradykinin-nitric oxide synthase system in the hypersensitivity reactions of chronic haemodialysis patients.', *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 15(9), pp. 1288–90.
- Costa-Neto, C. M. *et al.* (2008) 'Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies.', *International immunopharmacology*, 8(2), pp. 135–42. doi: 10.1016/j.intimp.2007.08.003.
- da Costa, P. L. N. *et al.* (2014) 'The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities', *Cancer Letters*, 345(1), pp. 27–38. doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.009.
- Couture, R. *et al.* (2001) 'Kinin receptors in pain and inflammation.', *European journal of pharmacology*, 429(1–3), pp. 161–76.
- Couture, Blaes and Girolami (2014) 'Kinin Receptors in Vascular Biology and Pathology', *Current Vascular Pharmacology*, 12, pp. 223–248.
- Cruden, N. L. M. and Newby, D. E. (2008) 'Therapeutic potential of icatibant (HOE-140, JE-049).', *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9(13), pp. 2383–90. doi: 10.1517/14656566.9.13.2383.
- Cugno, M. *et al.* (2003) 'Bradykinin and the pathophysiology of angioedema.', *International immunopharmacology*, 3(3), pp. 311–7. doi: 10.1016/S1567-5769(02)00162-5.
- Cui, Z. H. *et al.* (1999) 'Relationship between systemic blood pressure, airway blood flow and plasma exudation in guinea-pig.', *Acta physiologica Scandinavica*, 165(2), pp. 121–7. doi: 10.1046/j.1365-201x.1999.00491.x.
- Curry, F. R. E. and Adamson, R. H. (2010) 'Vascular permeability modulation at the cell, microvessel, or whole organ level: Towards closing gaps in our knowledge', *Cardiovascular Research*, 87(2), pp. 218–229. doi: 10.1093/cvr/cvq115.
- Daaka, Y. (2012) 'S-nitrosylation-regulated GPCR signaling.', *Biochimica et biophysica acta*, 1820(6), pp. 743–51. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.03.007.
- Danser, A. H. *et al.* (1998) 'Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart: importance of preformed pools of nitric oxide-containing factors.', *Journal of hypertension*, 16(2), pp. 239–44.
- Dao, V. T.-V. (2011) *Neue Mechanismen der kardiovaskulären Protektion durch körperliches Training*. Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany.

- Davissou, R. L. *et al.* (1996) 'Use-dependent loss of acetylcholine- and bradykinin-mediated vasodilation after nitric oxide synthase inhibition. Evidence for preformed stores of nitric oxide-containing factors in vascular endothelial cells.', *Hypertension*, 28(3), pp. 354–60.
- Dendorfer, A., Wolfrum, S. and Dominiak, P. (1999) 'Pharmacology and cardiovascular implications of the kinin-kallikrein system.', *Japanese journal of pharmacology*, 79(4), pp. 403–26.
- Denk, W., Strickler, J. H. and Webb, W. W. (1990) 'Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.', *Science (New York, N.Y.)*, 248(4951), pp. 73–6.
- Dhamrait, S. S. *et al.* (2003) 'Variation in bradykinin receptor genes increases the cardiovascular risk associated with hypertension.', *European heart journal*, 24(18), pp. 1672–80.
- Dimmeler, S. *et al.* (1999) 'Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.', *Nature*, 399(6736), pp. 601–5. doi: 10.1038/21224.
- Dixon, B. S., Sharma, R. V and Dennis, M. J. (1996) 'The bradykinin B2 receptor is a delayed early response gene for platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells.', *The Journal of biological chemistry*, 271(23), pp. 13324–32.
- Dray, A. and Perkins, M. (1993) 'Bradykinin and inflammatory pain.', *Trends in neurosciences*, 16(3), pp. 99–104.
- Duchene, J. *et al.* (2002) 'A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation.', *The Journal of biological chemistry*, 277(43), pp. 40375–83. doi: 10.1074/jbc.M202744200.
- Duchene, J. and Ahluwalia, A. (2009) 'The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease.', *Current opinion in pharmacology*, 9(2), pp. 125–131. doi: 10.1016/j.coph.2008.11.011.
- Duran, W. N., Breslin, J. W. and Sanchez, F. A. (2010) 'The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability', *Cardiovascular Research*, 87(2), pp. 254–261. doi: 10.1093/cvr/cvq139.
- Durán, W. N. and Dillon, P. K. (1990) 'Acute microcirculatory effects of platelet-activating factor.', *Journal of lipid mediators*, 2 Suppl, pp. S215-27.
- Dvorak (2007a) *Electron microscopic-facilitated understanding of endothelial cell biology: contributions established during the 1950s and 1960s*. Edited by W. Arid. New York: Cambridge University Press.
- Dvorak (2007b) *Tumor blood vessels*. New York: Cambridge University Press.
- Dvorak, A. M. *et al.* (1996) 'The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation.', *Journal of leukocyte biology*, 59(1), pp. 100–15.
- Dvorak, H. F., Dvorak, A. M., *et al.* (1979) 'Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression.', *Journal of the National Cancer Institute*, 62(6), pp. 1459–72.
- Dvorak, H. F., Orenstein, N. S., *et al.* (1979) 'Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 122(1), pp. 166–74.
- Dvorak, H. F. *et al.* (1981) 'Tumor shedding and coagulation.', *Science (New York, N.Y.)*, 212(4497), pp. 923–4.
- Dvorak, H. F. (2003) 'Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and

- stroma.', *The American journal of pathology*, 162(6), pp. 1747–57.
- Eliceiri, B. P. *et al.* (1999) 'Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability.', *Molecular cell*, 4(6), pp. 915–24.
- Emanuelli, C. *et al.* (1999) 'Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice.', *Circulation*, 100(23), pp. 2359–65.
- Emanuelli, C. *et al.* (2004) 'Akt/protein kinase B and endothelial nitric oxide synthase mediate muscular neovascularization induced by tissue kallikrein gene transfer.', *Circulation*, 110(12), pp. 1638–44. doi: 10.1161/01.CIR.0000142051.36244.83.
- Emerich, D. F. *et al.* (2001) 'The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation.', *Clinical pharmacokinetics*, 40(2), pp. 105–23. doi: 10.2165/00003088-200140020-00003.
- Emond, C. *et al.* (1990) 'Characterization of a B2-bradykinin receptor in rat renal mesangial cells.', *European journal of pharmacology*, 190(3), pp. 381–92.
- Enquist, J. *et al.* (2007) 'Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis.', *Molecular pharmacology*, 71(2), pp. 494–507. doi: 10.1124/mol.106.030858.
- Farkas, H. (2013) 'Current pharmacotherapy of bradykinin-mediated angioedema.', *Expert opinion on pharmacotherapy*, 14(5), pp. 571–86. doi: 10.1517/14656566.2013.778826.
- Fathy, D. B. *et al.* (1999) 'Spontaneous human B2 bradykinin receptor activity determines the action of partial agonists as agonists or inverse agonists. Effect of basal desensitization.', *The Journal of biological chemistry*, 274(42), pp. 29603–6.
- Faussner, A., Bathon, J. M. and Proud, D. (1999) 'Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation.', *Immunopharmacology*, 45(1–3), pp. 13–20.
- FDA (2009) *FDA Approves Berinert to Treat Abdominal Attacks, Facial Swelling Associated With Hereditary Angioedema.*
- Félétou, M., Bonnardel, E. and Canet, E. (1996) 'Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide.', *British journal of pharmacology*, 118(6), pp. 1371–6.
- Felipe, S. A. *et al.* (2007) 'Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta.', *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 40(5), pp. 649–55.
- Feng, D. *et al.* (1996) 'Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin.', *The Journal of experimental medicine*, 183(5), pp. 1981–6.
- Feng, D. *et al.* (1997) 'Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores.', *The Journal of physiology*, 504 (Pt 3, pp. 747–61.
- Feng, D. *et al.* (1999) 'Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators.', *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 6(1), pp. 23–44.
- Feng, D. *et al.* (2000) 'Different Pathways of Macromolecule Extravasation from Hyperpermeable Tumor Vessels', *Microvascular Research*, 59(1), pp. 24–37. doi: 10.1006/mvre.1999.2207.
- Feng, J. *et al.* (2005) 'Bradykinin preconditioning improves the profile of cell survival proteins and limits apoptosis after cardioplegic arrest.', *Circulation*, 112(9 Suppl), pp. I190-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524454.

