

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. Jens W. Fischer

**Effekte von NO auf die Expression des
Bradykinin-Rezeptors Typ II in Mäusen und Zellen
- eine experimentelle Studie -**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Sandra Maria Valcaccia

Düsseldorf 2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Universitätsprofessor Dr. med. Nikolaj Klöcker
Dekan

Gutachter :

1. Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda
2. PD Dr. med. Johannes Stegbauer

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2019

Für meinen Vater Michele Valcaccia
18.04.1944 - 10.01.2017

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Khosravani M, 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. 2014 Dec 24.

Suvorava T, Weber M, Valcaccia S, Dao V T, Kojda G . Effects of Vascular Oxidative Stress Induced by Endothelium-Specific Overexpression of Uncoupled eNOS in Mice. 2009. *Clin Res Cardiol* 98, Suppl 1

Valcaccia S, Dao V T, Kocgirli O, Suvorava T, Kumpf S, Floeren M, Oppermann M, Kojda G.

NO-Synthase knockout effects on protein expression of bradykinin receptor type-2 in mice in-vivo. Präsentiert auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Bonn vom 08.10.2008-11.10.2008

Suvorava T, Weber M, Valcaccia S, Dao V T, Kojda G. Generation of Animal Model for Increased Vascular Oxidative Stress. Präsentiert auf der 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vom 16.04.2009-18.04.2009 in Mannheim.

I. Zusammenfassung :

Die Aktivierung des Bradykininrezeptors Typ II (B2) führt zur Bildung von NO, Prostacyclin (PGI₂) und des Endothel-derived hyperpolarizing factors (EDHF). Es ist noch nicht bekannt, ob diese Mediatoren umgekehrt auch die Expression von B2 beeinflussen, weshalb die Wirkung von NO auf die B2-Expression im Rahmen dieser Promotion untersucht werden sollte. Diese Frage hat eine besondere klinische Relevanz, denn wenn NO die B2-Expression beeinflusst, müsste die Verwendung der häufig eingesetzten Antihypertensiva aus der Gruppe der ACE-Hemmer und AT1-Blocker kritischer überdacht werden. Die Verwendung von ACE-Hemmern und AT1-Blockern verursacht durch die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) regelmäßig einen erhöhten Bradykinin-Spiegel. Folglich steigt das Risiko, ein nicht allergisches Angioödem mit allen klinischen Komplikationen zu entwickeln, um ein Vielfaches. Es ist jedoch auch bekannt, dass die Verwendung von ACE-Inhibitoren und AT1-Blockern zu einer verbesserten Endothelfunktion führt, indem vermehrt NO zur Verfügung gestellt wird. Dies hat u.a. eine vasoprotektive Funktion und senkt den Blutdruck. Um eine mögliche Wechselwirkung zwischen Bradykinin und NO nachzuweisen, bestand der erste Schritt darin, den nativen B2-Proteingehalt in den Organen Herz und Lunge von eNOS-Knockout-Mäusen, eNOS⁺⁺, eNOSⁿ und C57BL/6 zu bestimmen. In weiteren Versuchen wurden die Mäuse dann entweder mit dem NO-Donor PETN oder mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt, um mögliche Auswirkungen von erhöhten NO Spiegeln bzw. fehlendem NO auf den B2 aufzeigen zu können. Unbehandelte transgen-negative eNOSⁿ Mäuse und C57BL/6 Mäuse dienten in allen Versuchen als Negativkontrollen. In den an PAEC durchgeführten in-vivo-Experimenten wurde ebenfalls der B2-Proteingehalt nativ und nach Behandlung mit den NO-Donatoren (SNAP oder DETA/NO) bestimmt.

Auch der B2 Proteingehalt nach Behandlung mit dem NOS-Inhibitor (L-NA) wurde in den PAEC bestimmt. Die Behandlung der Zellen mit L-NA entsprach dabei dem akuten pharmakologischen Knockout, da alle NO-Isoformen durch die L-NA inhibiert werden und somit ein direkter Vergleich mit dem genetischen eNOS-Knockout möglich ist. Uns hat besonders interessiert, ob es Kompensationsmechanismen zwischen der eNOS und der B2 gibt und ob diese sich voneinander unterscheiden.

In allen Experimenten konnte aber kein Einfluss von NO auf die B2-Expression nachgewiesen werden. Die B2-Expression blieb immer konstant. Es spielte keine Rolle, ob die Mäuse eNOS überexprimieren, die Expression normal ist oder, wie bei den eNOS-Knockout-Mäusen, komplett fehlt. Auch die Menge an verfügbarem NO spielte für die B2-Expression keine Rolle. Es machte keinen Unterschied, ob NO-Donatoren oder NOS-Inhibitoren eingesetzt wurden. Auch die genetisch bedingte 3,3-fach höhere eNOS Expression in eNOS⁺⁺ Mäusen zeigte keinen Einfluss. In allen Fällen konnte kein Einfluss von NO auf die B2-Expression detektiert werden, so dass eine Interaktion sicher ausgeschlossen ist.

II. Question and Summary of the Dissertation

Activation of the vascular bradykinin receptor type II (B2) leads to the formation of NO, prostacyclin (PGI₂) and the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). It is not yet known whether these mediators, conversely, also influence the expression of the B2, which is why the effect of NO on the B2 expression should be investigated within the framework of this doctoral thesis. This question also has special clinical relevance, because if NO influences B2 expression, the use of the frequently used antihypertensives ACE inhibitors and AT1 blockers would have to be reconsidered more critically. Because of the use of ACE inhibitors and AT1 blockers, the inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE) also regularly causes an increased bradykinin level. Consequently, the risk of developing non-allergic angioedema with all clinical complications increases many times over. It would then be necessary to reconsider more often whether alternative antihypertensives should be used more frequently to avoid the complications of acute life-threatening angioedema. However, it is also known that the use of ACE inhibitors and AT1 blockers leads to an improved endothelial function and as a result more NO is available, which brings about vasoprotective function and blood pressure reduction. In order to detect a possible interaction between bradykinin and NO, the first step was to determine the B2 protein content in the organs heart and lung of eNOS knockout mice, eNOS^{+/+}, eNOS^{-/-} and C57BL/6. In further experiments, the different animal lines were then treated either with the NO donor PETN or with the NO inhibitor L-NA, in order to be able to show possible effects of the missing NO on the B2. Untreated transgene-negative eNOS mice and C57BL/6 mice always served as negative controls. In addition to the in vivo experiments, B2 protein content was determined natively, after treatment with NO donors (SNAP or DETA/NO) or after treatment with a NO inhibitor (L-NA) in in vitro experiments with porcine aortic endothelial cells (PAEC). The treatment of cells with L-NA corresponded to an acute pharmacological knockout, since all isoforms of NO are inhibited by the L-NA and thus allowed a direct comparison with the genetic eNOS knockout. We were particularly interested in whether there are compensation mechanisms between the eNOS and the B2 and whether they differ from each other in a pharmacological and a genetic knockout.

In all experiments, no influence of NO on B2 expression could be demonstrated. The B2 expression always remained constant. It does not matter if the animals overexpress eNOS, the eNOS expression is normally high, or, as with the eNOS knockout animals, none at all. The amount of available NO played no role for B2 expression. It also does not matter if additional NO donors or NO inhibitors are used.

III Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyklase
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
B1	Bradykininrezeptor Typ I
B2	Bradykininrezeptor Typ II
BH-4	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
Coomassie	Triphenylmethanfarbstoff
DAG	Diacylglycerol
DETA/NO	Diethylenetriamine/nitric oxide adduct
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DDT	DL-Dithiothreitol
EDHF	endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS ⁺⁺	eNOS-überexprimierende Mäuse
eNOS ⁿ	transgen negative Wurfgeschwister der eNOS ⁺⁺ Mäuse
eNOS -/-	eNOS-Knockout Mäuse
FCS	fetales Kälberserum
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GTN	Glycerol Trinitrat
GDN	Glycerol Dinitrat
GTP	Guanosintriphosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP3	Inositoltriphosphat
kB	Kilobase
kD	Kilodalton
L-NA	L-Nitroarginin

MAP	mittlerer arterieller Druck
nNOS	neuronal NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PETN	Pentaerythritol-Tetranitrat
PEDN	Pentaerythritol-Dinitrat
PEMN	Pentaerythritol-Mononitrat
PKC	Proteinkinase C
PLA 2	Phospholipase A2
Ponceau- S	3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfo-phenyl)azo)phenyl)azo)- 2,7-naphthalindisulfonsäure Tetranatriumsalz
PVDF	Polyvinylidenfluorid
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-Natriumchlorid-Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TgN(Tie2eNOS)GK	Transgener Tierstamm mit dem Tie-2-eNOS-Plasmid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur

IV Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Bedeutung des NO im kardiovaskulären System	1-2
1.2	Das Kallikrein-Kinin-Sytem	2-3
1.3	Die Rolle des Bradykinins bei der Entwicklung nicht-allergischer Angioödeme	2-6
1.4	Regulation der eNOS Aktivität	6-9
1.5	eNOS Knockout Mäuse	9-10
1.6	Fragestellung	10-11

2 Material und Methoden

2.1	Substanzen und Puffer	11-15
2.2	Versuchstiere	15
2.2.1	eNOS ⁿ / eNOS ⁺⁺	15-16
2.2.2	eNOS-Knockout	16
2.2.3	L-NA Behandlung	16
2.2.4	PETN Behandlung	16-17
2.3	Zellkulturexperimente	17-19
2.3.1	PAEC	17
2.3.2	Präparation der PAEC	17
2.3.3	Passagieren der PAEC	17-18
2.4	Zellinkubationen	18
2.4.1	L-NA –Inkubation	18-19
2.4.2	SNAP –Inkubation	19
2.4.3	DETA/NO Inkubation	19

2.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.5.1	Proteinpräparation aus Zellen	19-20
2.5.2	Proteinpräparation aus Organen	20
2.5.3	Proteinbestimmung aus Organ- und Zellysaten	20-23
2.5.4	Proteinauftrennung	23
2.5.5	Protein-Transfer	23
2.5.6	Blotting Prozedur	23-24
2.5.7	B2 Westen Blot (monoklonaler AK)	24-25
2.5.8	eNOS Western-Blot	26

2.5.9	Detektion der Proteine	26-27
2.5.10	Coomassie Färbung	27-28
2.5.11	Ponceau Färbung	28
2.5.12	Quantitative Auswertung der Western-Blots	28-29
2.5.13	Westernblots der Zellversuche	29
2.5.14	DNA-Isolierung aus PAEC	29
2.5.15	DNA-Isolierung aus Mäusen	29-30
2.5.16	DNA-Konzentrationsbestimmung	30
2.5.17	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30-32
2.5.18	Genotypisierungs-PCR eNOS ⁿ / eNOS ⁺⁺ Mäuse	32-34
2.5.19	Genotypisierungs-PCR eNOS Knockout Mäuse	34-35
2.5.20	PCR zur Geschlechtsbestimmung PAEC	35-38
2.5.21	Auftrennung der DNA-Fragmente	38
2.6	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	
3.1	B2 Expression in eNOS ⁿ / eNOS ⁺⁺ Mäusen	39-40
3.2	B2 Expression in eNOS-Knockout Mäusen	41
3.3	B2 Expression in PETN behandelten C57/B6 Mäusen	41-43
3.4	eNOS-Expression in PETN behandelten C57/B6 Mäusen	44-45
3.5	B2 Expression in L-NA behandelten eNOS ⁿ / eNOS ⁺⁺ Mäusen	46-48
3.6	B2 Expression in L-NA behandelten PAEC	48-49
3.7	eNOS-Expression in L-NA behandelten PAEC	50-51
3.8	B2 Expression in SNAP inkubierten PAEC-Zellen	51-52
3.9	eNOS-Expression in SNAP behandelten PAEC-Zellen	52-54
3.10	Effekte der DETA/NO Inkubation auf die B2 Expression in PAEC	55-56
4	Diskussion	
4.1	Effekt von NO auf die B2 Expression in PAEC	57-58
4.2	Ergebnisse der Mäuseexperimente	58
4.2.1	eNOS ⁿ / eNOS ⁺⁺ Mäuse	58
4.2.2	L-NA Behandlung	59
4.2.3	PETN Behandlung/ NO Donor Behandlung	59-60
4.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse	60-66

5	Anhang	
5.1	Abbildungsverzeichnis	67-68
5.2	Literaturverzeichnis	69-74
5.3	Poster	75
5.4	Abstracts	76-78
5.5	Danksagung	79

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des NO im kardiovaskulären System

Menschen und SäugeMäuse verfügen über ein kardiovaskuläres System bestehend aus dem Herzen, Aorta, Arterien und Venen. Die Aufgabe des kardiovaskulären Systems ist unter anderem die Sicherstellung der Organ- und Gewebeperfusion, der Gastransport und der Transport diverser Mediatoren und Hormone. Das kardiovaskuläre System unterteilt sich dabei in das Hoch- und Niederdrucksystem, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen. Beide Systeme sind in ihrer Funktion abhängig vom Vorhandensein eines intakten Endothels, da dieses das Stickstoffmonoxid (NO) generiert, welches eine entscheidende Bedeutung für die Blutdruckregulation hat. Das NO wird dabei im Endothel durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet.

Nach heutigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Dysfunktion des vaskulären Endothels assoziiert sind. So kommt es z.B. bei Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion u.a. zu einer gestörten Relaxation der Gefäße und einer eingeschränkten Vasodilatation. Dieser Umstand begünstigt die Entwicklung der arteriellen Hypertonie und ihrer konsekutiven Spätfolgen. Diese wären beispielsweise die Entwicklung der Linksherzhypertrophie, die im weiteren Verlauf zur chronischen Linksherzinsuffizienz führen kann (Moncada S and Higgs A, 1993).

Zu den anerkannten Risikofaktoren für die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion zählen die Hyperlipidämie, der Diabetes mellitus, die Hyperhomocysteinämie, das Rauchen und das fortgeschrittene Lebensalter (De Vries A S et al., 2000; Sydow K and Boger R H, 2001).

NO ist mittlerweile ein anerkannter wichtiger protektiver Mediator von Gefäßwänden, da es zur endothelabhängigen Vasodilatation führt und somit den Blutdruck aktiv beeinflussen und senken kann. Es kann unabhängig vom sGC/cGMP/cGKI-Signalweg auch eine direkte Hyperpolarisation der glatten Gefäßwandmuskulatur induzieren, indem es Kaliumkanäle der glatten Muskelzelle öffnet und so eine Vasodilatation und Blutdrucksenkung bewirkt (Faraci and Heistad, 1998; Nelson and Quayle, 1995). NO agiert dabei auch als antiatherogener Faktor, indem es die Thrombozytenaggregation und die Thrombozytenadhäsion in den Gefäßen hemmt. Durch die NO-induzierte Inhibition der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen wird auch die Adhäsion von Leukozyten an den Gefäßwänden gehemmt und so die Progression der Arteriosklerose deutlich verzögert. Eine weitere wichtige Funktion von NO ist die Inhibition der Proliferation der glatten Gefäßwandmuskulatur (Förstermann et al., 1994; Li & Förstermann, 2000), so dass die Ausbildung der vaskulären Hypertrophie mit verengtem Gefäßlumen verhindert werden kann. Dies ist deshalb wichtig, da auf diese Weise

Ischämien, Myocardinfarkte oder Apoplexe verhindert werden können. Die NO Generation im vaskulären System ist aber wie bereits erwähnt auf das Vorhandensein eines intakten Endothels angewiesen, da dort das NO gebildet und freigesetzt wird. So bilden z.B. Endothelzellen nach einer akuten Schädigung weniger NO, so dass es zu einem Blutdruckanstieg kommt und zusätzlich Adhäsivmoleküle freigesetzt werden. Diese fördern die Migration und Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten in die Gefäße, wodurch die Progression der Arteriosklerose begünstigt wird (Gewaltig M T, Kojda G, 2002). Erschwerend kommt hinzu, dass in bereits arteriosklerotisch veränderten Gefäßen das vorhandene NO vermehrt durch Sauerstoffradikale inaktiviert wird und dies die Progression der Arteriosklerose weiter akzeleriert (Förstermann et al., 1994; Li & Förstermann, 2000).