- Feron, O. and Balligand, J.-L. (2006) 'Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart.', *Cardiovascular research*, 69(4), pp. 788–97. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.014.
- Fincham, C. I. *et al.* (2009) 'Bradykinin receptor antagonists--a review of the patent literature 2005-2008.', *Expert opinion on therapeutic patents*, 19(7), pp. 919–41. doi: 10.1517/13543770902994389.
- Fleming, I. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity.', *Circulation research*, 88(11), pp. E68-75.
- Förstermann, U. and Münzel, T. (2006) 'Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace.', *Circulation*, 113(13), pp. 1708–14. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532.
- Förstermann, U. and Sessa, W. C. (2012) 'Nitric oxide synthases: regulation and function.', *European heart journal*, 33(7), p. 829–37, 837a–837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Fox, A. J. *et al.* (1996) 'Bradykinin-evoked sensitization of airway sensory nerves: a mechanism for ACE-inhibitor cough.', *Nature medicine*, 2(7), pp. 814–7.
- Freitas, S. R. *et al.* (2009) 'Insertion/deletion polymorphism of the bradykinin type 2 receptor gene influence diastolic blood pressure.', *Journal of human hypertension*, 23(8), pp. 553–5. doi: 10.1038/jhh.2009.23.
- Frøkjær-Jensen, J. (1991) 'The endothelial vesicle system in cryofixed frog mesenteric capillaries analysed by ultrathin serial sectioning.', *Journal of electron microscopy technique*, 19(3), pp. 291–304. doi: 10.1002/jemt.1060190305.
- Fukai, T. *et al.* (2000) 'Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training.', *The Journal of clinical investigation*, 105(11), pp. 1631–1639. doi: 10.1172/JCI9551.
- Fukuhra, S. *et al.* (2006) 'Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1.', *Journal of biochemistry and molecular biology*, 39(2), pp. 132–9.
- Fukumura, D. *et al.* (2001) 'Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), pp. 2604–2609. doi: 10.1073/pnas.041359198.
- Fulton, D. *et al.* (1999) 'Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.', *Nature*, 399(6736), pp. 597–601. doi: 10.1038/21218.
- Funa, N. S. *et al.* (2009) 'Dysfunctional Microvasculature as a Consequence of Shb Gene Inactivation Causes Impaired Tumor Growth', *Cancer Research*, 69(5), pp. 2141–2148. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3797.
- Gabb, G. M. *et al.* (1996) 'Epidemiological study of angioedema and ACE inhibitors.', *Australian and New Zealand journal of medicine*, 26(6), pp. 777–82.
- Gainer, J. V. *et al.* (1998) 'Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects.', *The New England journal of medicine*, 339(18), pp. 1285–92. doi: 10.1056/NEJM199810293391804.
- Gainer, J. V. *et al.* (2000) 'Altered frequency of a promoter polymorphism of the kinin B2 receptor gene in hypertensive African-Americans.', *American journal of hypertension*, 13(12), pp. 1268–73.
- Galli, S. J. (1997) 'The Paul Kallos Memorial Lecture. The mast cell: a versatile effector cell for a challenging world.', *International archives of allergy and immunology*, 113(1–3), pp. 14–22.
- Galli, S. J. (2000) 'Mast cells and basophils.', *Current opinion in hematology*, 7(1), pp. 32–9.

- Garg, R. (1995) 'Overview of Randomized Trials of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Mortality and Morbidity in Patients With Heart Failure', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. American Medical Association, 273(18), p. 1450. doi: 10.1001/jama.1995.03520420066040.
- Gelée, B. *et al.* (2008) '[Angiotensin-converting enzyme inhibitor-related angioedema: emergency treatment with complement C1 inhibitor concentrate].', *La Revue de médecine interne / fondée ... par la Société nationale française de médecine interne*, 29(6), pp. 516–9. doi: 10.1016/j.revmed.2007.09.038.
- Ghosh, S. and Hayden, M. S. (2008) 'New regulators of NF-kappaB in inflammation.', *Nature reviews. Immunology*, 8(11), pp. 837–48. doi: 10.1038/nri2423.
- Giles, T. D. *et al.* (2012) 'Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins.', *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*, 14(4), pp. 198–205. doi: 10.1111/j.1751-7176.2012.00606.x.
- Golser, R. *et al.* (2000) 'Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation.', *The Journal of biological chemistry*, 275(8), pp. 5291–6.
- Goodfellow, V. S. *et al.* (1996) 'Bradykinin receptor antagonists containing N-substituted amino acids: in vitro and in vivo B(2) and B(1) receptor antagonist activity.', *Journal of medicinal chemistry*, 39(7), pp. 1472–84. doi: 10.1021/jm950716i.
- Griffith, O. W. and Kilbourn, R. G. (1996) 'Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids', in Katsatos, A. G. (ed.) *Methods in Enzymology, vol. 268: Nitric Oxide, Part A: Sources and Detection of NO*. Academic Press, San Diego, pp. 375–392.
- Gryglewski, R. J. *et al.* (2002) 'Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function.', *Pediatric pathology & molecular medicine*, 21(3), pp. 279–90. doi: 10.1080/02770930290056514.
- Grzybowski, A. and Pietrzak, K. 'Maria Goeppert-Mayer (1906–1972): two-photon effect on dermatology.', *Clinics in dermatology*, 31(2), pp. 221–5.
- Van Guilder, G. P. *et al.* (2008) 'Bradykinin type 2 receptor BE1 genotype influences bradykinin-dependent vasodilation during angiotensin-converting enzyme inhibition.', *Hypertension*, 51(2), pp. 454–9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.102574.
- Guo, M. *et al.* (2008) 'VE-cadherin and beta-catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability.', *American journal of physiology. Cell physiology*, 294(4), pp. C977–84. doi: 10.1152/ajpcell.90607.2007.
- Haddad, E. B. *et al.* (2000) 'Post-transcriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone.', *Molecular pharmacology*, 57(6), pp. 1123–31.
- Hammond, S. *et al.* (2011) 'Gap junctions and hydrogen peroxide are involved in endothelium-derived hyperpolarising responses to bradykinin in omental arteries and veins isolated from pregnant women.', *European journal of pharmacology*, 668(1–2), pp. 225–32. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.06.050.
- Han, E. D. *et al.* (2002) 'Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor.', *The Journal of clinical investigation*, 109(8), pp. 1057–63. doi: 10.1172/JCI14211.
- Hasan, A. A., Zisman, T. and Schmaier, A. H. (1998) 'Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp. 3615–20.
- Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005) 'The blood-brain barrier/neurovascular unit in health

- and disease.', *Pharmacological reviews*, 57(2), pp. 173–85. doi: 10.1124/pr.57.2.4.
- Hess, J. F. *et al.* (1994) 'Cloning and pharmacological characterization of bradykinin receptors.', *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, 27(8), pp. 1725–31.
- Hibbs, J. B. *et al.* (1988) 'Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 157(1), pp. 87–94. doi: 10.1016/S0006-291X(88)80015-9.
- Hibbs, J. B. and Bastian, N. R. (1999) 'The discovery of the biological synthesis of nitric oxide', in Fang, F. C. (ed.) *Nitric Oxide and Infection*. Kluwer Academic, pp. 13–33.
- Hill, S. J. *et al.* (1997) 'International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors.', *Pharmacological reviews*, 49(3), pp. 253–78.
- Hillmeister, P. *et al.* (2008) 'Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(11), pp. 1811–23. doi: 10.1038/jcbfm.2008.69.
- Hirawa, N. *et al.* (1999) 'Regression of glomerular injury by kallikrein infusion in Dahl salt-sensitive rats is a bradykinin B2-receptor-mediated event.', *Nephron*, 81(2), pp. 183–93. doi: 45275.
- Hoover, T. *et al.* (2010) 'Angiotensin converting enzyme inhibitor induced angio-oedema: a review of the pathophysiology and risk factors.', *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(1), pp. 50–61. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03323.x.
- Houle, S. *et al.* (2000) 'Effect of allelic polymorphism of the B(1) and B(2) receptor genes on the contractile responses of the human umbilical vein to kinins.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 294(1), pp. 45–51.
- Houle, S. *et al.* (2003) 'Tissue kallikrein actions at the rabbit natural or recombinant kinin B2 receptors.', *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 41(3), pp. 611–7. doi: 10.1161/01.HYP.0000054971.03046.9B.
- Hu, G. and Minshall, R. D. (2009) 'Regulation of transendothelial permeability by Src Kinase', *Microvascular Research*, 77(1), pp. 21–25. doi: 10.1016/j.mvr.2008.10.002.
- Hughes, S. R., Williams, T. J. and Brain, S. D. (1990) 'Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P.', *European journal of pharmacology*, 191(3), pp. 481–4.
- Imanishi, T. *et al.* (2006) 'Enhancement of serotonin- and bradykinin-evoked calcium ion dynamics in differentiated NG108-15 cells', *Neuroscience Letters*, 405(1–2), pp. 1–4. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.035.
- Javanmard, S. H. *et al.* (2009) 'L-Arginine supplementation enhances eNOS expression in experimental model of hypercholesterolemic rabbits aorta.', *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology / ISP*, 16(1), pp. 9–13. doi: 10.1016/j.pathophys.2008.11.003.
- Ju, H. *et al.* (1998) 'Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase.', *The Journal of biological chemistry*, 273(37), pp. 24025–9.
- Kakoki, M. *et al.* (2007) 'Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(18), pp. 7576–81. doi: 10.1073/pnas.0701617104.
- Kakoki, M. and Smithies, O. (2009) 'The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the