In der Summe seiner Wirkungen erfüllt NO also wichtige vasoprotektive Aufgaben. Es reguliert aktiv den Blutdruck, wirkt antiatherogen und anti-inflammatorisch, verhindert die Ausbildung der vaskuläre Hypertrophie und dadurch letztlich die Entwicklung von Ischämien und Infarkten. Durch diese Eigenschaften hemmt und verzögert es die Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen

1.2 Das Kallikrein-Kinin-System

Kinine sind Oligopeptide und gehören zu den Gewebshormonen. Sie werden durch Kallikrein aus Kininogenen freigesetzt. Das Kinin-Kallikrein-System stellt dabei ein schwer abgrenzbares System aus verschiedenen Blut-Proteinen dar, welches eine Rolle bei Inflammationen, Blutdruckregulation, Koagulation und der Algesie spielt. Die wichtigsten Mediatoren dabei sind das Bradykinin und Kallidin, beide können auf viele Zell- und Gewebetypen einwirken. Bradykinin ist dabei einer der potentesten bekannten Vasodilatoren und führt wie in Abb. 1 dargestellt unter anderem zur Freisetzung von NO, Prostacyclin (PGI₂) und dem endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Abu-Soud H M, et al., 1995). Alle bekannten Kininrezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren der sieben-transmembran-Familie und sind membranständig. Bis dato sind zwei Subtypen des Bradykininrezeptors bekannt, der Bradykininrezeptor Typ I (B1) und der Bradykininrezeptor Typ II (B2).

Der B1-Rezeptor zählt zu den induzierbaren Rezeptoren und wird in einer Vielzahl von Geweben und Organen nach akuter Gewebeschädigung de novo synthetisiert. Neben einer erhöhten Gefäßpermeabilität und der Induktion der Vasodilatation kommt ihm eine Rolle in der Algesie-Entwicklung zu. Der B2-Rezeptor dagegen wird in vielen Geweben konstitutiv gebildet, nach seiner Aktivierung kommt es entsprechend wie in Abb. 1 dargestellt zur Signaltransduktion, welche unter anderem die Vasodilatation und Hyperpermeabilität der

Endothelzellmembran für Calcium-Ionen bewirkt. So kommt es zu einem Calcium-Einstrom, der weitere Mechanismen in Gang setzt. Letztlich wird dabei NO, PGI₂ und EDHF gebildet.

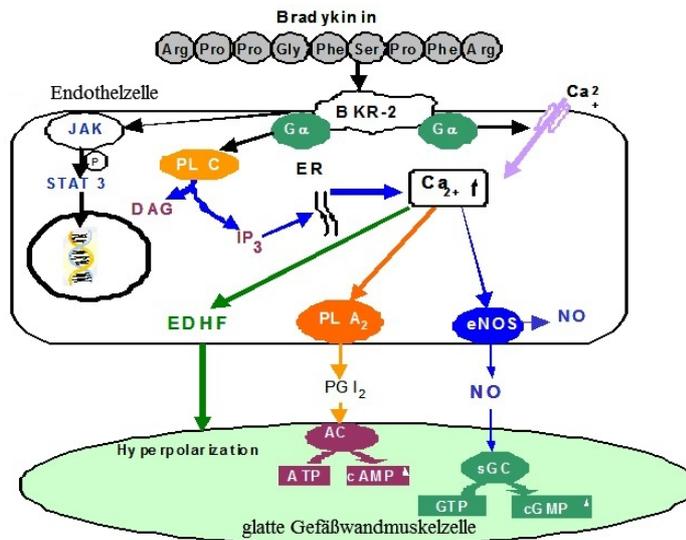


Abb. 1: Schematische Übersicht über die Mechanismen der Bradykinin-induzierten Vasodilatation am Beispiel einer vaskulären Endothelzelle und glatten Muskelzelle.

(Bas M, et al., Non-Allergic Angioedema. Rolle of bradykinin. 2015. Allergy, 62:842-853)

Es konnte bereits dokumentiert werden, dass Bradykinin über die Aktivierung des B₂, sowohl in peripheren Gefäßen, als auch in den Koronararterien zur Vasodilatation führt (Cohen R A, et al., 1995). Weitere bekannte Eigenschaften und Funktionen des Bradykinins sind die Beteiligung an der Algesie-Entwicklung (vgl. der Wirkung des Histamins), die chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, die Beteiligung an allergischen und anaphylaktischen Reaktionen, die Beteiligung an Inflammationsprozessen, sowie die Beteiligung bei der Kontraktion der glatten Bronchial-, Darm- und Uterusmuskulatur, sowie als Mediator beim nicht-allergischen Angioödem (Dendorfer A, et al., 2001).

1.3 Die Rolle von Bradykinin bei der Entwicklung nicht-allergischer Angioödeme

Unter einem Angioödem versteht man im Allgemeinen das klinische Bild einer ödematösen Schwellung von Geweben, insbesondere Schwellungen der Haut und Schleimhäute. Betroffen sein können auch die Schleimhäute des gastrointestinalen Traktes, der Atemwege und der Genitalien. Man unterscheidet dabei das allergische Angioödem, welches histaminerg vermittelt wird und das nicht-allergische Angioödem, welches zumeist bradykininvermittelt ist (Bas M, et al., 2007).

Das nicht-allergische Angioödem wird in fünf weitere Subtypen unterteilt (siehe Tabelle 1).

Man differenziert zwischen dem RAAS-induzierten Angioödem (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), dem hereditären Angioödem (HAE), dem erworbenen Angioödem (Acquired Angioedema, AAE), dem idiopathischen Angioödem (IAE) sowie dem pseudoallergische Angioödem (PAE). Das RAAS-induzierte Angioödem tritt dabei am häufigsten in Erscheinung. Ausgelöst wird es durch eine antihypertensive Therapie mit ACE-Hemmern oder AT1-Blockern. Es kann dabei zu jedem Zeitpunkt auftreten und muss nicht zwingend zu Beginn der antihypertensiven Therapie in Erscheinung treten. Selbst nach Jahren der guten Medikamentenverträglichkeit ist die Entwicklung eines RAAS-induzierten Angioödems noch möglich und sollte als Auslöser für ein auftretendes Angioödems stets bedacht werden. Aktuell werden in Deutschland schätzungsweise circa 7 Millionen Menschen mit einem ACE-Hemmer behandelt. Rein rechnerisch wäre daher mit 20.000-35.000 Fällen/Jahr eines RAAS-induzierten Angioödems zu rechnen, da es mit einer Inzidenz von 0,4-0,7% in Erscheinung tritt (Bas M, et al., 2007). Und genau diese hohen Fallzahlen verdeutlichen, welche große klinische Bedeutung das RAAS-induzierte-Angioödem hat und wie wichtig daher die Verfügbarkeit von geeigneten medikamentösen und klinischen Maßnahmen sind (Bas M, et al., 2007).

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 1 die unterschiedliche Angioödemformen tabellarisch zusammengefasst und ihre bekannten Auslöser sowie die bekannten Mediatoren dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Formen der bekannten Angioödeme. ACE= Angiotensin Converting Enzyme, AT1 = Angiotensin-1, C1-INH= C1-Esterase-Inhibitor, RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Angioödem Typ	RAAS-induziertes Angioödem (RAE)	Hereditäres Angioödem (HAE)	Erworbenes Angioödem (AAE)	Idiopathisches Angioödem (IAE)	Pseudoallergisches Angioödem (PAE)
Auslöser	ACE-Hemmer AT-1-Blocker Sacubitril	Typ I und II: C1-INH-Defekt Typ III: Faktor-12-Defekt	Lymphom Bradykinin	?	Aspirin Leukotrien
Mediator	Bradykinin	Bradykinin	Bradykinin	?	Leukotrien

Beim hereditärem Angioödem unterscheidet man den Typ I-III. Typ I und Typ II können dabei auf einen Defekt der C1-Esterase zurückgeführt werden. Typ III kommt nur selten vor und wird auf Punktmutationen innerhalb des Faktor 12 zurückgeführt, welche zu einer defekten Funktion von Faktor 12 führt. Durch eine fehlerhafte Glykosylierung kommt es zu einer gesteigerten kontaktinduzierten Autoaktivierung des Faktor 12. Diese führt zu einer exzessiv gesteigerten Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Weges und in dessen Folge wird vermehrt Bradykinin gebildet. Die Faktor 12 vermittelte Fähigkeit zur Koagulation, sowie die Fähigkeit durch Bindung des C1-Esterase Inhibitors inaktiviert zu werden, bleiben bei dieser Mutation aber erhalten (Björkqvist et al., 2015). Therapeutisch konnten daher beim hereditärem Angioödem bereits sehr gute Ergebnisse mit der Applikation von C1-Esterase-Hemmern erzielt werden.

Eine weitere und noch wenig untersuchte Form des Angioödems ist das sogenannte erworbene Angioödem. Aktuell geht man davon aus, dass bestimmte Erkrankungen wie z.B. das B-Zell-Lymphom durch die Bildung von Auto-Antikörpern einen gesteigerten Verbrauch der C1-Esterase bewirken und dadurch diese Form des Angioödems auslösen. Gleiches gilt für das hepatozelluläre Karzinom und die Leberzirrhose. Beide Erkrankungen gehen mit einer reduzierten Syntheseleistung der Leber einher und führen so zu erniedrigten C1-Esterasespiegeln, wodurch es zu einem erhöhten Bradykininspiegel kommt. Dieser begünstigt dann die Entwicklung des erworbenen Angioödems.

Unter dem pseudo-allergischen Angioödem (PAE) versteht man ein häufig medikamenten-induziertes Angioödem, welches gehäuft unter der Einnahme von ASS (Acetylsalicylsäure) auftritt, grundsätzlich kann es aber bei entsprechender Disposition von jedem Medikament ausgelöst werden. Es spricht gut auf die Therapie mit Glukokortikoiden und Antihistaminika an.

Die zeitnahe klinische Unterscheidung zwischen einem allergischen und einem nicht-allergischen Angioödem ist von großer Bedeutung, da in der akuten Notfallsituation mit bereits eingetretener ödematöser Schwellung des Rachenraumes und der dadurch bedingten Dyspnoe, eine akute vitale Bedrohung besteht. Letztlich entscheidet dann die korrekte Therapieform über den weiteren Therapieerfolg. Während bei der allergischen Form des Angioödems (histaminvermittelt) mit der Applikation von Glucocorticoiden, Antihistaminika und Adrenalin rasch Erfolge erzielt werden, ist diese Therapie bei dem nicht-allergischen Angioödem (bradykininvermittelt) wirkungslos. Hier hat sich klinisch die Therapie mit dem synthetischen

kompetitiven B2-Rezeptor-Antagonisten Icatibant als effektiver erwiesen (Bas M, et al., 2015). Icatibant ist strukturell ein Decapeptid, welches dem Bradykinin ähnelt. Die Wirkung basiert auf der selektiven und kompetitiven Hemmung der B2-Rezeptoren, wodurch die Wirkungen von Bradykinin verhindert wird. Icatibant hat fünf nichtproteinogene Aminosäuren, daher kann es nicht über die Carboxypeptidase N, die Kinase I oder durch das ACE-Converting Enzym abgebaut werden. Erste klinische Effekte nach Icatibant-Applikation, wie die Regression des Ödemes und die Besserung der klinischen Symptomatik sind nach circa 50 Minuten zu erwarten. Eine völlige Symptombefreiheit kann meist innerhalb von vier Stunden erzielt werden (Bas M, et al., 2010).

Äußerst hilfreich für die Unterscheidung zwischen allergischem und nicht-allergischem Angioödem sind die akkurate Anamnese (Medikamenten- und Familienanamnese), sowie die körperliche Untersuchung. Es sollte verstärkt auf klinische Zeichen einer Urtikaria oder allergischer Exantheme geachtet werden sollte. Diese frühen klinischen Zeichen können ein entscheidender erster Hinweis auf die allergische Genese eines Angioödemes sein. Mögliche Differentialdiagnosen sind Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, Tumore des Kopf-Hals-Bereiches, Speicheldrüsenerkrankungen, Abszesse und Gesichtspfleghone. Auch Folgen einer onkologischen Strahlentherapie und das Vena cava superior Syndrom sind mögliche Differentialdiagnosen. Daher sollte neben der üblichen laborchemischen Routinediagnostik ergänzend eine weitergehende Diagnostik mit Bestimmung der ACE-Serumaktivität, eine Rheumadiagnostik mit Bestimmung der Autoantikörper (ANA, ANCA, ENA), eine Allergiediagnostik mit Bestimmung des spez. IgE und der Tryptase, eine Bestimmung des C1-Inhibitor-Antigen und der C1-Inhibitor-Aktivität, sowie die Bestimmung der Faktor 12-Aktivität eingeleitet werden (Bas M, et al 2010). Beim idiopathischen Angioödem (IAE) sind bis dato weder die Auslöser noch die beteiligten Mediatoren bekannt. Therapiert wird es mit Glukocorticoiden und Adrenalin. Bei Therapieresistenz kann im Notfall Icatibant im off-label use versucht werden (Bas M, et al 2010).

1.4 Regulation der eNOS-Aktivität

Vaskulär wird NO in den Endothelzellen der Tunica intima mit Hilfe der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gebildet. Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt, die unterschiedliche Expressionsmuster in den verschiedenen Körpergeweben aufweisen. Man unterscheidet die induzierbare (iNOS), die neuronale (nNOS) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Die induzierbare NO-Synthase wird hauptsächlich in Makrophagen und neutrophilen Granulocyten nach Zytokinstimulation als Antwort auf eine Entzündungs- u./o. Immunreaktion gebildet (Cohen R A, et al., 1995).

Die neuronale NO-Synthase wird überwiegend in Neuronen gebildet und das NO fungiert als Neurotransmitter, indem es die Sekretion von Glutamat im präsynaptischen Spalt induziert. Auf diese Art wird der neuronale Impuls weitergeleitet.

Die eNOS befindet sich hauptsächlich in den so genannten Caveoli, das sind Einstülpungen der Plasmamembran innerhalb der Endothelzelle und das NO wird durch den intrazellulären Calcium-Einstrom freigesetzt. Das Calcium bindet dabei an das Calmodulin, welches daraufhin direkt an die eNOS bindet. Dadurch kommt es innerhalb der eNOS zu einem Elektronentransport, bei dem letztendlich NO gebildet wird.

Unterbrochen wird die NO-Bildung durch das Protein Calveolin. Dieses bindet an die Reduktionsdomäne der eNOS und dadurch wird der Elektronenfluss wieder unterbrochen. Die Bindung der eNOS an das Calveolin erfolgt dabei über einen Myristoylrest. Diese Bindung führt also zur Inaktivierung der eNOS und diese wird wieder in die Caveoli der Plasmamembran aufgenommen.

Die Aktivität der eNOS kann durch verschiedene weitere Regulationsmechanismen beeinflusst werden. Der dabei wichtigste Regulationsmechanismus ist die positive Feedback-Inhibition durch das NO selber (Buga G M, et al., 1993). Liegt genügend NO vor, bindet dieses an das Fe^{2+} Atom der Hämgruppe, welches zu NO eine wesentlich höhere Affinität aufweist als zum Sauerstoff, dadurch kann bereits 80-90% der eNOS-Aktivität inhibiert werden (Abu-Soud H M, et al., 1995).

Auch die Höhe der eNOS-Transkription, die Stabilität der entsprechenden mRNA und die Translationsrate sind entscheidende weitere Faktoren der eNOS-Expression und der eNOS-Aktivität (Nathan C and Xie Q, 1994). Zu einer erhöhten eNOS-Expression kommt es zum Beispiel nach mechanischer Dehnung der Gefäße (z.B. durch erhöhten Blutfluss), dem sogenannten „Shear Stress“. Darunter versteht man eine laminare Strömung in den Gefäßen, welche direkt auf die Endothelzellen einwirkt. Die so entstandene Schubspannung beeinflusst sowohl die Transkriptionsrate, als auch die Stabilität der eNOS- mRNA (Davis et al., 2001) und führt zu einer gesteigerten eNOS Expression. Diese ist allerdings auf eine erhöhte Aktivität der MAPKinasen Ras/Raf/MEK1/2 und Erk1/2 angewiesen. Die Stabilisierung der eNOS-mRNA dagegen scheint von der Aktivität der MAP-Kinasen weitgehend unabhängig zu sein (Davis et al., 2001). Denn die 3'-Polyadenylierung spielt hier eine deutlich wichtigere Rolle (Weber et al., 2005). mRNAs mit langem 3'-Poly(A)-Schwanz sind deutlich stabiler und werden häufiger translatiert (Mazumder et al., 2003). Und tatsächlich findet man in Endothelzellen, welche zuvor Shear Stress ausgesetzt waren, eine gesteigerte Expression von eNOS-mRNA mit langem 3'-Poly(A)-Schwanz, eine verlängerte Halbwertszeit der eNOS-mRNA und eine erhöhte Translationsrate (Weber et al., 2005). Die dazu nötige Aktivierung

des eNOS-Promotors wird durch die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an das „shear stress-responsive element“ (5'-GAGACC-3', lokalisiert zwischen -990 und -984) eingeleitet (Davis et al., 2004). In einer weiteren Region des eNOS-Promotors (652 und 644) bindet zusätzlich der so genannte Kruppel-like factor“ KLF2 (SenBanerjee et al., 2004). Auch der Aufbau des intrazellulären Zytoskeletts und die Fähigkeit der eNOS an die Zytomembran zu binden, nehmen weiteren Einfluss auf die eNOS-Aktivierung (Rizzo V, et al., 1998). So wird die gebildete eNOS nach der Translation im Golgi-Apparat myristyliert und palmitoyliert und anschließend in der Zellmembran durch Bindung an Caveolin verankert (Liu J, et al., 1995). Dort kommt es zur Tyrosin- und Serinphosphorylierung durch die Proteinkinase A und die Akt-Kinase (Dimmeler S, et al., 1999; Fulton D, et al., 1999) und somit zur Aktivierung der eNOS. Durch die Proteinkinase C kann die Aktivierung auch wieder rückgängig gemacht werden (Hirata K, et al., 1995).