- kidney.', *Kidney international*, 75(10), pp. 1019–30. doi: 10.1038/ki.2008.647.
- Kaplan, A. P. (2010a) 'Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: the role of C1 inhibitor therapy.', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(5), pp. 918–25. doi: 10.1016/j.jaci.2010.08.012.
- Kaplan, A. P. (2010b) 'Kinins, airway obstruction, and anaphylaxis.', *Chemical immunology and allergy*, 95, pp. 67–84. doi: 10.1159/000315938.
- Kaplan, A. P. (2014) 'Bradykinin-Mediated Diseases', *Chem Immunol Allergy*, 100, pp. 140–147.
- Kaplan, A. P. and Ghebrehiwet, B. (2010) 'The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement.', *Molecular immunology*, 47(13), pp. 2161–9. doi: 10.1016/j.molimm.2010.05.010.
- Kaplan, A. P. and Joseph, K. (2010) 'The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema.', *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 104(3), pp. 193–204. doi: 10.1016/j.anai.2010.01.007.
- Kaplan, A. P. and Kusumam, J. (2014) 'Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway', *Advances in Immunology*, 121, pp. 41–89.
- Kayashima, Y., Smithies, O. and Kakoki, M. (2012) 'The kallikrein-kinin system and oxidative stress.', *Current opinion in nephrology and hypertension*, 21(1), pp. 92–6. doi: 10.1097/MNH.0b013e32834d54b1.
- Kelemen, Z. et al. (2010) 'Baseline level of functional C1-inhibitor correlates with disease severity scores in hereditary angioedema', *Clinical Immunology*, 134(3), pp. 354–358. doi: 10.1016/j.clim.2009.11.002.
- Kellogg, D. L. et al. (2005) 'Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(2), pp. 629–32. doi: 10.1152/japplphysiol.00728.2004.
- Khosravani, F. et al. (2015) 'Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(3), pp. 285–294. doi: 10.1111/all.12556.
- Kim, S. J. et al. (2014) 'Angioedema deaths in the United States, 1979–2010', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 113(6), pp. 630–634. doi: 10.1016/j.anai.2014.09.003.
- Kishi, F., Nakaya, Y. and Ito, S. (1998) 'Histamine H2-receptor-mediated nitric oxide release from porcine endothelial cells.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 32(2), pp. 177–82.
- Knigge, H. et al. (2000) 'G(-699)/C polymorphism in the bradykinin-1 receptor gene in patients with renal failure.', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 15(5), pp. 586–8.
- Kobayashi, I. et al. (1994) 'Platelet-activating factor modulates microvascular transport by stimulation of protein kinase C.', *The American journal of physiology*, 266(3 Pt 2), pp. H1214–20.
- Kocgirli, O. et al. (2010) 'No Title', *Cardiovascular research*, 87(Supplement 1), p. S54.
- Koch, S. et al. (2011) 'Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors.', *The Biochemical journal*, 437(2), pp. 169–83. doi: 10.1042/BJ20110301.
- Koh, K. K. et al. (1999) 'Mechanism by which quinapril improves vascular function in coronary artery disease.', *The American journal of cardiology*, 83(3), pp. 327–31.
- Kohn, S. et al. (1992) 'Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small

- veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels.', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 67(5), pp. 596–607.
- Kojda, G. *et al.* (1998) 'Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates.', *Molecular pharmacology*, 53(3), pp. 547–54.
- Kojda, G. *et al.* (1999) 'Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control.', *Cardiovascular research*, 42(1), pp. 206–13.
- Kolluru, G. K. *et al.* (2010) 'Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis.', *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 22(4), pp. 304–15. doi: 10.1016/j.niox.2010.02.004.
- Komarova, Y. and Malik, A. B. (2010) 'Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways.', *Annual review of physiology*, 72, pp. 463–93. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135833.
- Kostis, J. B. *et al.* (2005) 'Incidence and characteristics of angioedema associated with enalapril.', *Archives of internal medicine*, 165(14), pp. 1637–42. doi: 10.1001/archinte.165.14.1637.
- Koval, M. and Battacharya, J. (2006) 'Vascular Gap Junctions', in Shepro, D. (ed.) *Microvascular research - biology and pathology*. Elsevier Academic Press, pp. 317–320.
- Kränkel, N. *et al.* (2008) 'Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential.', *Circulation research*, 103(11), pp. 1335–43. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.179952.
- Kränkel, N. *et al.* (2013) 'Novel insights into the critical role of bradykinin and the kinin B2 receptor for vascular recruitment of circulating endothelial repair-promoting mononuclear cell subsets: alterations in patients with coronary disease.', *Circulation*, 127(5), pp. 594–603. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.118117.
- Kraut, H., Frey, E. and Werle, E. (1930) 'Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdrüse', *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*, 189(3–4), pp. 97–106.
- Kroegel, C. (2002) *Asthma bronchiale - Pathologische Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Kubes, P. and Granger, D. N. (1992) 'Nitric oxide modulates microvascular permeability.', *The American journal of physiology*, 262(2 Pt 2), pp. H611-5.
- Kuchan, M. J., Jo, H. and Frangos, J. A. (1994) 'Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells.', *The American journal of physiology*, 267(3 Pt 1), pp. C753-8.
- Kuhlencordt, P. J. *et al.* (2001) 'Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice.', *Circulation*, 103(25), pp. 3099–104.
- Kuhr, F., Zhang, Y., *et al.* (2010) 'Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), pp. 2475–83. doi: 10.1096/fj.09-148783.
- Kuhr, F., Lowry, J., *et al.* (2010) 'Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors.', *Neuropeptides*, 44(2), pp. 145–54. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004.
- Kumar, P. *et al.* (2009) 'Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications

- in inflammation', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11(October 2015), p. e19. doi: 10.1017/S1462399409001112.
- Kuoppala, a *et al.* (2000) 'Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 278(4), pp. H1069–H1074.
- Kurose, I. *et al.* (1993) 'Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage.', *Circulation research*, 73(1), pp. 164–71.
- Kwak, S.-J. *et al.* (2011) 'Local kallikrein-kinin system is involved in podocyte apoptosis under diabetic conditions.', *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 16(5), pp. 478–90. doi: 10.1007/s10495-011-0585-1.
- Lacoste, B. *et al.* (2013) 'Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice.', *Journal of neuroinflammation*, 10, p. 57. doi: 10.1186/1742-2094-10-57.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.', *Nature*, 227(5259), pp. 680–5.
- Lal, B. K. *et al.* (2001) 'VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways.', *Microvascular research*, 62(3), pp. 252–62. doi: 10.1006/mvre.2001.2338.
- Lamalice, L., Houle, F. and Huot, J. (2006) 'Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF.', *The Journal of biological chemistry*, 281(45), pp. 34009–20. doi: 10.1074/jbc.M603928200.
- Lamb, M. E., De Weerd, W. F. and Leeb-Lundberg, L. M. (2001) 'Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells.', *The Biochemical journal*, 355(Pt 3), pp. 741–50.
- Lamontagne, D. *et al.* (1996) 'Mechanisms of kinin B1-receptor-induced hypotension in the anesthetized dog.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 28(5), pp. 645–50.
- Lantoine, F. *et al.* (1998) 'Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca²⁺ influx.', *The Biochemical journal*, 330 (Pt 2, pp. 695–9.
- Lee, D. K. *et al.* (2004) 'Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors.', *The Journal of biological chemistry*, 279(9), pp. 7901–8. doi: 10.1074/jbc.M306377200.
- Lee, Y.-J. *et al.* (2002) 'Upregulation of bradykinin B2 receptor expression by neurotrophic factors and nerve injury in mouse sensory neurons.', *Molecular and cellular neurosciences*, 19(2), pp. 186–200. doi: 10.1006/mcne.2001.1073.
- Leeb-Lundberg, L. M. F. *et al.* (2005) 'International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences.', *Pharmacological reviews*, 57(1), pp. 27–77. doi: 10.1124/pr.57.1.2.
- Leeb-Lundberg, L. M. F. (2012) 'Kinin receptor signalling and regulation', in Bader, M. (ed.) *Kinins*. Berlin: deGruyter, pp. 33–50.
- Leeb-Lundberg, L. M., Mathis, S. A. and Herzig, M. C. (1994) 'Antagonists of bradykinin that stabilize a G-protein-uncoupled state of the B2 receptor act as inverse agonists in rat myometrial cells.', *The Journal of biological chemistry*, 269(42), pp. 25970–3.
- Leffler, C. W., Parfenova, H. and Jaggar, J. H. (2011) 'Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(1), pp. H1–H11. doi: 10.1152/ajpheart.00230.2011.
- Levick, J. R. (2010) *An introduction to cardiovascular physiology*.

- Lewis, L. M. (2013) 'Angioedema: Etiology, Pathophysiology, Current and Emerging Therapies', *The Journal of Emergency Medicine*. Elsevier Ltd, 45(5), pp. 789–796. doi: 10.1016/j.jemermed.2013.03.045.
- Li, H. *et al.* (2003) 'Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells.', *Circulation*, 107(18), pp. 2348–54. doi: 10.1161/01.CIR.0000066697.19571.AF.
- Liesmaa, I. *et al.* (2007) 'Lovastatin induces the expression of bradykinin type 2 receptors in cultured human coronary artery endothelial cells.', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 43(5), pp. 593–600. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.08.007.
- Liesmaa, I. *et al.* (2009) 'Hypoxia-induced expression of bradykinin type-2 receptors in endothelial cells triggers NO production, cell migration, and angiogenesis.', *Journal of cellular physiology*, 221(2), pp. 359–66. doi: 10.1002/jcp.21861.
- Loiola, R. A. *et al.* (2011) 'Role of vascular Kinin B1 and B2 receptors in endothelial nitric oxide metabolism.', *Peptides*, 32(8), pp. 1700–5. doi: 10.1016/j.peptides.2011.06.010.
- Lötvall, J. O. *et al.* (1991) 'Bradykinin-induced airway microvascular leakage is potentiated by captopril and phosphoramidon.', *European journal of pharmacology*, 200(2–3), pp. 211–7.
- Lumry, W. R. *et al.* (2011) 'Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B₂ receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial.', *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 107(6), pp. 529–37. doi: 10.1016/j.anai.2011.08.015.
- Lung, C. C. *et al.* (1998) 'Induction of human B2 bradykinin receptor mRNA and membrane receptors by IFN γ .', *Immunopharmacology*, 39(3), pp. 243–53.
- Lunn, M. and Banta, E. (2011) 'Ecallantide for the Treatment of Hereditary Angiodema in Adults', *Clinical Medicine Insights: Cardiology*, 5, p. 49. doi: 10.4137/CMC.S4434.
- Ma, J. X. *et al.* (1994) 'Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B2 receptor.', *Genomics*, 23(2), pp. 362–9. doi: 10.1006/geno.1994.1512.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997) 'Nitric oxide and macrophage function.', *Annual review of immunology*, 15, pp. 323–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323.
- Madeddu, P. *et al.* (1997) 'Regulation of bradykinin B2-receptor expression by oestrogen.', *British journal of pharmacology*, 121(8), pp. 1763–9. doi: 10.1038/sj.bjp.0701255.
- Madeddu, P. *et al.* (1999) 'Role of the bradykinin B2 receptor in the maturation of blood pressure phenotype: lesson from transgenic and knockout mice.', *Immunopharmacology*, 44(1–2), pp. 9–13.
- Maizel, J. V, Summers, D. F. and Scharff, M. D. (1970) 'SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells.', *Journal of cellular physiology*, 76(3), pp. 273–87. doi: 10.1002/jcp.1040760307.
- Majno, G., Palade, G. E. and Schoefl, G. I. (1961) 'Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study.', *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 11, pp. 607–26.
- Majno, G., Shea, S. M. and Leventhal, M. (1969) 'Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study.', *The Journal of cell biology*, 42(3), pp. 647–72.
- Makani, H. *et al.* (2012) 'Meta-analysis of randomized trials of angioedema as an adverse event of renin-angiotensin system inhibitors.', *The American journal of cardiology*, 110(3), pp. 383–91. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.03.034.
- Maltais, I. *et al.* (2002) 'Bradykinin B2 receptor gene polymorphism is associated with altered urinary albumin/creatinine values in diabetic patients.', *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 80(4), pp. 323–7.

- Mandle, R. J., Colman, R. W. and Kaplan, A. P. (1976) 'Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), pp. 4179–83.
- Mannaioni, P. F. *et al.* 'Interaction between histamine and nitric oxide in rat mast cells and in isolated guinea pig hearts.', *International archives of allergy and immunology*, 113(1–3), pp. 297–9.
- Marceau, F. *et al.* (1994) 'Effects of peptide and nonpeptide antagonists of bradykinin B2 receptors on the vasoconstrictor action of bradykinin.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 269(3), pp. 1136–43.
- Marceau, F. (1995) 'Kinin B1 receptors: a review.', *Immunopharmacology*, 30(1), pp. 1–26.
- Marceau, F. *et al.* (2002) 'Kinin receptors: functional aspects.', *International immunopharmacology*, 2(13–14), pp. 1729–39.
- Marceau, F. *et al.* (2010) 'Vascular smooth muscle contractility assays for inflammatory and immunological mediators.', *International immunopharmacology*, 10(11), pp. 1344–53. doi: 10.1016/j.intimp.2010.08.016.
- Marceau, F., Hess, J. F. and Bachvarov, D. R. (1998) 'The B1 receptors for kinins.', *Pharmacological reviews*, 50(3), pp. 357–86.
- Margolius, H. S. *et al.* (1976) 'Relationships among urinary kallikrein, mineralocorticoids and human hypertensive disease.', *Federation proceedings*, 35(2), pp. 203–6.
- Marketou, M. *et al.* (2010) 'Cardioprotective effects of a selective B(2) receptor agonist of bradykinin post-acute myocardial infarct.', *American journal of hypertension*, 23(5), pp. 562–8. doi: 10.1038/ajh.2010.20.
- Marshall, I. (1984) 'Characterization and distribution of histamine H1- and H2-receptors in precapillary vessels.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 6 Suppl 4, pp. S587–97.
- Martin, T. W. and Wysolmerski, R. B. (1987) 'Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent pathways for release of arachidonic acid from phosphatidylinositol in endothelial cells.', *The Journal of biological chemistry*, 262(27), pp. 13086–92.
- Maurer, M. *et al.* (2011) 'New topics in bradykinin research', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66(11), pp. 1397–1406. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02686.x.
- Mayer, B. *et al.* (1989) 'Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase.', *Biochemical and biophysical research communications*, 164(2), pp. 678–85.
- Mayer, B. (2000) *Nitric Oxide*. Springer.
- Mayhan, W. G. (1992) 'Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin.', *Inflammation*, 16(4), pp. 295–305.
- McDaniel, C., Baram, M. and Wordell, C. (2011) 'Ecallantide treatment for angiotensin converting enzyme inhibitor induced angioedema (ACEI-IA): a case series and pharmacoeconomic assessment', *Crit Care Med*, 39(Suppl), p. 260.
- McLean, P. G., Perretti, M. and Ahluwalia, A. (2000) 'Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function.', *Cardiovascular research*, 48(2), pp. 194–210.
- Medeiros, R. *et al.* (2004) 'Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways.', *Circulation research*, 94(10), pp. 1375–82. doi: 10.1161/01.RES.0000128404.65887.08.

- Megerian, C. A., Arnold, J. E. and Berger, M. (1992) 'Angioedema: 5 years' experience, with a review of the disorder's presentation and treatment.', *The Laryngoscope*, 102(3), pp. 256–60. doi: 10.1288/00005537-199203000-00005.
- Mehta, D. and Malik, A. B. (2006) 'Signaling mechanisms regulating endothelial permeability.', *Physiological reviews*, 86(1), pp. 279–367. doi: 10.1152/physrev.00012.2005.
- Meininger, G. A. and Davis, M. J. (1992) 'Cellular mechanisms involved in the vascular myogenic response.', *The American journal of physiology*, 263(3 Pt 2), pp. H647-59.
- Menke, J. G. *et al.* (1994) 'Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor.', *The Journal of biological chemistry*, 269(34), pp. 21583–6.
- Merino, V. F. *et al.* (2009) 'Predisposition to atherosclerosis and aortic aneurysms in mice deficient in kinin B1 receptor and apolipoprotein E.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87(10), pp. 953–63. doi: 10.1007/s00109-009-0501-0.
- Michel, C. C. and Curry, F. E. (1999) 'Microvascular permeability.', *Physiological reviews*, 79(3), pp. 703–61.
- Miles, A. (1969) 'The kinin system. A history and review of the kinin system.', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 173(1032), pp. 341–9.
- Miles, A. A. and Miles, E. M. (1952) 'Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pigs.', *The Journal of physiology*, 118(2), pp. 228–57.
- Miller, D. R. *et al.* (2008) 'Angioedema Incidence in US Veterans Initiating Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors', *Hypertension*, 51(6), pp. 1624–1630. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110270.
- Minshall, R. D. *et al.* (2000) 'Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway.', *The Journal of cell biology*, 150(5), pp. 1057–70.
- Miyazaki-Akita, A. *et al.* (2007) '17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320(2), pp. 591–8. doi: 10.1124/jpet.106.111641.
- Molinaro, G., Cugno, M., *et al.* (2002) 'Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 303(1), pp. 232–7. doi: 10.1124/jpet.102.038067.
- Molinaro, G., Ervais, N., *et al.* (2002) 'Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: an in vitro experimental approach.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 33(6), pp. 1712–6.
- Moncada, S. and Higgs, A. (eds) (2006) *The Vascular Endothelium I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbook of Experimental Pharmacology). doi: 10.1007/3-540-32967-6.
- Mondillo, C. *et al.* (2009) 'Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats.', *Biology of reproduction*, 80(1), pp. 144–52. doi: 10.1095/biolreprod.108.069484.
- Monteiro, A. C. *et al.* (2007) 'Bradykinin B2 Receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses.', *PLoS pathogens*, 3(11), p. e185. doi: 10.1371/journal.ppat.0030185.
- Moore, P. K. *et al.* (1990) 'L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro.', *British journal of pharmacology*,