Unter hypoxischen Bedingungen kommt es über eine Hemmung der Transkription zu einer reduzierten eNOS-Expression und eNOS Aktivität (Bouloumie A, et al., 1999). Die dabei noch gebildete mRNA wird durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF zwar kompensatorisch stabilisiert (Bouloumie A, et al., 1999; Kroll J and Waltenberger J, 1998), jedoch durch den Tumornekrose-Faktor α und hohe LDL-Konzentrationen schneller wieder abgebaut (Laufs U, et al., 1998). Weitere Studien deuten daraufhin, dass durch NO-Synthasen unter hypoxischen Bedingungen zusätzlich Superoxidradikale generiert werden. Dies konnte bereits für die neuronale NO-Synthase und die endotheliale NO-Synthase dokumentiert werden (Heinzel B, et al., 1992; Pou S, et al., 1992; Cosentino F, et al., 1995; Pritchard K A et al., 1995). Dieser Vorgang wird als NOS-Entkopplung bezeichnet und kehrt die eigentliche Wirkung der NO-Synthasen (vasoprotektives NO) zu generieren, ins genaue Gegenteil um, da sie nun selber Radikale produzieren und so den oxidativen Stress in den Zellen weiter erhöhen. So wurde für das eNOS-Enzym bereits beschrieben, dass es bei ungenügenden L-Arginin-Spiegeln u./o. bei unzureichender Versorgung mit BH4 hämkatalysiert Superoxid (O₂·-) generiert. Bei grenzwertiger L-Arginin/BH4-Versorgung wird zwischen der NO- und O₂-Produktion gewechselt, so dass u.a. Peroxynitrit (ONOO-) entsteht (Vasquez-Vivar et al., 1998; Xia et al., 1998). Bei einem Mangel an L-Arginin und ausreichenden BH4-Konzentrationen wird H₂O₂ generiert (Stuehr et al., 2001). Mittlerweile weiß man aber, dass ein eNOS-abhängiger oxidativer Stress alleine das vaskuläre Remodeling nicht verstärkt (Suvorava T, et al., 2015).

Weitere zusätzlich auf die Expression einflussnehmende Faktoren, die hier nur der Vollständigkeit halber aufgezählt werden sollen, sind Lysophosphatidylcholin, cGMP-

Analoga, Lipoproteine, Inhibitoren der Proteinkinase C, sowie verschiedene Zytokine (Cohen R A, 1995; Inou N, et al., 1995; Ohara Y, et al., 1995; Ravichandran L V., et al., 1995; Uematsu M, et al., 1995; Zembowicz A, et al., 1995).

1.5 eNOS-Knockout Mäuse

Bradykinin ist einer der potentesten bekannten Vasodilatoren und führt u.a. zur Freisetzung von NO, Prostacyclin (PGI₂) und dem endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Abu-Soud H M, et al., 1995). Uns interessierte, ob NO umgekehrt auch einen Einfluss auf Expression von Bradykinin besitzt. Um eine möglicherweise vorhandene Interaktion zwischen NO und Bradykinin zu untersuchen, wurden u.a. eNOS Knockout Mäuse (eNOS^{-/-}) eingesetzt.

Diese Mäuse sind defizient für die endotheliale NO-Synthase und weisen im Vergleich zu WildtypMäusen regelmäßig eine arterielle Hypertonie auf, durchschnittlich ist eine Erhöhung des mittleren arteriellen Druckes von circa 20mmHg nachweisbar. (Suvorava T, et al., 2015).

Als bereits gesichert gilt auch, dass der pharmakologische Knockout der eNOS durch das L-Nitroarginin (L-NA) den arteriellen Blutdruck erhöhen kann, denn in vivo wird kontinuierlich NO über die eNOS Funktion aus dem Endothel freigesetzt. Das NO führt über die induzierte Vasodilatation zu einer Verringerung des peripheren Widerstands und bewirkt so die Blutdrucksenkung. Das Fehlen der eNOS führt somit zu einem erhöhten vaskulärem Grundtonus und zur arteriellen Hypertonie. Trotzdem entwickeln eNOS- Knockout Mäuse über die Zeit keine Linksherzhypertrophie, welche als typische Langzeitkomplikation der arteriellen Hypertonie anerkannt ist. Auch die Perfusion der Koronarien, das Herzzeitvolumen, sowie die koronare Zirkulation von Bradykinin, welches eine Vasodilatation in den Koronarien bewirken kann, bleiben unverändert (Goedecke et al., 1998; Stauss et al., 1999). Die auftretende arterielle Hypertonie scheint aber eine Folge der fehlenden eNOS Aktivität zu sein, da die Herzfrequenz der eNOS-Knockout Mäuse erniedrigt ist. Eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems, als mögliche weitere Ursache der arteriellen Hypertonie kommt nicht in Frage (Goedecke et al., 1998; Kojda et al., 1999; Stauss et al., 1999). Bei gesteigerter Sympathikusaktivität kommt es regelmäßig zu einem Anstieg der Herzfrequenz. Diese liegt aber hier nicht vor. Die beiden wichtigsten Hormone des sympathischen Nervensystems sind dabei das Adrenalin und Nor-Adrenalin und beide Hormone bewirken durch Vasokonstriktion einen Blutdruckanstieg und erhöhen die Herzfrequenz. Der beobachtete Blutdruckanstieg in eNOS- Knockout Mäusen erklärt sich dadurch, dass über die Aktivierung der Proteinkinase G NO die Reninsekretion hemmt (Wagner et al., 1998).

Somit kann eine gesteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems zur Entwicklung des arteriellen Hypertonus in den eNOS- Knockout Mäusen beitragen. Und tatsächlich weisen eNOS- Knockout Mäuse stets eine messbar erhöhte Reninkonzentration im Plasma auf (Shesely et al., 1996).

Die Überexpression des eNOS-Gens führt dagegen erwartungsgemäß zur Entwicklung einer arteriellen Hypotonie. Es wird vermehrt NO gebildet, welches über die Vasodilatation den Blutdruck senkt (Ohashi Y et al., 1998; Suvorava T, et al., 2005 ; Bas M, Oppermann M, 2011).

Im Vorfeld konnte bei Mäusen mit disruptiertem eNOS-Gen schon gezeigt werden, dass bedingt durch die fehlende vaskuläre NO-Produktion, arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen nach einem gesetzten intraluminalen Schaden wesentlich stärker ausgeprägt waren, als bei Kontrollmäusen mit intaktem eNOS-Gen (Huang et al., 1995). Hier manifestiert sich also erneut der vasoprotektive Effekt des von der eNOS generierten NO. Zu bedenken bleibt allerdings, dass in den eNOS-Knockout Mäusen auch andere Isoenzyme der NO-Synthase (iNOS, nNOS) im geringen Maße vasoaktives NO freisetzen können und den Verlust der eNOS, zumindest theoretisch und partiell kompensieren könnten. Allerdings scheint dieser theoretisch denkbare Kompensationsmechanismus keine Rolle zu spielen, da es in den eNOS- Knockout Mäusen regelmäßig zur Entwicklung der arteriellen Hypertonie kommt (Kurihara et al., 1998).

Zusammenfassend suggerieren diese Befunde, dass von der endothelialen NO-Synthase gebildetes NO einen wichtigen Einfluss auf den Tonus der Gefäße ausübt, indem es vasodilatorisch wirkt und in der Summe seiner Effekte vasoprotektiv wirkt.

1.6 Fragestellung

Die Aktivierung des vaskulären Bradykinin Rezeptors Typ II (B2) führt zur Bildung von NO, Prostacyclin (PGI₂) und des endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF). Noch ist nicht bekannt, ob diese Mediatoren umgekehrt auch die Expression des B2 beeinflussen, weshalb im Rahmen dieser Promotion der Effekt von NO auf die vaskuläre B2 Expression untersucht werden sollte. Diese Fragestellung hat besondere klinische Relevanz, denn wenn NO die B2 Expression beeinflusst, müsste der Einsatz der häufig genutzten Antihypertensiva ACE-Hemmer und AT1-Blocker kritischer überdacht werden. Durch den Einsatz der ACE-Hemmer und AT1-Blocker wird durch die Hemmung des Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE) auch regelmäßig ein erhöhter Bradykininspiegel generiert. Somit erhöht sich das Risiko ein nicht allergisches Angioödem mit allen klinischen Komplikationen zu entwickeln um ein Vielfaches. Es müsste häufiger überdacht werden, ob nicht alternative

Antihypertensiva häufiger eingesetzt werden sollten, um die Komplikationen des akut lebensbedrohlichen Angioödems zu vermeiden. In Frage kämen z.B. Calciumantagonisten und viele andere Medikamente. Aber, es ist auch bekannt, dass es durch den Einsatz von ACE-Hemmern und AT1-Blockern zu einer verbesserten Endothelfunktion kommt und dadurch vermehrt vaskuläres NO zur Verfügung steht, welches eine vasoprotektive Funktion und Blutdrucksenkung bewirkt. Die zahlreichen vasoprotektiven Eigenschaften des NO weisen allerdings nicht alle Antihypertensiva auf. Und besonders positiv zu bewerten sind die Effekte des NO bei bereits an Arteriosklerose, koronarer Herzkrankheit oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) erkrankten Patienten, da sich die Progression der vaskulären Erkrankung durch NO verzögern läßt.

Um eine mögliche Interaktion zwischen dem Bradykinin und NO nachzuweisen, wurde im ersten Schritt der B2 Proteingehalt in den Organen Herz und Lunge von eNOS-Knockout Mäusen, eNOS⁺⁺, eNOSn und C57BL/6 bestimmt. In weiterführenden Versuchen wurden die verschiedenen Tierlinien dann entweder mit dem NO-Donor PETN oder mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt, um mögliche Effekte des fehlenden NO auf den B2 darstellen zu können. Transgen-negative eNOSn und C57BL/6 Mäuse dienten stets als Negativkontrollen.

Ergänzend zu den in vivo Experimenten wurde in in vitro Experimenten mit porvinen Aortenendothelzellen (PAEC) der B2- Proteingehalt nativ, nach Behandlung mit NO-Donatoren (SNAP oder DETA/NO) oder nach Behandlung mit einem NOS-Inhibitor (L-NA) bestimmt. Die Behandlung der Zellen mit L-NA entsprach dabei einem akuten pharmakologischen Knockout, da alle Isoformen der NO durch das L-NA gehemmt wurden und ermöglichte so den direkten Vergleich mit dem genetischen eNOS-Knockout. Uns interessierte besonders, ob es zu Kompensationsmechanismen zwischen der eNOS und dem B2 kommt und ob diese sich bei einem pharmakologischen und einem genetischen Knockout voneinander unterscheiden.

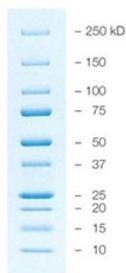
2. Material und Methoden

2.1. Substanzen und Puffer

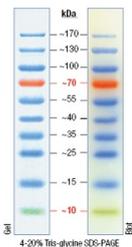
1x TAE-Puffer (pH 8,0)	Tris-Acetat 40 mM, EDTA 1mM
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris 1,5 M, SDS 0,4 %
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris 0,25 M, SDS 0,2 %

Tankpuffer (10x, pH 8,6)	Tris 0,25 M, Glycin 1,2 M, SDS 1 %
Westernblot Puffer (pH 8,5)	Tris 0,250 M, Glycin 0,001 M, MeOH 20%
TBST (pH 7,6)	Tris 0,01 M, NaCl 0,13 M, Tween 0,1 %
Probenpuffer	Tris 50 mM, SDS 2 %, Glycerin 10 %, Bromphenolblau 0,005 %
Probenpuffer (denaturierend):	440 µl Probenpuffer, 60 µl β-Mercaptoethanol

Proteingrößenmarker von BioRad, Precision Plus Protein™, All Blue Standards, 500 µl



Proteingrößenmarker von BioRad, PageRuler Plus Prestained™, 500 µl



Gellauf: Elektrophoresekammer Mini Protean von BioRad®

Blotting: Blotkammer von Biorad®

Blocken:

2% ECLadvanced / TBST (Amersham, Freiburg)

Skim Milk Powder (Fluka, München)

Verwendete Antikörper:

-Polyklonaler anti-B2 Bradykinin-Receptor-Antibody Acris Antibodies

(SP 4078P)

-Monoklonaler anti-B2 Bradykinin-Receptor-Antibody

(BD Biosciences)

-Meerrettich-Peroxidase-konjugierter anti-mouse IgG Antikörper (Sigma-Aldrich, Missouri / USA) monoklonaler anti-eNOS/NOS Type III (BD Biosciences)

Detektion:

-ECL Advance Westernblotting Detection Kit (Amersham, Freiburg)

-Lumi-Light-Westernblotting 1 Substrate, Lumi-Light Westernblotting 2 Substrate (Roche, Mannheim)

Herstellung des Trenngels (für 2 Gele)	12 %
Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	7,6ml
Trenngelpuffer (4x)	4,7ml
Aqua bidest	6,4ml
TEMED	18µl
APS (10 %)	180µl

Herstellung des Sammelgels	4,5 %
Acrylamid-Bisacrylamid (30 %)	2,4ml
Sammelgelpuffer (10x)	4,0ml
Aqua bidest	9,3ml
TEMED	18µl
APS (10 %)	180µl

Gewebe-Lysis-Puffer (4ml)

200µl	100mM Tris
8µl	PMSF (500x)
90µl	PIC (500x)
40µl	PIM
40µ	EDTA (100x)
400µl	EGTA (10x)
40µl	Na ₄ P ₂ O ₇ (100x)
20µ	Na-Vanadat
40µl	Na-F (100x)

40µl β-Glycerolphosphat
mit dH₂O auf ein Endvolumen von 4 ml auffüllen

Zellysis-Puffer/ RIPA-Lysis-Puffer:

150 mM NaCl	1,5ml 5 M
50 mM Tris/HCl pH 8,0	2,5 ml 1 M
1 % NP-40	500 µl
0,1 % SDS	500 µl 10 %
H ₂ O	45 ml

TE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris (121,14 mg / 100 ml)
1 mM EDTA (372,24 mg / 100 ml)

Coomassie-Färbung / Lösungen:

Stock I: 0,2 % Coomassie Brilliant blue R-250 in Ethanol 90 %

Stock II: Essigsäure 20 %

Fixierungslösung: Ethanol 40 %
 Essigsäure 10 %
 Wasser 50 %

Destaininglösung.: Ethanol 20 %
 Essigsäure 10 %
 Wasser 70 %

Ponceau-Färbung / Lösung:

10 x Stammlösung Ponceau- S, eingesetzt für die Experimente wurde eine mit Wasser verdünnte 1x Ponceau-S-Lösung.

Verwendete Kits:

-Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

-ECL Advance Westernblotting Detection Kit (Amersham, Freiburg)

Weitere Materialien und Geräte:

PVDF-Membran (Roche, Mannheim)

Röntgenfilme (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg)

Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik)

Begasungsbrutschrank

Gel-Dokumentationssystem Gel Doc 100- System, BioRad

Zellkulturmedien:

Medium M199 with Earle Salts with Glutamin (PAA the Cell Culture Company, Cölbe),

Trypsin EDTA (1: 250) 1x (PAA the Cell Culture Company, Cölbe),

Foetal Bovine Serum “ Gold “, defined foetal Bovine Serum, EU approved (PAA the Cell Culture Company, Cölbe).