99(2), pp. 408–12.

Morand-Contant, M., Anand-Srivastava, M. B. and Couture, R. (2010) 'Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(5), pp. H1625-32. doi: 10.1152/ajpheart.00735.2009.

Moreau, M. E. *et al.* (2005) 'The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets.', *Journal of pharmacological sciences*, 99(1), pp. 6–38. doi: 10.1254/jphs.SRJ05001X.

Motta, G. *et al.* (1998) 'High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation.', *Blood*, 91(2), pp. 516–28.

Mukae, S. *et al.* (2000) 'Bradykinin B(2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough.', *Hypertension*, 36(1), pp. 127–31.

Mukae, S. *et al.* (2002) 'Association of polymorphisms of the renin-angiotensin system and bradykinin B2 receptor with ACE-inhibitor-related cough.', *Journal of human hypertension*, 16(12), pp. 857–63. doi: 10.1038/sj.jhh.1001486.

Mülsch, A., Bassenge, E. and Busse, R. (1989) 'Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism.', *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 340(6 Pt 2), pp. 767–70.

Murakami, H. *et al.* (1998) 'Human kallikrein gene delivery protects against gentamycin-induced nephrotoxicity in rats.', *Kidney international*, 53(5), pp. 1305–13. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00867.x.

Murray, M. A., Heistad, D. D. and Mayhan, W. G. (1991) 'Role of protein kinase C in bradykinin-induced increases in microvascular permeability.', *Circulation research*, 68(5), pp. 1340–8.

Murray, S. R., Chao, J. and Chao, L. (1992) 'Evolution of the kallikrein gene family.', *Agents and actions. Supplements*, 38 (Pt 1), pp. 26–33.

Nagy, J. *et al.* (2008) 'Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis', *Angiogenesis*, 11(2), pp. 109–119. doi: 10.1007/s10456-008-9099-z.

Nagy, J. A. *et al.* (1995) 'Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation.', *Cancer research*, 55(2), pp. 360–8.

Nagy, J. A. *et al.* (2002) 'Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis.', *The Journal of experimental medicine*, 196(11), pp. 1497–506.

Nagy, J. A. *et al.* (2006) 'Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A.', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(8), pp. 767–80. doi: 10.1038/labinvest.3700436.

Nagy, J. A., Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F. (2003) 'VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis.', *Trends in cardiovascular medicine*, 13(5), pp. 169–75.

Naicker, S. *et al.* (1999) 'Tissue kallikrein and kinins in renal disease.', *Immunopharmacology*, 44(1–2), pp. 183–92.

Napoli, C. and Ignarro, L. J. (2001) 'Nitric oxide and atherosclerosis.', *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 5(2), pp. 88–97. doi: 10.1006/niox.2001.0337.

National Institute of Health (2009) *NCT01036659: Evaluation of ecallantide for the acute treatment of angiotensin converting enzyme inhibitor induced angioedema (ACE)*.

National Institute of Health (2010) *NCT01154361: Amelioration of Angiotensin Converting*

Enzyme Inhibitor Induced Angioedema Study.

National Institute of Health (2011) *NCT01343823: evaluation of ecallantide for treatment of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor induced angioedema.*

Neal, C. R. and Michel, C. C. (1995) 'Transcellular gaps in microvascular walls of frog and rat when permeability is increased by perfusion with the ionophore A23187.', *The Journal of physiology*, 488 (Pt 2, pp. 427–37.

Nekooeian, A. A. *et al.* (1998) 'Chronic 17beta-estradiol augments relaxant role of basal nitric oxide in blood vessels from rats with heart failure.', *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 358(6), pp. 671–7.

Nielsen, E. W. and Gramstad, S. (2006) 'Angioedema from angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor treated with complement 1 (C1) inhibitor concentrate.', *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 50(1), pp. 120–2. doi: 10.1111/j.1399-6576.2005.00819.x.

Nishikawa, K. *et al.* (1992) 'Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein.', *Blood*, 80(8), pp. 1980–8.

Nishio, K. *et al.* (2011) 'Angiotensin-converting enzyme and bradykinin gene polymorphisms and cough: A meta-analysis.', *World journal of cardiology*, 3(10), pp. 329–36. doi: 10.4330/wjc.v3.i10.329.

Niu, W. *et al.* (2010) 'A meta-analysis of the bradykinin B2 receptor gene --58C/T polymorphism with hypertension.', *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 411(5–6), pp. 324–8. doi: 10.1016/j.cca.2009.12.015.

Noda, M. *et al.* (2007) 'Multifunctional effects of bradykinin on glial cells in relation to potential anti-inflammatory effects.', *Neurochemistry international*, 51(2–4), pp. 185–91. doi: 10.1016/j.neuint.2007.06.017.

O'Driscoll, G. *et al.* (1999) 'Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus.', *Journal of the American College of Cardiology*, 33(6), pp. 1506–11.

Oeseburg, H. *et al.* (2009) 'Bradykinin protects against oxidative stress-induced endothelial cell senescence.', *Hypertension*, 53(2), pp. 417–22. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123729.

Oliveira-Paula, G. H., Lacchini, R. and Tanus-Santos, J. E. (2015) 'Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms', *Gene*. Elsevier B.V., 575(2), pp. 584–599. doi: 10.1016/j.gene.2015.09.061.

Ongali, B. *et al.* (2003) 'Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy.', *The Journal of comparative neurology*, 461(4), pp. 506–19. doi: 10.1002/cne.10706.

Oppermann, M. *et al.* (2009) 'Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo.', *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(7), pp. 1271–8. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00627.x.

Oppermann, M. *et al.* (2011) 'Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-dependent posttranslational modification.', *Basic research in cardiology*, 106(4), pp. 539–49. doi: 10.1007/s00395-011-0160-5.

Pacher, P., Beckman, J. S. and Liaudet, L. (2007) 'Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.', *Physiological reviews*, 87(1), pp. 315–424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006.

Palade, G. (1960) 'Transport of quanta across the endothelium of blood capillarie', *Anat Rec*, 136, p. 254.

Palade, G. (1988) 'The microvascular endothelium revisited', in Simionescu, N. and

- Simionescu, M. (eds) *revisited*. In: Simionescu N, Simionescu M (eds) *Endothelial cell biology*. New York: Plenum Press.
- Palade, G., Simionescu, M. and Simionescu, N. (1982) 'Differentiated microdomains in the vascular endothelium', in Nossel, H. and Vogel, H. (eds) *Pathobiology of the Endothelial Cell*. New York: Academic Press.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S. and Moncada, S. (1988) 'Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.', *Nature*, 333(6174), pp. 664–6. doi: 10.1038/333664a0.
- Pardridge, W. M. (1998) *Introduction to the blood-brain barrier: methodology, biology and pathology*. Cambridge University Press.
- Parsons, M. E. and Ganellin, C. R. (2006) 'Histamine and its receptors.', *British journal of pharmacology*, 147 Suppl, pp. S127-35. doi: 10.1038/sj.bjp.0706440.
- Perez, D. V. *et al.* (2011) 'Angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: two cases of successful treatment with a novel B2 bradykinin antagonist', in *American Academy of Allergy Asthma and Immunology Annual Meeting*, p. Abstract 393.
- Pesquero, J. B. *et al.* (1994) 'Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing.', *The Journal of biological chemistry*, 269(43), pp. 26920–5.
- Pesquero, J. B. *et al.* (1996) 'Transcriptional regulatory elements in the rat bradykinin B2 receptor gene.', *Immunopharmacology*, 33(1–3), pp. 36–41.
- Pesquero, J. B. *et al.* (2000) 'Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), pp. 8140–5. doi: 10.1073/pnas.120035997.
- Pettersson, A. *et al.* (2000) 'Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor.', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(1), pp. 99–115.
- Phung, T. L. *et al.* (2006) 'Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin.', *Cancer cell*, 10(2), pp. 159–70. doi: 10.1016/j.ccr.2006.07.003.
- Pigman, E. C. and Scott, J. L. (1993) 'Angioedema in the emergency department: the impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors.', *The American journal of emergency medicine*, 11(4), pp. 350–4.
- Potter, S. M. (1996) 'Vital imaging: two photons are better than one.', *Current biology: CB*, 6(12), pp. 1595–8.
- Praddaude, F. *et al.* (1995) 'In vivo and in vitro homologous desensitization of rat glomerular bradykinin B2 receptors.', *European journal of pharmacology*, 294(1), pp. 173–82.
- Prados, M. D. *et al.* (2003) 'A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma', *Neuro-Oncology*, 5(2), pp. 96–103. doi: 10.1093/neuonc/5.2.96.
- Predescu, D. *et al.* (2005) 'Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity.', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 289(3), pp. L371–L381. doi: 10.1152/ajplung.00175.2004.
- Predescu, D. and Palade, G. E. (1993) 'Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium.', *The American journal of physiology*, 265(2 Pt 2), pp. H725-33.
- Predescu, S. A., Predescu, D. N. and Malik, A. B. (2007) 'Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability.', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293(4), pp. L823-42. doi: 10.1152/ajplung.00436.2006.

- Price, R. G. (1982) 'Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease.', *Toxicology*, 23(2–3), pp. 99–134.
- Put, S. *et al.* (2014) 'Molecular imaging of rheumatoid arthritis: emerging markers, tools, and techniques.', *Arthritis research & therapy*, 16(2), p. 208. doi: 10.1186/ar4542.
- Radi, Z. A., Kehrli, M. E. and Ackermann, M. R. 'Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration.', *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), pp. 516–29.
- Radu, M. and Chernoff, J. (2013) 'An *in vivo* Assay to Test Blood Vessel Permeability', *Journal of Visualized Experiments*, (73), p. e50062. doi: 10.3791/50062.
- Raidoo, D. M. *et al.* (1997) 'Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease.', *Immunopharmacology*, 36(2–3), pp. 153–60.
- Ramírez, M. M. *et al.* (1995) 'Platelet activating factor modulates microvascular permeability through nitric oxide synthesis.', *Microvascular research*, 50(2), pp. 223–34. doi: 10.1006/mvre.1995.1055.
- Ramírez, M. M., Kim, D. D. and Durán, W. N. (1996) 'Protein kinase C modulates microvascular permeability through nitric oxide synthase.', *The American journal of physiology*, 271(4 Pt 2), pp. H1702-5.
- Rang, H. *et al.* (2007) 'How drugs act: cellular aspects – excitation, contraction and secretion', in Rang, H. *et al.* (eds) *Pharmacology*. London: Churchill Livingstone Elsevier.
- Reddigari, S. and Kaplan, A. P. (1989) 'Quantification of human high molecular weight kininogen by immunoblotting with a monoclonal anti-light chain antibody.', *Journal of immunological methods*, 119(1), pp. 19–25.
- Rees, D. D. *et al.* (1990) 'Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.', *British journal of pharmacology*, 101(3), pp. 746–52.
- Regoli, D. and Barabé, J. (1980) 'Pharmacology of bradykinin and related kinins.', *Pharmacological reviews*, 32(1), pp. 1–46.
- Regoli, D., Barabé, J. and Park, W. K. (1977) 'Receptors for bradykinin in rabbit aortae.', *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 55(4), pp. 855–67.
- Regoli, D., Plante, G. E. and Gobeil, F. (2012) 'Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases.', *Pharmacology & therapeutics*, 135(1), pp. 94–111. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.04.002.
- Ren, G. *et al.* (2002) 'Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts.', *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 50(1), pp. 71–9.
- Renart, J., Reiser, J. and Stark, G. R. (1979) 'Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), pp. 3116–20.
- Rhaleb, N. E. *et al.* (1992) 'Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Qic⁸]bradykinin).', *European journal of pharmacology*, 210(2), pp. 115–20.
- Richards, N., Cohn, J. and McDaniels, C. (2011) 'Angiotensin converting enzyme inhibitor induced angioedema treated with ecallantide: a case report', *Ann Allergy Asthma Immunol*, 107(Suppl 1), p. A72.
- Ritter, S. L. and Hall, R. A. (2009) 'Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(12), pp. 819–30. doi: 10.1038/nrm2803.

- Rizwan Siddiqui, M. *et al.* (2011) 'Caveolin-1-eNOS signaling promotes p190RhoGAP-A nitration and endothelial permeability', *Journal of Cell Biology*, 193(5), pp. 841–850. doi: 10.1083/jcb.201012129.
- Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T. and Rosenfeld, G. (1949) 'Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin.', *The American journal of physiology*, 156(2), pp. 261–73.
- Roncador, G. *et al.* (2016) 'The European antibody network's practical guide to finding and validating suitable antibodies for research', *mAbs*, 8(1), pp. 27–36. doi: 10.1080/19420862.2015.1100787.
- Rosengren, B. ., Rippe, A. and Rippe, C. (2006) 'Transvascular protein transport in mice lacking endothelial caveolae', *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, 291, pp. 1371–1377.
- Rosenkranz, B., Brunner-Ferber, F. and Knolle, J. (2007) 'Efficacy and safety profile of the potent and selective bradykinin B2 receptor antagonist icatibant in healthy volunteers', in *26th EAACI Congress, Gothenburg, Sweden*.
- Rubanyi, G. M., Romero, J. C. and Vanhoutte, P. M. (1986) 'Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 250(6), pp. H1145-1149.
- Russell, A. and Watts, S. (2000) 'Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 294(2), pp. 598–604.
- Sakurai, Y. *et al.* (2005) 'Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), pp. 1076–81. doi: 10.1073/pnas.0404984102.
- Sargiacomo, M. *et al.* (1995) 'Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp. 9407–11.
- Savard, M. *et al.* (2008) 'Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation.', *Journal of cellular physiology*, 216(1), pp. 234–44. doi: 10.1002/jcp.21398.
- Schanstra, J. P. *et al.* (1998) 'The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts', *Journal of Clinical Investigation*, 101(10), pp. 2080–2091. doi: 10.1172/JCI1359.
- Scherrer, D. *et al.* (1999) 'Glucocorticoids increase bradykinin B2 receptor gene transcription in cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells.', *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 359(3), pp. 153–9.
- Schmidlin, F. *et al.* (1998) 'Interleukin-1 β induces bradykinin B2 receptor gene expression through a prostanoid cyclic AMP-dependent pathway in human bronchial smooth muscle cells.', *Molecular pharmacology*, 53(6), pp. 1009–15.
- Schmidt, H. H. *et al.* (1988) 'Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide.', *European journal of pharmacology*, 154(2), pp. 213–6.
- Schmidt, P. W., Hirschl, M. M. and Trautinger, F. (2010) 'Treatment of angiotensin-converting enzyme inhibitor-related angioedema with the bradykinin B2 receptor antagonist icatibant', *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(5), pp. 913–914. doi: 10.1016/j.jaad.2010.03.023.
- Schölkens, B. A. (1996) 'Kinins in the cardiovascular system.', *Immunopharmacology*, 33(1–3), pp. 209–16.
- Schubert, W. *et al.* (2002) 'Microvascular Hyperpermeability in Caveolin-1 (-/-) Knock-out Mice: TREATMENT WITH A SPECIFIC NITRIC-OXIDE SYNTHASE INHIBITOR, L-NAME,