Penicillin / Streptomycin (100x) (PAA the Cell Culture Company).

DETA/NO: Diethylenetriamine/nitric oxide adduct (Sigma-Aldrich, München).

2.2 Versuchstiere

Die Zucht der verwendeten Mäuselinien erfolgte unter der Leitung und Supervision von Frau Dr. med. Treiber, Leiterin der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Mäuse wurden in der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Edelstahlkäfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchte 55 % ± 5 %, Tag-Nacht-Rhythmus 12 h durch Kunstlicht mit 300 Lux). Sie erhielten keimfreies Trinkwasser ad libitum aus Flaschen und wurden kontinuierlich tierärztlich überwacht.

2.2.1 eNOSⁿ / eNOS⁺⁺ Mäuse:

Mit Hilfe eines Tie-2 Promotors wurden eNOS⁺⁺ Mäuse mit einer 3,3- fach höheren aortalen eNOS-Expression generiert (Suvorava T, et al., 2005 ; Bas M, Oppermann M, 2011).

Als Negativkontrollen dienten in allen durchgeführten Experimenten transgen-negative Wurfgeschwister (eNOSⁿ). Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter zwischen 12 bis 20 Wochen eingesetzt. Die bei den Versuchen erhobenen Daten der eNOS Knockout Mäuse wurden mit den Daten der eNOSⁿ Mäuse verglichen und in Relation gesetzt. Die einzelnen Präparationsschritte der Organpräparation sind für alle verwendeten Mäusestämme identisch. Die Mäuse wurden mit Kohlendioxid euthanasiert und auf einem Präparationstisch fixiert. Mit einer Schere wurde das Fell vom Thorax entfernt, Sternum und

Rippen für die Entnahme des Herzens und der Lunge durchtrennt. Das Herz wurde frei präpariert, mit einer Pinzette umfasst und von der Aorta an der Aortenwurzel abgetrennt. Auch die Lungen wurden für die Experimente entnommen und verwendet. Nach der Entnahme wurden die Organe sofort in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff bis zum Ende der Präparation aufbewahrt. Bis zur Lyse am Folgetag wurden sie in einer -80°C Truhe gelagert. Die Durchführung der Studie wurde im Vorfeld von der Regierung genehmigt (AZ 50.05-230-3-65/99, AZ 50.05-230-3-94/00, AZ50.05-230-18/06) und die Experimente wurden nach den Richtlinien für den Umgang mit Versuchsmäusen laut deutschem Tierschutzgesetz und „Guide for the care and use of Laboratory animals, (US Institute of Health) durchgeführt.

2.2.2 eNOS Knockout Mäuse

Für die Experimente wurden u.a. auch eNOS-Knockout Mäuse eingesetzt (Shesely et al., 1996; Goedecke et al., 1997). Der Genotyp eines jeden Mäuses wurde mit Hilfe der PCR und der aus der Schwanzspitze isolierten DNA vor Versuchsbeginn bestimmt.

2.2.3 L-NA Behandlung

Um eine möglicherweise vorhandene Abhängigkeit der B2 Expression von NO zu überprüfen, erhielten eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ Mäuse über 3 Wochen den NOS-Inhibitor L-Nitroarginin (L-NA, Sigma, Deutschland), (100 mg/kg/KG/d), welcher alle Isoformen der NO-Synthasen gleichermaßen inhibiert und so die gesamte endogene NO-Freisetzung hemmt. Diese Vorgehensweise entspricht dem akuten pharmakologischen Knockout der eNOS (Kojda G and Harrison D G, 1999).

2.2.4 PETN Behandlung

C57BL/6 Mäuse wurden randomisiert in 3 Gruppen eingeteilt (n= 6 je Gruppe) und erhielten über 4 Wochen entweder ein Placebo des NO-Donors Pentaerythryl-Tetranitrat (PETN) 0 mg, oder PETN in der Dosierung 6 mg (PETN-6) bzw. 60 mg (PETN-60) PETN/kg/KG/d über die Nahrung. Die Plasmakonzentrationen der PETN Metabolite Pentaerythritol Di- und Mononitrat wurden mit Hilfe der Gaschromatographie / Massenspektrometrie bestimmt, um sicher zu stellen, dass eine ausreichend hohe orale PETN Dosis appliziert wurde und genügend hohe NO Plasmaspiegel erreicht wurden (Vorgehensweise siehe Muller et.al., 2004). Nach oraler Gabe wird PETN aufgrund des hepatischen firstpass-Effekts schnell und fast komplett zu Pentaerithryltrinitrat (PE-tri-N) denitriert. PE-tri-N wird ebenfalls schnell denitriert, so

dass dieser Metabolit nicht im Plasma quantifiziert werden kann. Nur bei sehr hohen oralen Dosen finden sich Spuren von PE-tri-N im Vollblut. Pentaerithryldinitrat (PEDN) ist daher der erste Nitratester, der im Plasma quantifizierbar ist. In zwei weiteren Schritten wird PEDN zu Pentaerithrylmononitrat (PEMN) und Pentaerithrit metabolisiert. Nach oraler Applikation kann der PETN Spiegel im Plasma also nicht direkt gemessen werden, daher wurden stattdessen die Konzentrationen von PEDN und PEMN bestimmt.

Das PETN wurde über die Firma Actavis, Langenfeld, Deutschland bezogen.

2.3 Zellkulturexperimente

2.3.1 PAEC (porvine Aortenendothelzellen)

Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Im Anschluss an die Präparation erfolgte stets eine PCR zur Geschlechtsbestimmung. Die Aorten der Mäuse wurden uns freundlicherweise vom Duisburger Schlachthof (Emmericherstr. 96 B, 47138 Duisburg) kurz nach der Schlachtung zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Präparation der PAEC

Die Aorten (Pars thoracica) wurden zu Beginn der Präparation mehrfach mit sterilem PBS gespült. Das Fett und die umgebende Tunica adventitia externa wurden entfernt und die von der Aorta abgehenden Gefäße ligiert. Anschließend wurde das Lumen mit PBS und 10 ml Dispase Solution® (1 mg/ml, Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) gespült und das untere Ende der Aorta verschlossen. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die so gewonnene Zell-Lösung zweimalig für jeweils 5 Minuten mit 200 x g in dem Kulturmedium 199 (PAA, Pasching, Österreich), welches zusätzlich 10 % fetales Kälberserum und Penstrep® enthielt (PAA, Pasching, Österreich) zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde resuspendiert und die Zellen in Zellkulturflaschen und im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Nach sieben bis zehn Tagen und bei entsprechender Zellkonfluenz, wurden weitere Passagen angelegt. Für die Experimente wurden die Passagen 2 bis 3 eingesetzt, damit eine bestehende B2 Expression als gesichert anzunehmen war und eine gestörte B2 Expression, durch ein zu hohes Zellalter, ausgeschlossen werden konnte.

2.3.3 Passagieren der PAEC

Vor dem Passagieren der Zellen wurde der Arbeitsplatz und das Mikroskop gründlich und mehrfach mit Ethanol gereinigt, um mögliche Kontaminationen der Zellkulturen zu

vermeiden. Die Zellkonfluenz wurde für jede Zellkulturflasche einzeln bestimmt. Bei einer Zellkonfluenz von mindestens 80-90% wurde das Medium mit einer Pasteurpipette entfernt und anschließend 20 ml PBS in die Zellkulturflasche gegeben und diese mehrfach geschwenkt, damit verbliebenes altes Medium ausgewaschen und entfernt werden konnte, ansonsten hätte dieses später das Trypsin inaktivieren können. Nach diesem Arbeitsschritt wurde das PBS abpipettiert und 6-7 ml Trypsin /5 ml PBS in die Zellkulturflasche eingebracht. Unter dem Mikroskop wurde die möglichst vollständige Ablösung der Zellen von der Wand der Zellkulturflasche kontrolliert. Die erhaltene Trypsin-Zellsuspension wurde aufgenommen und in ein neues Röhrchen überführt und mit 20 ml frischem Medium versetzt. Das Röhrchen wurde bei 200 x g für 5 Min / RT zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und 15 ml frisches Medium M199 hinzu gegeben und das Zellpellet resuspendiert. In neue Zellkulturflaschen wurde jeweils 5 ml der Zelllösung pipettiert und die Zellen wurden im Wärmeschrank (37°C, 5% Kohlendioxid) bis zur nächsten Passagierung weiter kultiviert.

2.4 Zellinkubationen PAEC-Zellen

Die Kultivierung der PAEC-Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 5,0 % Kohlendioxid und einer konstanten Temperatur von 37°C. Das verwendete Medium setzte sich aus Medium 199 (PAA), 8 % fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, sowie 100 µg/ml Streptomycin zusammen und wurde zweimal wöchentlich komplett ausgetauscht. Bei entsprechender Zell-Konfluenz wurden die Zellen wie bereits beschrieben passagiert und für die Experimente verwendet.

Die PAEC wurden entweder mit dem NOS-Inhibitor L-NA, dem NO-Donor SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin) oder dem NO-Donor DETA /NO (Diethylenetriamine/nitric oxide adduct) behandelt. Nur mit Medium inkubierte Zellen dienten als Negativkontrollen. Die Zellen wurden jeweils entweder über einen Zeitraum von 1h, 3h, 6h, oder 12h inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationen wurden sie lysiert und 40µg Protein / Probe wurde für die Westernblot-Versuche eingesetzt.

2.4.1 L-NA Inkubation von PAEC

Für die Inkubation wurde jeweils 1mM L-NA eingesetzt, welches vorab in PBS gelöst und dann dem Medium hinzugefügt wurde. Die Inkubationszeiten waren entweder 1h, 3h, 6h, sowie entsprechende Negativkontrollen (nur mit Medium inkubierte Zellen). Das L-NA inhibiert alle Isoformen der NOS und dadurch die komplette endogene NO-Produktion

innerhalb der PAEC. Dies entspricht dem akuten pharmakologischen Knockout, so dass direkte Vergleiche zum genetischen Knockout möglich wurden.

2.4.2 SNAP Inkubation von PAEC

10 μmol SNAP wurde in DMSO gelöst und dem Medium hinzugefügt. Die gewählten Inkubationszeiten waren hier ebenfalls 1h, 3h, 6h, sowie entsprechende Negativkontrollen (nur mit Medium inkubierte Zellen). SNAP ist ein stabiler NO Donor und potenter Vasodilatator. SNAP induziert in vivo und in vitro keine pharmakologische Toleranz. Es setzt unter physiologischen Bedingungen spontan NO frei und in wässriger Lösung beträgt die Halbwertszeit circa 4,6 Stunden.

2.4.3 DETA/NO Inkubation von PAEC

Die PAEC-Zellen wurden für diese Versuche mit 100 μMol DETA/NO inkubiert. Die Zeitintervalle der Inkubationen waren 1h, 3h oder 6h, sowie entsprechende Negativkontrollen (nur mit Medium inkubierte Zellen). DETA/NO gehört zu den NO-freisetzenden zwitterionischen Polyaminen, den sogenannten NONOates. In wässriger Lösung setzt es spontan und pH-abhängig 2 Moleküle NO frei. Die Halbwertszeiten betragen bei 37°C und einen pH Wert von 7.4 jeweils 20 Stunden und 56 Stunden.

2.5 Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen

2.5.1 Proteinpräparation aus Zellen

Vorbereitungen für die Proteinpräparationen:

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 1,5 ml RIPA-Lysis Puffer und 60 μl Proteinase-Hemmer-Cocktail 3 (Calbiochem) bereit gestellt und bis zum eigentlichen Gebrauch auf Eis aufbewahrt.

Durchführung:

Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen wurden 2x mit jeweils 10 ml PBS gewaschen. Durch vorsichtiges mechanisches Ablösen wurden die Zellen von der Wand der Zellkulturflasche gelöst und wieder in das alte Medium aufgenommen. Im nächsten Präparationsschritt erfolgte eine Zentrifugation bei 200 x g bei RT für 5 Minuten. Das Zellpellet wurde 1x mit 10 ml PBS gewaschen und erneut bei 200 x g und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 2 ml Standardreaktionsgefäß überführt. Die

Zellsuspension wurde mit 2000 rpm und RT für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl eiskaltem RIPA-Lysis Puffer resuspendiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde für 15 Minuten im Ultraschallbad bei 0°C homogenisiert. Die homogenisierte Zelllösung wurde erneut mit 100 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den isolierten Zellproteinen wurde abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Standardreaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Proteinpräparation aus Organen

Die Organproben wurden bis zur Proteinpräparation am Folgetag bei -80°C gelagert und kurz vor der Proteinpräparation in flüssigen Stickstoff überführt und so entsprechend bei -196°C schockgefroren. Die Organproben wurden einzeln mechanisch pulverisiert und das Pulver in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Lysispuffer (Lungen) bzw. 250 µl Lysispuffer (Herz) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit dem Ultra-Turrax® homogenisiert und zusätzlich noch einmal zur besseren Homogenisation im Ultraschallbad auf Eiswasser 10 Minuten lang behandelt. Es folgte dann die Zentrifugation mit 100 x g bei 4°C für 10 Minuten. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Standardreaktions-gefäß Reaktionsgefäß überführt und 20 Minuten lang bei 4°C mit 100 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß verbracht. Mit Hilfe der Bradford Methode wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

2.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung aus Organ- und Zelllysaten nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Organ- und Zelllysate erfolgte mit Hilfe der Bradford-Methode. Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode für die semi-quantitative Bestimmung von Proteinen (Bradford, 1976). Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blue G-250 bildet dabei in saurer Lösung mit kationischen, sowie nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten von Proteinen Komplexe aus. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen kationischen rotgefärbten Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens photometrisch bestimmt werden und ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Das Ausmaß der

Farbreaktion variiert allerdings von Protein zu Protein und ist abhängig von der Temperatur und der Zeit bis zur Messung. Daher wird zur genauen Konzentrationsbestimmung zusätzlich eine Kalibrationslösung benötigt. Meist werden so genannte Standardproteine, wie das BSA, zur Kalibrierung eingesetzt. Vor der eigentlichen Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde mit verschiedenen Konzentrationen von BSA eine Kalibrierung des Photometers vorgenommen und nach linearer Regression der resultierenden Eichgrade die Steigung errechnet. Unter den gleichen Bedingungen wurden dann die Proben der Lysate gemessen und deren Proteingehalt bestimmt.

Herstellung des Bradford Reagenz:

Chemikalien:

40 mg Coomassie Blue G- 250

10 ml Ethanol (96 %)

20 ml Phosphorsäure (85 %)

170 ml Aqua dest.

Coomassie Blue G250 (BioRad, München) wird unter Rühren bei 50°C in Ethanol gelöst (30 min). Anschließend werden 150 ml Aqua dest., sowie 20 ml Phosphorsäure zugegeben. Alles zusammen wird ad 200 ml aufgefüllt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur für weitere 30–60 min gerührt und anschließend durch einen Millipore Filter mit 2 µm Porengröße gesaugt oder alternativ zweimal durch einen Faltenfilter gegossen. Die erhaltene Lösung sollte leicht bräunlich gefärbt sein und das Reagenz ist ungefähr vier Wochen bei Raumtemperatur und lichtgeschützter Lagerung haltbar.

Herstellung einer Verdünnungsreihe (Eichkurve zur Proteinbestimmung)

Chemikalien:

Tris-Puffer (5 mM)

1 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumine)

Bradford-Reagenz

Pipettierschema:

Endkonzentration BSA [µg/ml]	BSA [µl]	Tris Puffer [µl]
140	100	614
120	100	733

100	50	450
90	50	505
80	50	575
50	200	200
20	50	200
10	50	450

Messung der Verdünnungsreihe:

Wenn die Verdünnungsreihe fertig gestellt ist, werden jeweils 100 µl einer Probe mit je 400 µl Bradford-Reagenz in einer Küvette gegeben. Nach fünf Minuten Wartezeit verfärbt sich die Lösung in den Küvetten bläulich und die Proben werden gegen einen Blank, bestehend aus 100 µl Tris mit 400 µl Bradford-Reagenz, bei 595 nm (vis) gemessen.

Auswertung der Messergebnisse:

Nach der Messung werden die ermittelten Messwerte in das Computerprogramm „Prism3“ (GraphPad® Software) übertragen. Dieses Programm ermittelt die lineare Regression und die Standardabweichung, so dass eine Eichgerade angelegt werden kann.