- RESTORES NORMAL MICROVASCULAR PERMEABILITY IN Cav-1 NULL MICE', *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp. 40091–40098. doi: 10.1074/jbc.M205948200.
- Selles, J. *et al.* (2001) 'Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation.', *Life sciences*, 69(7), pp. 815–27.
- Sharma, J. (2012) 'The Role of Inflammatory Mediator Bradykinin in Cardiovascular and Renal Diseases', *Scientific Reports*, 1(142).
- Sharma, J. (2014) 'Basic and clinical aspects of Bradykinin Receptor Antagonists', in *Recent Developments in the Regulation of Kinins (Progress in Drug Research 69)*. Springer International Publishing, pp. 1–14.
- Sharma, J. N. (2009) 'An Overview on Relation between the Bradykinin System and Hypertension and Diabetes', *American Journal of Biomedical Sciences*, pp. 242–249. doi: 10.5099/aj090300242.
- Shasby, D. M. *et al.* (2002) 'Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin.', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 282(6), pp. L1330-8. doi: 10.1152/ajplung.00329.2001.
- Shaw, O. M. and Harper, J. L. (2011) 'Bradykinin receptor 2 extends inflammatory cell recruitment in a model of acute gouty arthritis.', *Biochemical and biophysical research communications*, 416(3–4), pp. 266–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.137.
- Sheikh, I. A. and Kaplan, A. P. (1989) 'Mechanism of digestion of bradykinin and lysylbradykinin (kallidin) in human serum', *Biochemical Pharmacology*, 38(6), pp. 993–1000. doi: 10.1016/0006-2952(89)90290-6.
- Shesely, E. G. *et al.* (1996) 'Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), pp. 13176–81.
- Simionescu, N., Simionescu, M. and Palade, G. E. (1978) 'Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm.', *The Journal of cell biology*, 79(1), pp. 27–44.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes.', *Nature*, 387(6633), pp. 569–72. doi: 10.1038/42408.
- Solomon, S. D. *et al.* (2005) 'Sudden death in patients with myocardial infarction and left ventricular dysfunction, heart failure, or both.', *The New England journal of medicine*, 352(25), pp. 2581–8. doi: 10.1056/NEJMoa043938.
- SoRelle, R. (1998) 'Nobel Prize Awarded to Scientists for Nitric Oxide Discoveries', *Circulation*, 98(22), pp. 2365–2366. doi: 10.1161/01.CIR.98.22.2365.
- Steinbach, O., Schweder, R. and Freitag, B. (2001) '[C1-esterase inhibitor in ACE inhibitor-induced severe angioedema of the tongue].', *Anaesthesiologie und Reanimation*, 26(5), pp. 133–7.
- Steinbicker, A. U. *et al.* (2011) 'Nitric oxide regulates pulmonary vascular smooth muscle cell expression of the inducible cAMP early repressor gene.', *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 25(3), pp. 294–302. doi: 10.1016/j.niox.2011.05.006.
- Su, J. B. *et al.* (2000) 'Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation.', *Circulation*, 101(15), pp. 1848–1853. doi: 10.1161/01.CIR.101.15.1848.
- Sun, H. *et al.* (2006) 'Rho and ROCK Signaling in VEGF-Induced Microvascular Endothelial Hyperpermeability', *Microcirculation*, 13(3), pp. 237–247. doi: 10.1080/10739680600556944.
- Sun, Z. *et al.* (2012) 'VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TAd.', *The Journal of experimental medicine*, 209(7), pp. 1363–77. doi:

10.1084/jem.20111343.

Sundberg, C. *et al.* (2001) 'Glomeruloid Microvascular Proliferation Follows Adenoviral Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor-164 Gene Delivery', *The American Journal of Pathology*, 158(3), pp. 1145–1160. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64062-X.

Suvorava, T. *et al.* (2005) 'Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo.', *Circulation*, 112(16), pp. 2487–95. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.543157.

Suvorava, T. *et al.* (2015) 'Impact of eNOS-Dependent Oxidative Stress on Endothelial Function and Neointima Formation.', *Antioxidants & redox signaling*, 23(9), pp. 711–23. doi: 10.1089/ars.2014.6059.

Takano, M. *et al.* (2014) 'Nuclear localization of bradykinin B(2) receptors reflects binding to the nuclear envelope protein lamin C.', *European journal of pharmacology*, 723, pp. 507–14. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.09.054.

Takano, M. and Matsuyama, S. (2014) 'Intracellular and nuclear bradykinin B2 receptors', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 732(1), pp. 169–172. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.03.011.

Theer, P., Hasan, M. T. and Denk, W. (2003) 'Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier.', *Optics letters*, 28(12), pp. 1022–4.

Thibeault, S. *et al.* (2010) 'S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability.', *Molecular cell*, 39(3), pp. 468–76. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.013.

Toda, N., Ayajiki, K. and Okamura, T. (2012) 'Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 60(1), pp. 100–8. doi: 10.1097/FJC.0b013e318252452a.

Toda, N. and Nakanishi-Toda, M. (2011) 'How mental stress affects endothelial function.', *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 462(6), pp. 779–94. doi: 10.1007/s00424-011-1022-6.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), pp. 4350–4.

Tschöpe, C., Schultheiss, H.-P. and Walther, T. (2002) 'Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade.', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 39(4), pp. 478–87.

Vallance, P. *et al.* (1995) 'Direct measurement of nitric oxide in human beings.', *Lancet (London, England)*, 346(8968), pp. 153–4.

VanDeWater, L. *et al.* (1985) 'Tumor cell generation of thrombin via functional prothrombinase assembly.', *Cancer research*, 45(11 Pt 1), pp. 5521–5.

Vanhoutte, P. M. *et al.* (2009) 'Endothelial dysfunction and vascular disease.', *Acta physiologica (Oxford, England)*, 196(2), pp. 193–222. doi: 10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x.

Vanhoutte, P. M. (2009) 'How We Learned to Say NO.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(8), pp. 1156–60. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190215.

Vegh, A., Papp, J. G. and Parratt, J. (1994) 'Attenuation of the antiarrhythmic effects of ischaemic preconditioning by blockade of bradykinin B2 receptors.', *British journal of pharmacology*, 113(4), pp. 1167–72.

Velarde, V. *et al.* (1999) 'Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth

- muscle cells.', *The American journal of physiology*, 277(2 Pt 1), pp. C253-61.
- Venema, R. C. (2002) 'Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin.', *International immunopharmacology*, 2(13-14), pp. 1755-62.
- Venema, V. J. *et al.* (1998) 'Bradykinin stimulates the tyrosine phosphorylation and bradykinin B2 receptor association of phospholipase C gamma 1 in vascular endothelial cells.', *Biochemical and biophysical research communications*, 246(1), pp. 70-5. doi: 10.1006/bbrc.1998.8574.
- Víteček, J. *et al.* (2012) 'Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges', *Mediators of Inflammation*, 2012. doi: 10.1155/2012/318087.
- Vogel, S. M. *et al.* (2001) 'Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein.', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 281(6), pp. L1512-22.
- Wall, T. M., Sheehy, R. and Hartman, J. C. (1994) 'Role of bradykinin in myocardial preconditioning.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 270(2), pp. 681-9.
- Warren, K. *et al.* (2006) 'Phase II trial of intravenous lobaradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group.', *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 58(3), pp. 343-7. doi: 10.1007/s00280-005-0172-7.
- Weis, S. *et al.* (2004) 'Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis.', *The Journal of cell biology*, 167(2), pp. 223-9. doi: 10.1083/jcb.200408130.
- Weis, S. M. (2008) 'Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer', *Current Opinion in Hematology*, 15(3), pp. 243-249. doi: 10.1097/MOH.0b013e3282f97d86.
- Whalen, E. J. *et al.* (2007) 'Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2.', *Cell*, 129(3), pp. 511-22. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.046.
- Whalen, E. J., Johnson, A. K. and Lewis, S. J. (2000) 'Beta-adrenoceptor dysfunction after inhibition of NO synthesis.', *Hypertension*, 36(3), pp. 376-82.
- Wink, D. A. and Mitchell, J. B. (1998) 'Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide.', *Free radical biology & medicine*, 25(4-5), pp. 434-56.
- Wirth, K. J., Heitsch, H. and Schölkens, B. A. (1995) 'Kinin receptor antagonists: unique probes in basic and clinical research.', *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 73(7), pp. 797-804.
- Wolf, W. C. *et al.* (2000) 'Human tissue kallikrein gene delivery attenuates hypertension, renal injury, and cardiac remodeling in chronic renal failure.', *Kidney international*, 58(2), pp. 730-9. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00219.x.
- Wong, D., Dorovini-Zis, K. and Vincent, S. R. (2004) 'Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier', *Experimental Neurology*, 190(2), pp. 446-455. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.08.008.
- Wong, S. L. *et al.* (2009) 'Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging.', *Circulation research*, 104(2), pp. 228-35. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.179770.
- Workman, P. (2004) 'Inhibiting the phosphoinositide 3-kinase pathway for cancer treatment.', *Biochemical Society transactions*, 32(Pt 2), pp. 393-6. doi: 10.1042/.
- Wu, F., Tyml, K. and Wilson, J. X. (2008) 'iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells.', *Journal of cellular physiology*,

217(1), pp. 207–14. doi: 10.1002/jcp.21495.

Wu, H. M. *et al.* (1999) 'Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability.', *The American journal of physiology*, 276(2 Pt 2), pp. H535-42.

Xiao, Z. *et al.* (1997) 'Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated.', *Journal of cellular physiology*, 171(2), pp. 205–11. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199705)171:2<205::AID-JCP11>3.0.CO;2-C.

Xu, Z., Tong, C. and Eisenach, J. C. (1996) 'Acetylcholine stimulates the release of nitric oxide from rat spinal cord.', *Anesthesiology*, 85(1), pp. 107–11.

Yang, C.-M. *et al.* (2005) 'Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells.', *Journal of cellular physiology*, 203(3), pp. 538–46. doi: 10.1002/jcp.20250.

Yang, X. and Polgar, P. (1996) 'Genomic structure of the human bradykinin B1 receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions.', *Biochemical and biophysical research communications*, 222(3), pp. 718–25. doi: 10.1006/bbrc.1996.0810.

Yao, Y.-Y. *et al.* (2007) 'Tissue kallikrein infusion prevents cardiomyocyte apoptosis, inflammation and ventricular remodeling after myocardial infarction.', *Regulatory peptides*, 140(1–2), pp. 12–20. doi: 10.1016/j.regpep.2006.11.020.

Yayama, K. *et al.* (1998) 'Kallikrein gene delivery attenuates hypertension and cardiac hypertrophy and enhances renal function in Goldblatt hypertensive rats.', *Hypertension*, 31(5), pp. 1104–10.

Yeh, C.-H. *et al.* (2010) 'Cardiomyocytic Apoptosis Limited by Bradykinin via Restoration of Nitric Oxide after Cardioplegic Arrest', *Journal of Surgical Research*, 163(1), pp. e1–e9. doi: 10.1016/j.jss.2010.04.005.

Ylä-Herttuala, S. *et al.* (2007) 'Vascular Endothelial Growth Factors', *Journal of the American College of Cardiology*, 49(10), pp. 1015–1026. doi: 10.1016/j.jacc.2006.09.053.

Yousef, G. M. and Diamandis, E. P. (2001) 'The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease.', *Endocrine reviews*, 22(2), pp. 184–204. doi: 10.1210/edrv.22.2.0424.

Yuan, S. Y. (2000) 'Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability.', *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 7(6 Pt 1), pp. 395–403.

Yuan, S. Y. *et al.* (2007) 'Microvascular Permeability in Diabetes and Insulin Resistance', *Microcirculation*, 14(4–5), pp. 363–373. doi: 10.1080/10739680701283091.

Yuan, Y. *et al.* (1992) 'Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism.', *The American journal of physiology*, 263(2 Pt 2), pp. H641-6.

Yuan, Y. *et al.* (1993) 'Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade.', *The American journal of physiology*, 264(5 Pt 2), pp. H1734-9.

Yusuf, S. *et al.* (2000) 'Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.', *The New England journal of medicine*, 342(3), pp. 145–53. doi: 10.1056/NEJM200001203420301.

Zhang, J. J., Chao, L. and Chao, J. (1999) 'Adenovirus-mediated kallikrein gene delivery reduces aortic thickening and stroke-induced death rate in Dahl salt-sensitive rats.', *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 30(9), pp. 1925-31–2.

Zhao, Y. *et al.* (1999) 'A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), pp.

14753–8.

Zhao, Y., Vanhoutte, P. M. and Leung, S. W. S. (2013) 'Endothelial nitric oxide synthase-independent release of nitric oxide in the aorta of the spontaneously hypertensive rat.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 344(1), pp. 15–22. doi: 10.1124/jpet.112.198721.

Zhao, Y., Vanhoutte, P. M. and Leung, S. W. S. (2015) 'Vascular nitric oxide: Beyond eNOS', *Journal of Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 129(2), pp. 83–94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002.

Zhou, L. *et al.* (2014) 'Bradykinin regulates the expression of claudin-5 in brain microvascular endothelial cells via calcium-induced calcium release', *Journal of Neuroscience Research*, 92(5), pp. 597–606. doi: 10.1002/jnr.23350.

Zweier, J. L., Samouilov, A. and Kuppusamy, P. (1999) 'Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2–3), pp. 250–262. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00018-3.

Zychma, M. J. *et al.* (1999) 'Polymorphisms in the genes encoding for human kinin receptors and the risk of end-stage renal failure: results of transmission/disequilibrium test. The End-Stage Renal Disease Study Group.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10(10), pp. 2120–4.

PUBLIKATIONEN

ORIGINALARBEITEN

Bisha M, Dao VT, Gholamreza-Fahimi E, Vogt M, van Zandvoort M, Weber S, Bas M, **Khosravani F**, Kojda G, Suvorava T. *The role of bradykinin receptor type 2 for spontaneous extravasation in mice skin: Implications for non-allergic angio-oedema.* **Br J Pharmacol.** 2018 Feb 21. doi: 10.1111/bph.14166. [Epub ahead of print]

Bas M, Greve J, Strassen U, **Khosravani F**, Hoffmann TK, Kojda G *Angioedema induced by cardiovascular drugs: new players join old friends.* **Allergy.** 2015 Oct;70(10):1196-200. doi: 10.1111/all.12680. Epub 2015 Jul 15. Review.

Khosravani F, Suvorava T, Dao VT, Brockmann N, Kocgirli O, Herbst FF, Valcaccia S, Kassack MU, Bas M, Kojda G. *Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH.* **Allergy.** 2015 Mar;70(3):285-94. doi: 10.1111/all.12556. Epub 2014 Dec 24.

Beitrag Khosravani F. am Manuskript:

Methoden: Western Blot Analysen, Real Time PCR, Calcium-Messungen, Antikörper-Validierungen, Zellkulturen und Inkubationsexperimente

Ergebnisse: Effekt von NO auf die endotheliale B2 protein Expression in Zellkulturen; Effekt von NO auf die B2 induzierte Calcium Signalisierung; Effekt von NO auf die Proteinexpression in vivo; Effekt vom endogenen vaskulären Bradykinin auf die B2 Expression in vivo

ABSTRACTS

Kocgirli O, Suvorova T, Valcaccia S, **Khosravani F**, Dao VT, Balz V, Gödecke A, Bas M, Kojda G. Upregulation of Bradykinin Type-2-Receptor Expression in eNOS-Deficient Mice. A role of the lack of eNOS? **Naunyn Schmiedeberg** März 2011 P285; Vol. 282 Supplement S.68

F. Khosravani, T. Suvorava, N. Brockmann, V.T. Dao, M. Bisha, M. Kassack, M. Bas, G. Kojda Effects of NO on the expression and function of bradykinin type 2 receptors. Role for angioedema? *European Heart Journal*, Volume 34, Issue suppl_1, 1 August 2013, P4173, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh309.P4173>

Dao Vt, Suvorova T, **Khosravani F**, Balz V, Lieven O, Rütger U, Bas M, Kojda G Endothelial-specific overexpression of bradykinin receptor type 2- a new animal model in cardiovascular research

E. Gholamreza-Fahimi, **F. Khosravani**, M. Bisha, V. T. Dao, T. Suvorava, M. van Zandvoort, G. Kojda Evaluation of non-invasive Two-photon laser microscopy to study endothelial permeability in-vivo **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** (2016) P321 (Suppl 1): S75 DOI 10.1007/s00210-01 - - 6 1213 y

M. Bisha, **F. Khosravani**, V. T. Dao, T. Suvorava, G. Kojda Endothelial-specific overexpression of bradykinin receptor type two in angioedema research **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** (2016) P322 (Suppl 1): S75 DOI 10.1007/s00210-01 - - 6 1213 y

LEBENS LAUF

Name	Farbod Khosravani
Geburtsdatum	29. März 1983
Geburtsort	Teheran /Iran
2002	Abitur Rhein-Sieg-Gymnasium Sankt Augustin
2004 - 2008	Studium der Pharmazie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
06 2008 - 12 2008	Pharmazeut im Praktikum, Institut für Technologie und Biopharmazie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01 2009 - 07 2009	Pharmazeut im Praktikum, Veedels Apotheke Bonn
11 2009	Approbation als Apotheker
01 2010 - 05 2011	Angestellt als Apotheker
01 2011 - 01 2016	Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Kojda Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herr Prof. Kojda, der meine Doktorarbeit betreut und begutachtet hat. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik während meiner Promotionzeit und bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Kollegen (Oktay, Marion, Steffi, Ehsan, Tanya, Thao-Vi und Ilse) bedanken, die mir mit viel Geduld, Interesse und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Bedanken möchte ich mich für die zahlreichen interessanten Debatten und Ideen, die maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in dieser Form vorliegt.

Meiner Frau und meinen Kindern danke ich besonders für den starken emotionalen Rückhalt über die Dauer meiner gesamten Promotion.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir meine Promotion durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.

VERSICHERUNG AN EIDES STATT

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, 12.04.2018

Farbod Khosravani