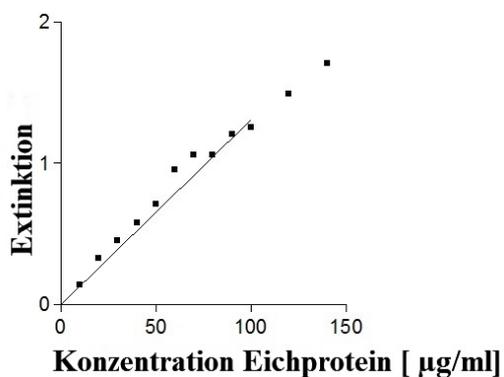


Abb.2: Exemplarische Eichgerade

Durch die Verwendung einer Stammlösung mit bekannter Proteinkonzentration kann über eine Verdünnungsreihe eine Eichkurve erstellt werden. Als Stammlösung wurde bovines Serumalbumin (BSA) eingesetzt.

Mit Hilfe der Geradengleichung kann mit Hilfe der folgenden Gleichung die Konzentration C des Proteins bestimmt werden: $C = (E - b) / m$

E: Extinktion

b: Ordinatenabschnitt

m: Steigung

2.5.4 Proteinauftrennung

Die Proteinauftrennung aus den Organ- und Zelllysaten erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Es wurde ein 4,5%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel eingesetzt. Die eingesetzte Proteinkonzentration wurde im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt (z.B. 20 µl Proteinlösung + 20 µl Probenpuffer denaturierend) und bei 95°C 5 Minuten lang im Hitzblock denaturiert. Die denaturierten Proben wurden im Anschluss durch Vortexen (15 sec.) homogenisiert und dann zentrifugiert (15 sec.). Unmittelbar vor dem Auftrag der Proteine auf das Sammelgel wurden die Proben mit einer Auftragekanüle homogenisiert. Die Proteinauftrennung erfolgte bei 160 Volt in einer Elektrophoresekammer (Mini Protean, BioRad, München) mit 1x Tankpuffer. Der Gellauf selber wurde im 4°C Kühlraum des Institutes durchgeführt und dauerte im Durchschnitt circa 2,5 Stunden. Als Molekulargewichtsmarker diente der Precision Plus ProteinTM All Blue Standards (BioRad, München). Bei den Gewebeproben aus der Lunge wurde jeweils eine Proteinkonzentration von 80µg/ Probe eingesetzt, bei Gewebeproben aus dem Herzen nach PETN-Behandlung ebenfalls 80 µg Protein / Probe und nach L-NA Behandlung 150µg Protein / Probe, sowie bei allen Zelllysaten jeweils 40 µg Protein / Probe.

2.5.5 Protein-Transfer

Die im Trenngel aufgetrennten Proteine wurden in einer Blotting Kammer (BioRad, München) auf eine PVDF-Membran (Roche, Mannheim) übertragen. Dazu wurde die Blotting Kammer mit eiskalten Blotpuffer befüllt und die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 90 Volt und dauerte circa 1,5 h. Während des Proteintransfers wurde der Blotpuffer nach circa 45 Minuten Laufzeit einmal komplett gegen neuen eiskalten Blottingpuffer ausgetauscht und das Eis innerhalb des Kühllakkus wurde bei Bedarf entsprechend öfter gewechselt.

2.5.6 Blotting-Prozedur

Die Blotting- Prozedur ist für alle in dieser Promotion aufgeführten Westernblots identisch und wird daher nur einmal exemplarisch beschrieben. Sie erfolgte stets im Anschluss an die Gelelektrophorese. Hierzu wurde zur Größe des Gels ein passendes Stück einer PVDF-Membran ausgeschnitten und dieses kurz in Methanol aktiviert (30 sec) und dann in dH₂O rehydriert (2 min). Anschließend wurde die Membrane zur Äquilibration des pH-Wertes für 5 Minuten in den Westernblot-Puffer gelegt. Die Filter und Schwämme wurden ebenfalls in den Westernblot-Puffer gelegt, bis diese gut durchtränkt waren. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden aus den Schwämmen und Filtern durch leichte manuelle Kompression entfernt.

Die Blotkammer (BioRad) wurde wie in Abbildung 3 gezeigt zusammengesetzt, ein Schwamm wurde auf die schwarze Seite der Halterung postiert, die Filter, das Gel, die Membrane, weitere Filter und ein weiterer Schwamm wurden nacheinander in die Halterung eingebracht. Die Halterung wurde so in die Kammer gesetzt, dass deren schwarze Seite zur schwarzen Kathode zeigte. Die Kammer wurde mit kaltem (4°C) Westernblot-Puffer befüllt, ein Kühlaggregat und ein Rührfisch wurden in die Kammer eingebracht und diese dann auf einen Magnetrührer gestellt. Das Blotting erfolgte bei 90 V und dauerte circa 1.5 h. Nach dem Blotten wurde die Membrane vollständig getrocknet und anschließend in Methanol ca. 30 sec lang reaktiviert, dann circa 2 Minuten in dH₂O rehydriert und für weitere 2 Minuten in TBST gelegt.

Vor der Antikörperinkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membrane bei 75kD in zwei Teile geschnitten und der obere Teil der Membrane mit dem eNOS-Antikörper (eNOS Bande bei 135 kD) und der untere Teil der Membrane mit dem B2 Antikörper (B2 Bande bei 42 kD) inkubiert.

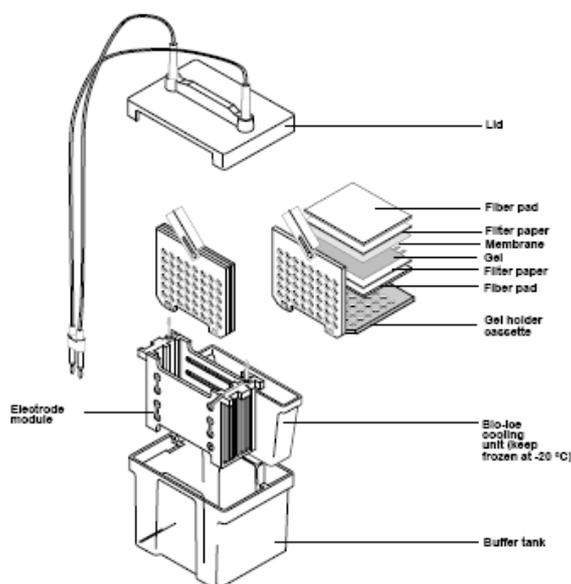


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Blot-Kammer (www.bio-rad.com)

2.5.7 B2-Western- Blot (monoklonaler Antikörper)

Die B2-Expression wurde durch Westernblotversuche und die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen B2 ermittelt. Lunge und Herz wurden den Mäusen im Alter von 12 bis 20 Wochen entnommen und in flüssigen Stickstoff bei -196°C schockgefroren und entsprechend dem unter 4.5.2 beschriebenen Protokoll der Proteinpräparation lysiert. Die Homogenisate der jeweiligen Organe wurden für die Westernblots eingesetzt. Die Proteinauftrennung durch die Elektrophorese und die sich anschließende Blotting Prozedur erfolgte wie bereits beschrieben. Zum Blocken wurde eine 2 %ige ECLadv.- Lösung

hergestellt. Hierzu wurde 1 g ECLadv. (ECL Advance Westernblotting Detection Kit, Amersham, Freiburg) in 50 ml TBST-Puffer aufgelöst. Mit dieser Lösung wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert, so dass unspezifische Bindestellen blockiert wurden.

1. Primärantikörperinkubation (monoklonaler Antikörper gegen B2):

Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde eine 2%ige ECLadv.-Lösung mit mAb anti-B2 (BD Biosciences, Heidelberg) 1:1000 hergestellt und die Membrane wurde mit der ECLadv./ Antikörper-Lösung gut bedeckt. Es erfolgte eine Inkubation auf der Wippe bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurde zusätzlich für 1 Stunde bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Im Anschluss wurde die Membrane 4x 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Spezifität des BD-Antikörpers wurde mittels Geweben aus Bradykinin-Knockoutmäusen bereits überprüft und nachgewiesen (Khosravani et al., 2015).

2. Sekundärantikörperinkubation:

Für die Sekundärantikörperinkubation wurde der Meerrettich-Peroxidase-konjugierte anti-mouse IgG Antikörper (Sigma-Aldrich, Missouri / USA) 1:10.000 in 2%iger ECLadv./TBST Lösung verdünnt. Die Membrane wurde mit der Antikörperlösung gut bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde die Membrane 4x 5 Minuten lang mit TBST-Puffer gewaschen, damit ungebundene Antikörper entfernt wurden.

Entwicklung der Membranen:

Pro Membrane wurden 500 µl ECLadv. Lösung A und 500 µl ECLadv. Lösung B vermischt und die Membrane in dieser Lösung fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklung der Membrane erfolgte in der Dunkelkammer des Photolabors auf zwei übereinandergelegten Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham®, Freiburg) mit Belichtungszeiten von circa 10 sec., 20 sec., 30 sec.. Der Röntgenfilm, welcher direkt auf der Membrane gelegen hatte wurde verworfen, da er lediglich als Filter zur Signalabschwächung diente. Auf diese Weise konnten klare Signale erhalten werden, gleiches konnte alternativ auch durch kürzere Belichtungszeiten erreicht werden.

2.5.8 eNOS- Westernblot

Zum Blocken der Membrane wurde eine 2%ige ECLadv.- Lösung hergestellt. Dazu wurde 1 g ECLadv. in 50 ml TBST-Puffer durch vortexen aufgelöst. Die Membrane wurde in der Blocking-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert.

1. Primärantikörperinkubation:

Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde eine 2%ige ECLadv.-Lösung mit dem mAb anti-eNOS/NOS Type III (BD Biosciences) mit einer Antikörperverdünnung von 1:1000 hergestellt. Die Membrane wurde mit der ECLadv./ Antikörper-Lösung gut bedeckt und auf einer Wippe bei 4°C über Nacht im Kühlraum inkubiert. Am Folgetag wurde die Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunden fortgesetzt und im Anschluss wurde die Membrane 4x 5 lang Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um so überschüssigen ungebundenen Antikörper zu entfernen.

2. Sekundärantikörperinkubation:

Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten anti-mouse IgG Antikörper (Sigma-Aldrich, Missouri / USA), wurde dieser auf eine Konzentration von 1:25.000 in einer 2 % igen ECLadv./TBST Lösung verdünnt. Die Membrane wurde mit der Lösung bedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert, anschließend wurde sie 4x für jeweils 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.

Entwicklung der Membranen:

Zur Entwicklung der Membranen wurde pro Membran 500 µl ECLadv. Lösung A und 500 µl ECLadv. Lösung B vermischt und die Membrane darin für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf zwei übereinander gelegten Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham®, Freiburg) im Photolabor entwickelt (Belichtungszeiten ~ 10 sec., 20 sec., 30sec.). Der Röntgenfilm, welcher direkt auf der Membrane gelegen hat, wurde verworfen, da er lediglich als Filter zur Signalabschwächung diente. Auf diese Weise erhielt man klare Signale, gleiches konnte aber auch durch kürzere Belichtungszeiten erreicht werden.

2.5.9 Detektion der Proteine

Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers auf der Membrane wurde dessen

Peroxidaseaktivität bestimmt. Hierzu wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) in der Dunkelkammer des Fotolabors für einige Sekunden auf die inkubierte Membrane gelegt und entwickelt .

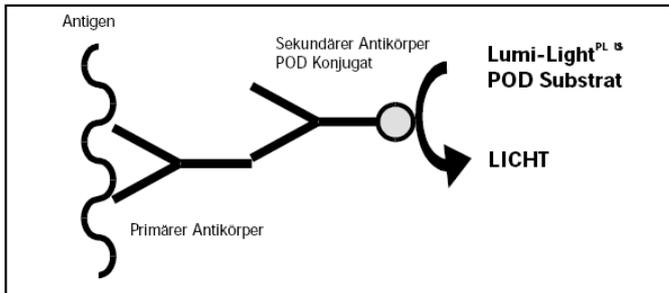


Abb. 4: Schema der Antikörper-Bindung und Peroxidase-Reaktion auf der Membran.
(<http://biochem.roche.com/pack-insert/2015218b.pdf>)

Die Detektion erfolgt durch Chemilumineszenz. Durch das Enzym Peroxidase kommt es zur Umsetzung von Wasserstoffperoxid, wobei Sauerstoff freigesetzt wird, welcher die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Durch die Oxidation wird das Luminol auf ein höheres Energieniveau transferiert und bei Rückkehr in den ursprünglichen energetischen Ausgangszustand wird diese Energie als Chemilumineszenz wieder freigesetzt. Durch den Zusatz von sogenannten Enhancern (Verstärkern) wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und so die Zeitdauer der Emission verlängert und das Signal verstärkt.

2.5.10 Coomassie-Färbung

Nach der Blotting-Prozedur wurden die Polyacrylamid-Gele häufig einer Coomassie- Färbung unterzogen, um die Effektivität des Protein-Transfers beurteilen zu können. Coomassie-Brillant-Blau R-250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der u.a. zum Anfärben von Proteinen verwendet werden kann. Er lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt Proteine somit unspezifisch. Er kann daher zur Detektion von aufgetrennten Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel eingesetzt werden. Die Nachweisgrenze für Coomasie R-250 liegt bei circa 0,1 µg Protein pro Bande in einem Gel.

Die Gele kamen zuerst für 30 Minuten in eine Fixierungslösung und anschließend für 20 Minuten in ein Gemisch aus Stock I+II Lösung (1:1). Im Anschluss wurden sie erneut für 30 Sekunden in die Fixierungslösung gelegt und dann in der Destaining-Lösung so lange inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Die Gele wurden im letzten Arbeitsschritt 2x 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, zwischen zwei Einmachfolien gespannt und über Nacht getrocknet.

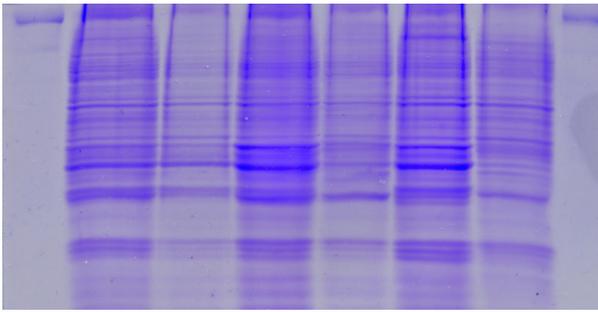


Abb. 5: Beispiel einer Coomassie-Färbung. Die Proteinbanden wurden durch den Farbstoff blau angefärbt und sind nun im Gel gut sichtbar. Deutlich wird auch die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe. Im oberen Bereich des Geles befinden sich die größeren Proteine, während die kleineren Proteine während der Gelelektrophorese weiter nach unten gewandert sind. Jeweils links und rechts wurde der verwendete Größenstandard aufgetragen. (BioRad, PageRuler Plus, Prestained Protein Ladder).

2.5.11 Ponceau S-Färbung

Um zu überprüfen, ob nach dem Western-Blot die Proteine effektiv auf die PVDF-Membran übertragen worden sind, wurden diese häufig einer Ponceau S Färbung unterzogen. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff (3-Hydroxy-4-((2-sulfo-4-((4-sulfophenyl)azo)phenyl)azo)-2,7-naphthalindisulfonsäure Tetranatriumsalz), der Proteine auf einer PVDF-Membran reversibel anfärbt. Ponceau S bindet dabei an positiv geladene Aminogruppen der Proteine und kann leicht wieder mit Wasser ausgewaschen werden, danach kann die Membran für die Immundetektion mit Antikörpern weiter verwendet werden.

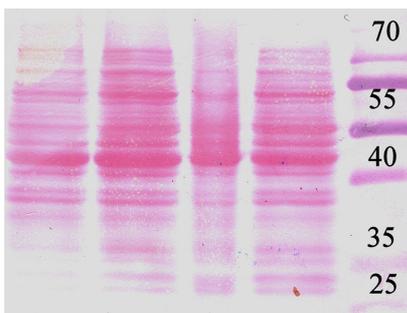


Abb. 6 : Exemplarische Ponceau- Färbung. Die rötlich angefärbten Banden auf der Membrane stellen die Proteine dar. Die B2 Bande (42kD) ist in Höhe der 40kD Bande des Größenstandards am rechten Bildrand gut sichtbar geworden (BioRad, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder).

2.5.12 Quantitative Auswertung der Western-Blots

Die darstellbaren Proteinmengen auf den belichteten und entwickelten Filmen wurden mit dem Gel Doc 1000[®] (BioRad, München) und der Software Quantity One[®] (Version 4.1.1) ausgewertet und es erfolgte eine elektronische Berechnung der Pixelwerte (OD-Werte,

Optische Dichte-Werte).

2.5.13 Blots der Zellversuche

Siehe Westernblot Versuche der Mäuse mit monoklonalem Primärantikörper.

2.5.14 DNA-Isolierung aus PAEC

Die DNA wurde grundsätzlich mit dem QIAamp DNA Mini Kit[®] isoliert. Zu Beginn der DNA-Isolierung wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und aufbewahrt. Die Zellen wurden 1x mit 10 ml PBS gewaschen, trypsinisiert und wieder in das alte Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellschlammung mit 300 x g 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Standardreaktionsgefäß überführt und mit 20 µl Proteinase K (alternativ Qiagen Protease) und 200 µl Puffer AL versetzt. Eine Homogenisierung erfolgte durch Vortexen (circa 15 sec.) und die Inaktivierung aller Enzyme durch eine 10 minütige Inkubation bei 56°C im Heizblock. Im nächsten Präparationsschritt erfolgte eine 1 minütige Zentrifugation mit 8000 rpm und es wurde 200 µl 100% Ethanol hinzugefügt. Anschließend wurde erneut für 15 sec. gevortext und für 1 Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Eine der mitgelieferten Säulen des Kits wurde auf ein Auffanggefäß gestellt und das gewonnene Lysat auf die Säule gegeben. Der Deckel der Säule wurde verschlossen und es erfolgte eine Zentrifugation für 1 Minute mit 8000 rpm. Die Säule wurde im nächsten Arbeitsschritt auf ein frisches Auffanggefäß gestellt und 500 µl Puffer AW1 hinzugefügt. Dann wurde für 1 Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde abermals auf ein neues Auffanggefäß gestellt und es wurden 500µl Puffer AW2 hinzugefügt und erneut für 3 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Präparationsschritt wurde die Säule auf ein 1,5 ml Standardreaktionsgefäß plaziert, 200 µl Puffer AE oder dH₂O auf die Säule gegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert und letztmalig erneut für 1 Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.5.15 DNA-Isolierung aus Mäusen

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde den Mäusen im Alter von etwa vier Wochen ein 1-1,5 cm großes Stück Schwanzspitze amputiert. Das Gewebe wurde in 750 µl Lysispuffer und Proteinkinase K (0,5 mg/ml Endkonzentration) über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung (~6 M) wurde der Ansatz 5 min geschüttelt und 10 Min. mit 13.000 rpm zentrifugiert, um so die Proteine abzutrennen. Zur Fällung der DNA wurden 850 µl

des gewonnen Überstandes in ein neues Eppendorfgesäß überführt und mit 600 µl Isopropanol 99% versetzt. Nach 2-3 maligem Umschwenken wurde die präzipitierte DNA durch 5 minütige Zentrifugation mit 13.000 rpm abgetrennt und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde mit 1,5 ml Ethanol 70% gewaschen und durch Zentrifugation (5 Min mit 13.000 rpm) wurde der Ethanol wieder von Pellet entfernt. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur vollständig getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.5.16 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA wurde UV-spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Menge der UV-Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Reinheit der DNA-Probe wurde durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) im Vorfeld überprüft. Bei einer reinen DNA-Probe liegt dieser Wert typischerweise bei 1,8. Geringere Werte deuten auf eine Kontamination der Probe hin.

2.5.17 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine etablierte Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Der Begriff Kettenreaktion beschreibt dabei den Umstand, dass die Produkte der vorherigen Zyklen als Matrize für die folgenden Zyklen dienen und so eine exponentielle Vervielfältigung der DNA ermöglichen. Die PCR wird durch das Enzym DNA-Polymerase ermöglicht, welches ubiquitär in allen Lebewesen vorkommt. Die DNA wird normalerweise vor der Mitose repliziert. Die DNA-Polymerase bindet dazu an einen einzelnen DNA-Strang und synthetisiert mithilfe eines kurzen und komplementären Oligonukleotids (= Primer) den komplementären DNA Strang. Für die Durchführung der PCR benötigt man die zu replizierende Original-DNA (=Template) und zwei unterschiedliche Primer, damit auf den beiden Einzelsträngen der Original- DNA, jeweils der Startpunkt der DNA-Synthese festgelegt werden kann. Durch die Primerbindung wird der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt von zwei Seiten begrenzt. Außerdem benötigt man eine thermostabile DNA-Polymerase (= Taq-Polymerase), Desoxyribonucleosidtriphosphate als Bausteine der DNA-Synthese, Magnesiumionen für die korrekte Funktion der Polymerase und Pufferlösungen, um ein für die DNA-Polymerase geeignetes Milieu zu gewährleisten.

Die Polymerase-Kettenreaktion selber findet in dem so genannten Thermocycler statt. Hier werden die Reaktionsgefäße exakt auf die vorgegebenen Temperaturen während der einzelnen

Reaktionsschritte erhitzt und wieder abgekühlt. Ein PCR-Prozess beinhaltet im Durchschnitt circa 20-50 Zyklen und jeder Zyklus wird dabei in drei weitere Arbeitsschritte unterteilt. Der erste Arbeitsschritt besteht aus der Denaturierung der DNA, hierzu wird die initial noch doppelsträngige DNA auf circa 94–96°C erhitzt und durch die thermische Aufspaltung der Wasserstoffbrücken erfolgt die Trennung der DNA - Stränge voneinander. Während dieses ersten Zyklus wird die DNA daher oft für längere Zeiträume erhitzt als eigentlich nötig, um sicher zu stellen, dass sich die zu replizierende DNA und auch die eingesetzten Primer vollständig voneinander getrennt haben. Der nächste Arbeitsschritt besteht aus der Primerhybridisierung (= Primer Annealing), also der Anlagerung der Primer an die zu replizierende DNA. Hierzu wird die Temperatur durch den Thermocycler 30 Sekunden lang auf einen Wert gebracht, welcher die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA erlaubt. Die dabei zu wählende Temperatur wird durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt. Wählt man eine ungeeignete Temperatur, können sich die Primer nicht korrekt an die komplementären Sequenzen der zu replizierenden DNA binden und es entstehen unspezifische PCR-Produkte. Meist liegt diese Temperatur etwa 5–10°C unterhalb des Schmelzpunktes der Primersequenzen (in der Regel bei einer Temperatur von circa 55–65°C). Während der sich anschließenden DNA-Amplifikation füllt die DNA-Polymerase die zu replizierenden DNA-Abschnitte mit freien Nukleotiden auf. Startpunkt ist dabei das 3'-Ende des angelagerten Primers. Der Primer wird nach der Replikation nicht wieder von der synthetisierten DNA abgelöst, sondern bildet jetzt den Anfang des neuen DNA-Doppelstranges. Die Amplifikation dauert durchschnittlich circa 30 Sekunden pro 500 Basenpaare, variiert aber je nach verwendeter DNA-Polymerase. Die zu wählende Temperatur während der Amplifikation wird im wesentlichen vom Arbeitsoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase beeinflusst und liegt bei der Taq-Polymerase circa 68–72°C . Wie in Abbildung 7 ersichtlich entstehen im ersten Zyklus der PCR also 2 DNA-Stränge, die im Bereich der Zielsequenz doppelsträngig sind. Nach dem Schmelzen zu Beginn des zweiten Zyklus stehen dadurch zwei DNA-Einzelstränge und zwei am 3'-Ende überlange Einzelstränge zur Verfügung. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, dass nur der Startpunkt der DNA-Synthese durch den Primer festgelegt wurde, nicht jedoch der Endpunkt. Im sich anschließenden Denaturierungsschritt erfolgt der Abbruch der DNA-Strangsynthese dann durch die thermische Strangtrennung. Im zweiten Zyklus liegen jetzt die eingesetzte DNA und die neu synthetisierten DNA-Stränge vor. An der ursprünglichen DNA erfolgt dann derselbe Prozess wie im ersten Zyklus, d.h. an die neu synthetisierten DNA-Einzelstränge, welche an 5' bereits dort enden wo sie sollen, lagern sich erneut Primer in der 3'-Region an. Die nun synthetisierten DNA- Stränge haben keinen 3'-Überhang mehr, weil das Template am 5' Ende durch die erste Syntheserunde und den ersten Primer korrekt endet. Nach dem zweiten Zyklus liegen also zum ersten mal Produkte der gewünschten Länge vor und in den sich

Mastermix: 20 µl

Mastermix 2,5x (Firma Qiagen, BestellNr. 201445), die Mg²⁺ Lösung wird zusammen mit dem Mastermix geliefert. Die Primer wurden über die Firma MWG bezogen. Die eingesetzten Mengen sind stets für den einfachen Ansatz einer Probe (Ansatz 23 µl+2 µl DNA) angegeben, bei mehreren Proben multipliziert man diese Werte entsprechend mit der Probenanzahl + 2 zusätzliche gedachte Proben, um bei Pipettierungenauigkeiten noch genügend Ansatz zu haben.

PCR-Programm Tie2eNOS (Stamm 4014):

1.Primer catgenot 5 (Cat 5)

5'-GGG AAG TCG CAA AGT TGT GAG-3'

2.Primer eNOS Genotyp 261 (eNOS)

5'GCT CCC AGT TCT TCA CGC GAG-3'

Programm für die PCR

Temperaturen:

Schritt 1: 95°C 3 Min.

Schritt 2: 95°C 1 Min.

Schritt 3: 54°C 1 Min.

Schritt 4: 72°C 2 Min.

35 Zyklen ab dem 2. Schritt

Insgesamt wurden 12 µl Probe + 5 µl Blaumarker / Slot auf das Gel auftragen. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1,5%igem Agarosegel (1,5 g Agarose + 100ml 1x TAE- Puffer, welchem 0,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt wurde), bei 90 Volt aufgetrennt. Die Laufzeit des Gels betrug circa 30 Minuten (Elektrophoresekammer Mini Protean, BioRad, München).

Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente im UV-Licht analysiert und ausgewertet. Die Bilder wurden mit dem Gel Doc 1000[®] (Biorad, München) erstellt.

Exemplarisches PCR-Ergebnis:

Das Molekulargewicht der eNOS beträgt 135 bp, in diesem Bereich liegt entsprechend die erwartete eNOS Bande. Das Transgen konnte in den Mäusen 38 und 42 nachgewiesen werden, bei den transgen- negativen Mäusen handelte es sich jeweils um transgen-negative Wurfgeschwister.

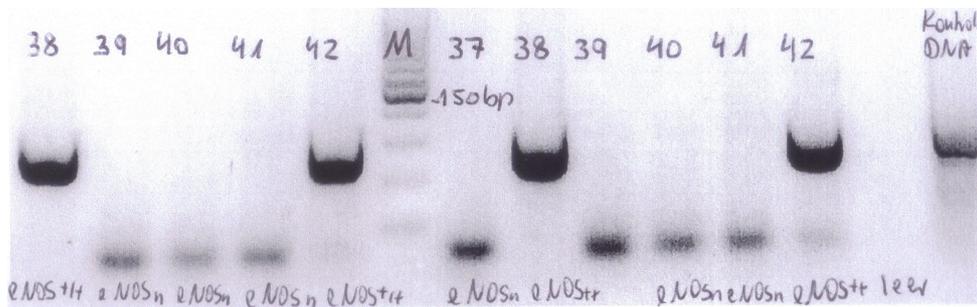


Abb. 8: PCR-Ergebnis transgen-positiver eNOS^{+/+}- Mäuse (Mäuse 17, 35, 98)

Die gesuchte Bande zeigt sich erwartungsgemäß nur bei den transgen-positiven eNOS^{+/+} Mäusen, die transgen-negativen eNOS⁻ Mäuse weisen die Bande nicht auf. M bezeichnet den aufgetragenen Größenstandard (BioRad, Precision™, All Blue Standards). Die markierte Bande des Größenstandards liegt dabei im Größenbereich von 150 Basenpaaren. Leer bezeichnet einen Slot ohne Probe. Ganz rechts wurde die eNOS DNA aufgetragen.

2.5.19 Genotypisierungs-PCR eNOS –Knockout Mäuse (Stamm 1008)

PCR-Ansatz:

Primer 1-4 Ausgangslösung 1:50 (Verdünnung: 2µl Primer + 98 µl dH₂O)

Primer 1: 2,5µl

Primer 2: 2,5µl

Primer 3: 2,5µl

Primer 4: 2,5 µl

Wasser: 18 µl

Mg: 1 µl

Mastermix: 20 µl

Nach diesem angegebenen Schema wurde die Ansatzlösung hergestellt. Für den einfachen Ansatz einer DNA Probe wurden 49µl Ansatzlösung und 1µl DNA eingesetzt.

Sequenzen der eingesetzten Primer :

1. Primer: 5'-GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC-3'

2. Primer: 5'-GAG CCA TAC AGA TGG TTG CC-3'
3. Primer: 5'-CTC GAC GTT GTC ACT GAA GC-3'
4. Primer: 5' -TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC-3'

Programm für die PCR = ENOSGEN2 (Name des gespeicherten Programms)

Temperaturen:

Schritt 1: 95°C 3 Min.

Schritt 2: 94°C 1 Min.

Schritt 3: 55°C 1 Min.

Schritt 4: 72°C 1 Min.

35 Zyklen ab dem 2. Schritt

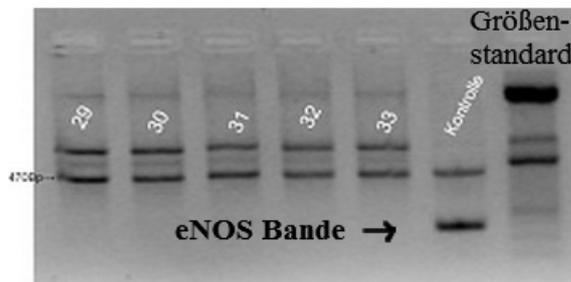


Abb. 9 : Beispiel einer PCR zur Bestimmung des eNOS- Knockout-Genotyps.

Die Mäuse Nr. 29, 30, 31, 32 und 33 weisen keine eNOS Bande auf und sind homozygote eNOS-Knockout Mäuse. Das eNOS Gen wurde bei ihnen durch eine Neomycin-Kassette im Rahmen eines Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) ersetzt. Das Kontrolltier ist ein heterozygotes Tier. Es besitzt die eNOS Bande, da es noch über ein eNOS Gen verfügt. Die über der eNOS Bande liegende Bande stellt die Neomycinbande dar.

2.5.20 PCR zur Geschlechtsbestimmung PAEC

Da für die Experimente ausschließlich männliche Mäuse verwendet werden sollten, erfolgte regelmäßig eine Geschlechtsbestimmung. Die Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Mäusen erfolgte durch den Nachweis des porvinen Amelogenin-Gens, das als gewebespezifisches Protein im Zahnschmelzepithel zu finden ist (Ikawa et al., 2005). Amelogenin wird durch zwei Gene kodiert, AmelX und AmelY, die sich im 5'-untranslatiertem Bereich in ihrer Sequenz unterscheiden. Bereits im Vorfeld wurden Primerpaare generiert, die auf dem X- oder dem Y-Chromosom des Amelogenin-Gens binden und so eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Mäusen ermöglichen. Die erwartete Fragmentgröße betrug für das AmelY 277 Basenpaare und für das AmelX 245

Basenpaare. Pro Probe wurde 1 µg DNA und 20 pmol Primer (MWG, Ebersberg) eingesetzt. Die Temperaturzyklen wurden im Mastercycler Gradient® (Eppendorf, Hamburg) generiert. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der DNA durch Elektrophorese in einem 1,5%igem Agarosegel.

1. Primerpaar für das Y-Chromosom:

Sense: 5'-ACCACAGCTGATGGCAAAGC-3'

Antisense: 5'-CCGGGAACCTTTTGAGAGTCC-3'

2. Primerpaar für das X-Chromosom:

Sense: 5'-TGGGCAACATTAGTACGACACG-3'

Antisense: 5'-GCTGTGATTAGTCCATGCAGTTTG-3'

Es wurde jeweils ein Primerpaar für das X-Chromosom und ein Primerpaar für das Y-Chromosom eingesetzt, so dass insgesamt vier Primer benötigt wurden.

Nach Isolierung der DNA aus den porvinen Aortenendothelzellen wurde die PCR mit dem Taq PCR Mastermix (Qiagen, Hilden), 5 pmol des sense- und des antisense-Primer sowie 100-200 ng DNA unter folgenden PCR-Konditionen durchgeführt:

Vorbereitung der Primer:

Die Primer wurden über die Firma MWG bezogen, es wurden 20 pmol Primer /Probe eingesetzt. Die Primer wurden wie folgt auf eine Ausgangskonzentration von 100 pmol verdünnt.

AMEL Y Sense-Primer + 183 µl dH₂O

AMEL Y Antisense-Primer + 67 µl dH₂O

AMEL X Sense-Primer + 210 µl dH₂O

AMEL X Antisense-Primer + 269 µl dH₂O

Um nun die Konzentration von 20 pmol zu erhalten, wurde 4 µl Primer + 16 µl dH₂O eingesetzt.

PCR-Ansätze zur Bestimmung der Heterochromosomen:

Pro Probe wurden 1 µg DNA eingesetzt.

X-Chromosom:

12,5 µl Mastermix / Probe

0,5 µl Anti-Sense-Primer X / Probe
0,5 µl Sense-Primer X / Probe
1 µl DNA / Probe
10,5 µl dH₂O / Probe

Y-Chromosom:

12,5 µl Mastermix / Probe
0,5 µl Anti-Sense-Primer Y / Probe
0,5 µl Sense-Primer Y / Probe
1 µl DNA / Probe
10,5 µl dH₂O / Probe

Als Negativkontrolle für das X-Chromosom:

12,5 µl Mastermix
0,5 µl Anti-Sense-Primer X
0,5 µl Sense-Primer X
11,5 µl dH₂O / Probe

Als Negativkontrolle für das Y-Chromosom:

12,5 µl Mastermix / Probe
0,5 µl Anti-Sense-Primer Y
0,5 µl Sense-Primer Y
11,5 µl dH₂O / Probe

PCR-Programm:

94°C 3 Minuten

94°C 30 sec.

63°C 30 sec.

72°C 25 sec.

72°C 7 Minuten

45 Zyklen ab dem 2. Schritt

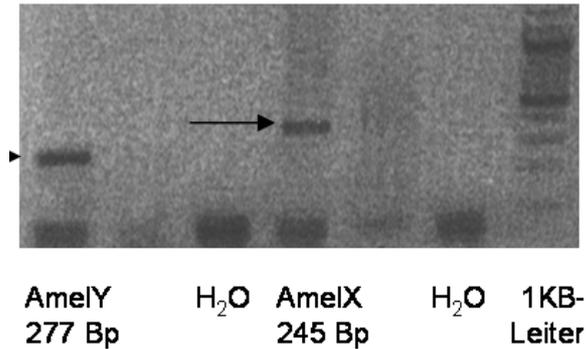


Abb. 10: Exemplarisches PCR-Beispiel einer Geschlechtsbestimmung.

In diesem Beispiel konnten sowohl Amel Y (277 Bp) als auch Amel X (245 Bp) nachgewiesen werden, daher handelte es sich um ein männliches Tier. Die Pfeile markieren jeweils das X bzw. das Y-Chromosom.

2.5.21 Auftrennung der DNA-Fragmente

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1,5%igem Agarosegel (1,5 g Agarose + 100 ml TAE-Puffer, welchem 0,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt wurde), bei 90 Volt aufgetrennt. Die Laufzeit betrug circa 30 Minuten. Als Gelpuffer wurde 1x TAE-Puffer eingesetzt. Die DNA Proben wurden jeweils mit 5 µl Blaumarker versetzt und in die Slots des Gels eingebracht. Als DNA Größenstandard wurde eine 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente im UV-Licht analysiert und ausgewertet. Die Bilder wurden mit dem Gel Doc 1000[®] (Biorad, München) erstellt.

Elektrophorese-Ansatz / Probe:

25 µl PCR-Produkt + 5 µl Probenpuffer.

12 µl wurden pro Probe aufgetragen.

2.6. Statistische Auswertung

Alle biochemischen und funktionellen Methoden sind als arithmetischer Mittelwert (\pm SEM, Standardfehler des Mittelwertes) der jeweiligen Anzahl (n) von Einzelexperimenten ausgedrückt. Die Daten wurden durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgendem Student-Newmans-Keuls Test oder einen unpaarigen zweiseitigen Student-t-Test analysiert. Das Signifikanzniveau für α wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P \leq 0,05$ festgelegt. Bei Westernblots wurde jeweils eine repräsentative Abbildung von mehreren Versuchen mit ähnlichem Ergebnis dargestellt. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism, Version 3,0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 B2 Expression in eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ Mäusen

Bezüglich der B2 Expression konnte zwischen eNOS⁺⁺ und eNOSⁿ Mäusen weder für die Lunge ($124,6 \pm 28,4\%$, $p > 0,05$ Abb. 11), noch für das Herz ($114,5 \pm 18,1\%$, $p > 0,05$ Abb.13) ein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch die eNOS Überexpression erhöhte endogene NO-Produktion keinen direkten Einfluss auf die B2 Expression nimmt und es auch keine organspezifischen Unterschiede zwischen Lunge und Herz gibt.

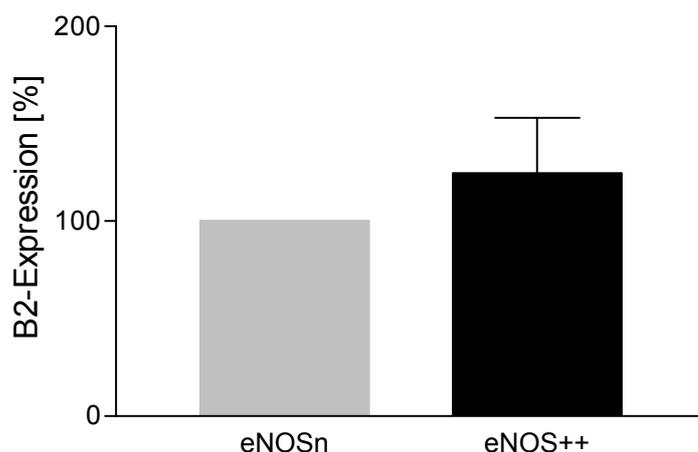


Abb. 11: Vergleich der B2 Expression in der Lunge zwischen eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ Mäusen (n=8). Zwar lässt sich eine marginale Steigerung der B2 Expression in den eNOS⁺⁺ Mäusen beobachten, allerdings ist diese nicht signifikant ($p = 0,57$).

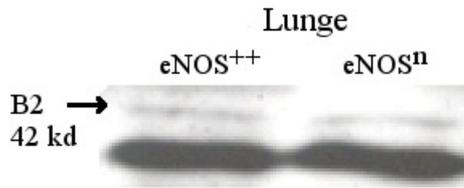


Abb. 12: Vergleich der pulmonalen B2 Expression zwischen eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} Mäusen im Westernblot. Eine signifikant veränderte Expression des B2 Rezeptors ist nicht zu detekMäusen. Die B2 Banden sind nahezu identisch.

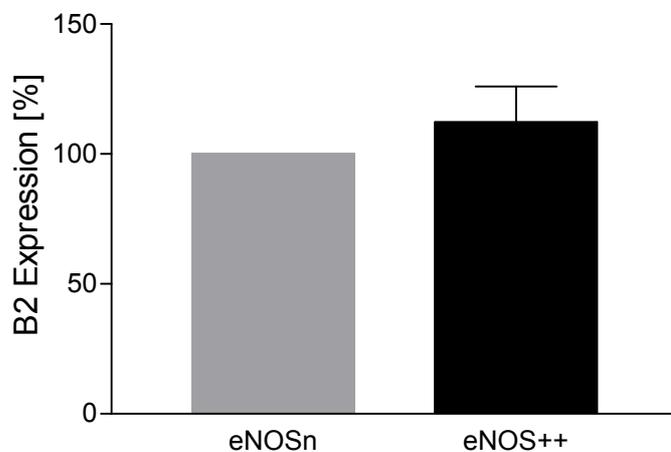


Abb. 13: Vergleich der kardialen B2 Expression von eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} Mäusen (n=10).

Wie der Vergleich der B2 Expression im Herzen von eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} Mäusen zeigt, lässt sich keine signifikante Änderung der B2 Expression nachweisen. Im Herz der eNOS^{+/+} Mäuse manifestierte sich lediglich eine tendenzielle Erhöhung der B2-Expression, ähnlich wie dieses bereits für die Lunge gezeigt werden konnte.

Exemplarisch zeigen Abb. 12 und Abb. 14 zwei Blots, aus denen die Daten für die entsprechenden Balkendiagramme (Abb. 11 und Abb. 13) generiert wurden.

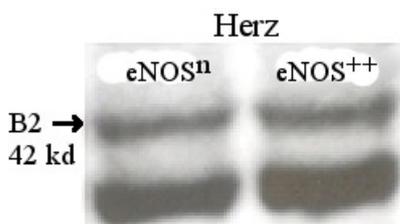


Abb. 14: Vergleich der kardialen B2 Expression von eNOS^{-/-} und eNOS^{+/+} Mäusen im Westernblot. Die B2 Expression wird durch die erhöhte zur Verfügung stehende Menge von vaskulärem NO nicht verändert, sie bleibt konstant.

3.2. B2 Expression in eNOS-Knockout Mäusen

In eNOS Knockout Mäusen konnte initial eine signifikante Zunahme der B2 Expression in der Lunge $130,7 \pm 6,5\%$ ($p < 0,05$) und im Herzen $172 \pm 26\%$ ($p < 0,05$) gezeigt werden (Abb. 15). Allerdings wurde in diesen Experimenten akzidentell eine unspezifische IgG-Bande durch den eingesetzten Sekundärantikörper detektiert und fälschlicherweise als B2-Bande interpretiert. Diese IgG-Bande konnte nur in eNOS Knockout Mäusen nachgewiesen werden. Sie liegt, ebenso wie der Bradykininrezeptor in Höhe von circa 42 kD. Im Rahmen von Folgeexperimenten mit einem anderen Sekundärantikörper konnte aber zwischenzeitlich bewiesen werden, dass in eNOS Knockout Mäusen keine Hochregulation der B2 Expression stattgefunden hat. Auch hier blieb die B2 Expression unbeeinflusst von NO (Khosravani M, et al., 2015).

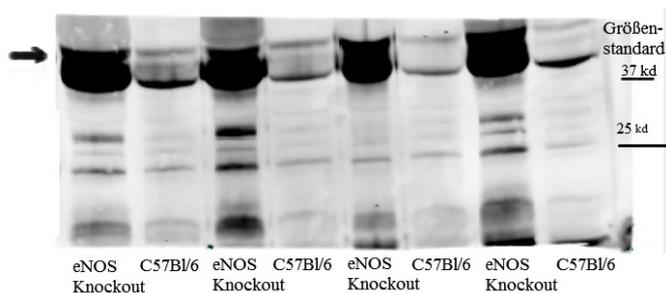


Abb. 15: Darstellung der IgG Bande in einer Coomassie Färbung eines SDS-Geles bei eNOS Knockout Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6. Auf das Gel aufgetragen wurden jeweils C57Bl/6 Mäuse und eNOS Knockout Mäuse. In Höhe von 42 kD befindet sich die Bande des B2 Rezeptors und in fast derselben Höhe wird auch die Bande des IgG dargestellt. Diese Bande war nur in eNOS Knockout Mäusen vorhanden, in den anderen untersuchten Tierlinien trat sie nicht auf.

3.3 B2 Expression in den PETN behandelten C57Bl/6 Mäusen

In den mit dem NO-Donor PETN behandelten Mäusen kam es unabhängig von der eingesetzten PETN-Konzentration weder in der Lunge noch im Herzen zu einer Veränderung der B2 Expression (Abb. 16 und Abb. 18). Nach einer PETN-Behandlung sind die Metabolite des PETN, das Dinitrat PEDN und das Mononitrat PEMN im Blutplasma nach Ethylacetatextraktion per GC/MS messbar. Dabei kann ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der verabreichten Dosis und der Konzentration der Metabolite gefunden werden. $r^2 = 0,5606$ für PEDN und $r^2 = 0,7374$ für PEMN. Die gefundenen Plasmaspiegel entsprachen dabei beispielsweise in den Mäusen die 6 mg/kg

KG/Tag bekamen 167 ± 105 ng/ml (PEMN) und $17,3 \pm 3,3$ ng/ml (PEDN) (Oppermann et.al., 2008).

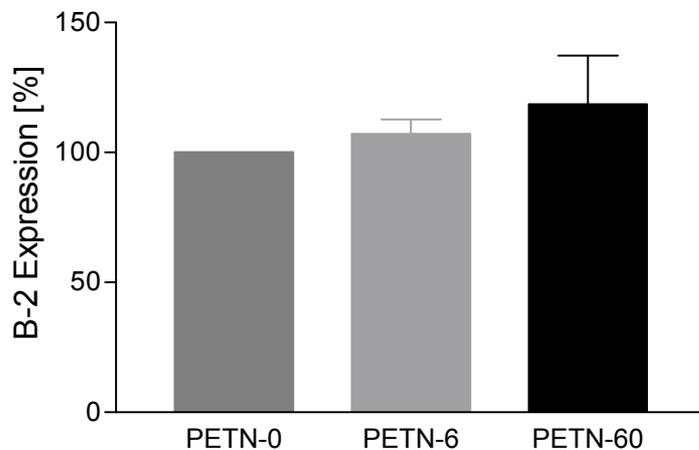


Abb. 16: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die B2 Expression in der Lunge. Unabhängig von der eingesetzten PETN Konzentration zeigt sich keine Änderung der B2 Expression ($n = 6$). Die B2 Expression wurde mittels BD Antikörper evaluiert. Die Versuchmäuse erhielten über vier Wochen entweder 6 mg/kg KG/Tag oder 60 mg/kg KG/Tag PETN. Als Negativkontrolle dienten Mäuse die 0 mg/kg KG/Tag PETN erhielten.

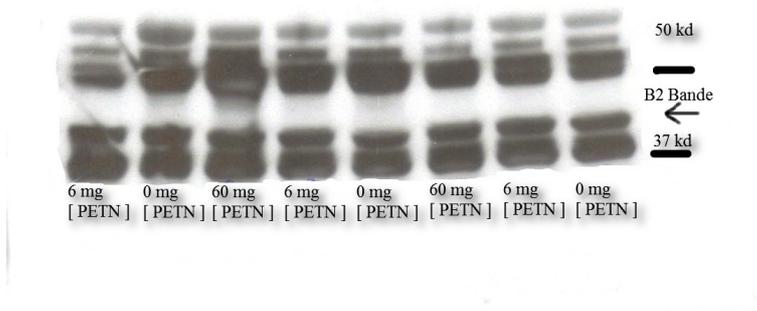


Abb. 17: Exemplarischer PETN-Westernblot für die Lunge. Aufgetragen wurden Gewebeproben aus der Lunge von Mäusen, die mit unterschiedlichen PETN Dosen von 0mg/kg KG/Tag, 6 mg/kg KG/Tag und 60 mg/kg KG/Tag behandelt wurden. Unabhängig von der eingesetzten PETN Dosis zeigt sich für keine eingesetzte PETN Dosis im Western Blot keine veränderte B2 Bande. Als Negativkontrolle dienten die mit PETN 0mg/kg KG/Tag behandelten Mäuse.

Abbildung 17 zeigt, dass die B2 Expression unabhängig von der eingesetzten PETN Konzentration stets konstant bleibt. Das exogen zugeführte NO hat somit keinen Einfluss auf die B2 Expression. Dies verdeutlichen besonders gut die unbehandelten Mäuse (0 mg PETN). In ihnen lag nur die endogene Menge von NO vor, da sie lediglich ein Placebo (PETN 0

mg/kg KG/Tag) erhielten. Trotzdem zeigen sie die gleiche B2 Expressionsrate, wie die mit PETN behandelten Mäuse.

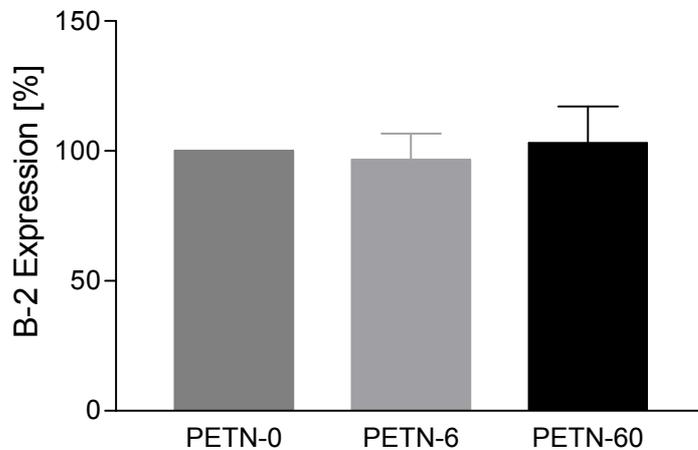


Abb. 18: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die B2 Expression in der Lunge. Aufgetragen wurden pulmonale Gewebeproben von Mäusen, die mit unterschiedlichen PETN Dosen (0 mg/kg KG/Tag , 6 mg/kg KG/Tag , 60 mg/kg KG/Tag) behandelt wurden. Die mit PETN 0 mg/kg KG/Tag behandelten Mäuse stellen dabei die Negativkontrollen dar.

Abbildung 18 zeigt, dass die B2 Expression unabhängig von der eingesetzten PETN Dosis konstant bleibt.

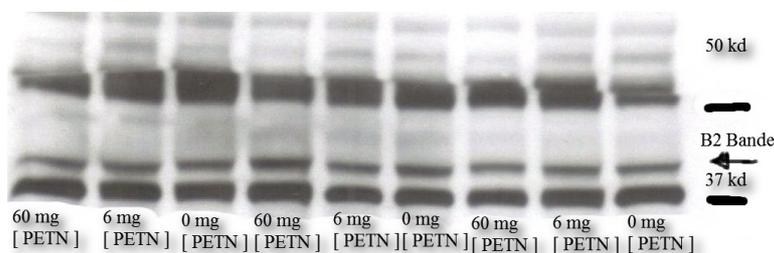


Abb. 19: Exemplarischer PETN-Westernblot für das Herz. Aufgetragen wurden kardiale Gewebeproben von Mäusen, die mit unterschiedlichen PETN Dosen (0 mg/kg KG/Tag , 6 mg/kg KG/Tag , 60 mg/kg KG/Tag) behandelt wurden. Die mit PETN 0 mg/kg KG/Tag behandelten Mäuse stellen dabei die Negativkontrollen dar. Am rechten Bildrand sieht man den aufgetragenen Größenstandard. In Höhe von circa 42 kd befindet sich die gesuchte B2 Bande.

Exemplarisch zeigen Abb. 17 und Abb. 19 zwei Blots, aus denen die Daten für die entsprechenden Balkendiagramme (Abb. 16 und Abb. 18) generiert wurden. Im den Westernblots lässt sich dokumentieren, dass die B2 Expression unter allen gewählten Versuchsbedingungen konstant bleibt. Ein gewebespezifischer Unterschied zwischen pulmonalem und kardialem Gewebe lässt sich durch dieses Ergebnis ebenfalls nicht ableiten.

3.4 eNOS-Expression in den PETN behandelten C57/Bl6 Mäusen

Getestet wurde die eNOS Expression unter dem Einfluss von exogenem NO. Das PETN diente dabei als NO-Donor. Eingesetzt wurden unterschiedlich hohe Dosen von PETN (0 mg/kg KG/Tag , 6 mg/kg KG/Tag und 60 mg/kg KG/Tag) wodurch unterschiedlich hohe vaskuläre NO Spiegel generiert wurden. Die eNOS Expression blieb bei allen eingesetzten PETN Dosen konstant.

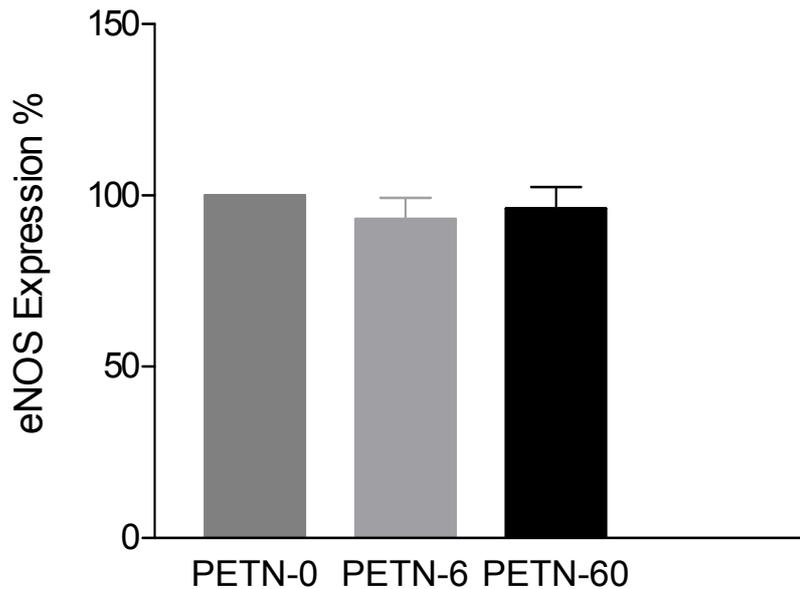


Abb. 20: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die eNOS Expression in der Lunge. Die eNOS Expression wird nicht durch das PETN bzw. die daraus resultierende erhöhte Menge von vaskulärem NO beeinflusst.

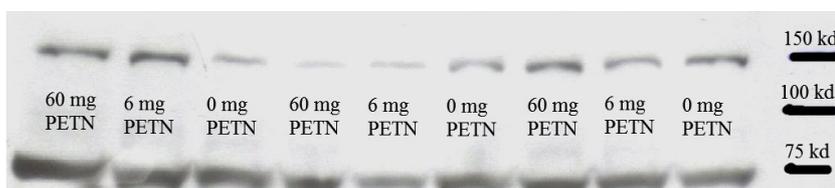


Abb. 21: Westernblot eNOS Expression im Lungengewebe von PETN behandelten C57/Bl6 Mäusen. Aufgetragen sind Gewebeproben von Mäusen, die mit unterschiedlichen PETN Konzentration behandelt worden sind. Die PETN Konzentration betrug entweder 0 mg/kg KG/Tag , 6 mg/kg KG/Tag oder 60 mg/kg KG/Tag . Unterschiede in der eNOS Expression zeigen sich aber nicht.

In Abbildung 21 ist die eNOS Expression in pulmonalem Gewebe unter Einfluss von unterschiedlichen PETN Konzentrationen (0 mg, 6 mg und 60 mg) dargestellt. Die Expressionsrate von eNOS ist sowohl unter Einfluss von 6 mg PETN als auch unter 60 mg

PETN vergleichbar mit der Kontrolle ohne (0 mg) PETN. Im direkten Vergleich dazu zeigt sich auch im kardialen Gewebe keine Abhängigkeit der eNOS Expression von der eingesetzten PETN Konzentration (siehe Abbildung 22).

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte weder für kardiales noch für pulmonales Gewebe ein Effekt der eingesetzten PETN Konzentration auf die eNOS-Expression nachgewiesen werden (je n= 6).

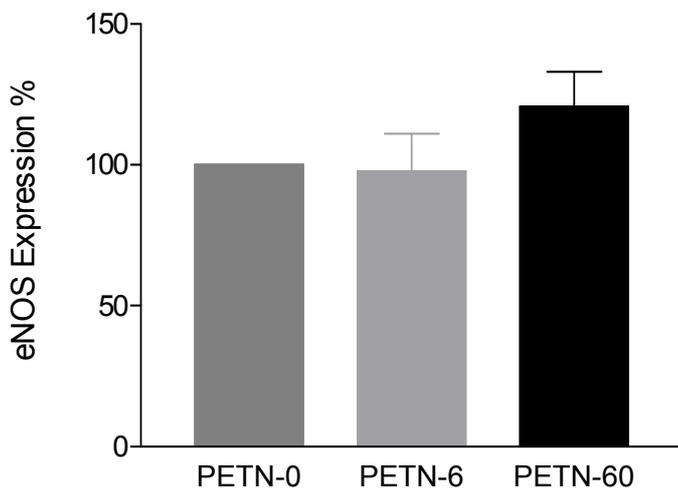


Abb. 22: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die eNOS-Expression im Herzen (n=9). Die eNOS Expression bleibt konstant. Weder organspezifische Effekte (Lunge oder Herz), noch die eingesetzte PETN Konzentration und damit die vorliegende vaskuläre Menge von NO verändern diesen Sachverhalt.

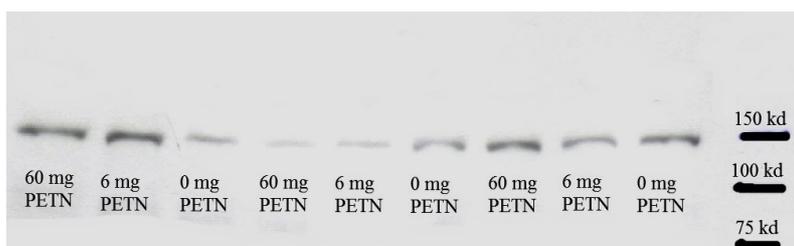


Abb. 23: Westernblot von eNOS Expression im Herzgewebe von PETN behandelten C57/B6 Mäusen. Aufgetragen sind Gewebeprobe von Mäusen die mit unterschiedlichen PETN Konzentration behandelt worden sind. Die PETN Konzentration betrug entweder 0 mg/kg KG/Tag , 6 mg /kg/d oder 60 mg/kg KG/Tag .

In Abbildung 23 ist die eNOS Expression in kardialem Gewebe unter Einfluss von unterschiedlich hohen PETN Konzentrationen dargestellt. Die Expressionsrate von eNOS ist sowohl unter Einfluss von 6 mg PETN als auch unter 60 mg PETN vergleichbar mit der Negativkontrolle. Weder im kardialen noch im pulmonalen Gewebe läßt sich eine Abhängigkeit der eNOS Expression zur eingesetzten PETN Konzentration nachweisen.

3.5 B2 Expression in L-NA behandelten eNOSⁿ / eNOS⁺⁺ Mäusen

In mit L-NA behandelten eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ Mäusen konnte weder im pulmonalem noch in kardialen Gewebe eine signifikant veränderte B2 Expression nach L-NA Behandlung dokumentiert werden. Die akute pharmakologische Hemmung der eNOS durch die Behandlung mit L-NA führt also nicht kompensatorisch zu einer erhöhten B2 Expression. Und wie die Experimente mit eNOS Knockout Mäusen im weiteren Verlauf zeigten, gibt es auch keinen Unterschied zwischen einer pharmakologischen Hemmung und einem genetischen Knockout. Beim genetischen Knockout wird allerdings lediglich die eNOS nicht exprimiert, die Expression der Isoformen nNOS und iNOS bleibt unverändert. Trotzdem ließen sich die gleichen Resultate erzielen, da nur die eNOS für die vaskuläre NO Generation eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

In Abbildung 24 wird die B2 Expression zwischen eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ Mäusen, die mit L-NA behandelt wurden, verglichen. Die B2 Expression bleibt konstant, die pharmakologische Hemmung aller NO Synthesen und somit auch die deutlich reduzierte bis aufgehobene Menge von vaskulärem NO beeinflussen den B2 nicht. Eine Interaktion liegt daher nicht vor.

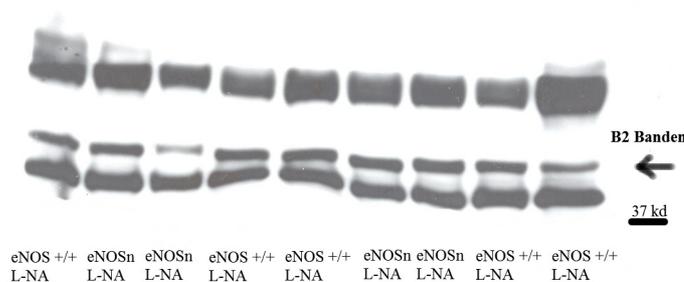


Abb. 24: Exemplarischer Blot für Lungengewebe. Alternierend wurden Proben von eNOS⁺⁺ und eNOSⁿ Mäusen aufgetragen. Im Vergleich zu den eNOSⁿ Mäusen liegt in den eNOS⁺⁺ Mäusen eine 3,3 fach höhere eNOS Expression vor. Dadurch haben eNOS⁺⁺ Mäuse einen erhöhten vaskulären NO Spiegel in vivo. Ein Einfluss von NO auf B2 konnte aber trotz erhöhtem NO Spiegel nicht dokumentiert werden.

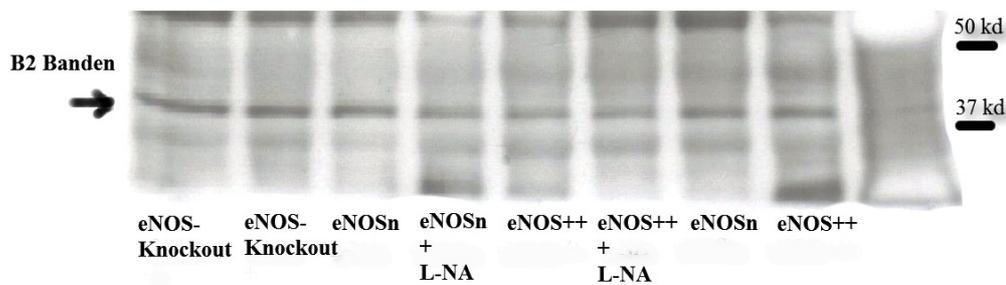


Abb. 25: Exemplarischer Blot für Herzgewebe. Aufgetragen sind Proben von mit und ohne L-NA behandelte $eNOS^{++}$, $eNOS^n$ und $eNOS$ Knockout Mäuse.

In Abbildung 25 wurden kardiale Gewebeproben von $eNOS$ -Knockout-Mäusen, mit und ohne L-NA behandelte $eNOS^{++}$ - und $eNOS^n$ -Mäuse aufgetragen. Auf diese Weise konnte die pharmakologische Hemmung mit dem genetischen Knockout der $eNOS$ innerhalb der verschiedenen Tierlinien direkt verglichen werden. Die B2-Expression änderte sich in keinem der untersuchten Fälle.

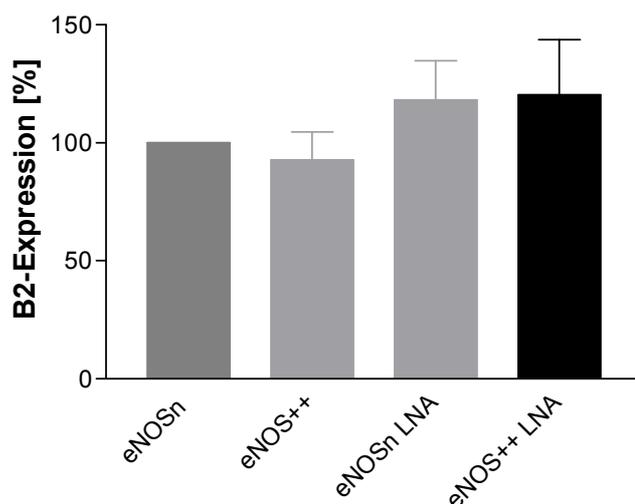


Abb. 26: Zusammenfassung der bisher dargestellten Effekte auf die B2 Expression im Herzen von $eNOS^n$ und $eNOS^{++}$ Mäusen mit und ohne L-NA Behandlung.

Zusammenfassend lässt sich im kardialen Gewebe für keine der unterschiedlichen Versuchsbedingungen und der verwendeten Tierlinien eine veränderte B2 Expression nachweisen. Das Vorhandensein oder die Abwesenheit von NO beeinflussen die B2 Expression nicht.

In Abbildung 26 wird die B2 Expression von $eNOS^n$ und $eNOS^{++}$ Mäusen mit und ohne L-NA Behandlung verglichen. Es wird deutlich, dass die B2 Expression unter allen gewählten Versuchsbedingungen konstant blieb. Die pharmakologische Hemmung durch die L-NA Behandlung ändert die B2 Expression nicht. Das gleiche Ergebnis zeigen auch die $eNOS$ Knockout Mäuse, der genetische Knockout der $eNOS$ und das damit dauerhaft fehlende

endotheliale NO hat ebenfalls keinen Einfluss auf die B2 Expression. Folglich scheint es auch keinen Unterschied zwischen den beiden Formen der Hemmung zu geben.

3.6. B2 Expression in L-NA behandelten PAEC-Zellen

Um den Einfluss von NO auf die B2 Expression in PAEC zu untersuchen, unterzogen wir auch diese einer pharmakologischen Hemmung und blockierten die NO Synthesen mit L-NA. Die Inkubationszeiträume mit dem L-NA lagen bei 1-6 h. Verglichen wurden die erzielten Ergebnisse mit unbehandelten PAEC. In Abbildung 27 und Abbildung 28 sind die Ergebnisse graphisch als Balkendiagramm und exemplarischer Western Blot dargestellt.

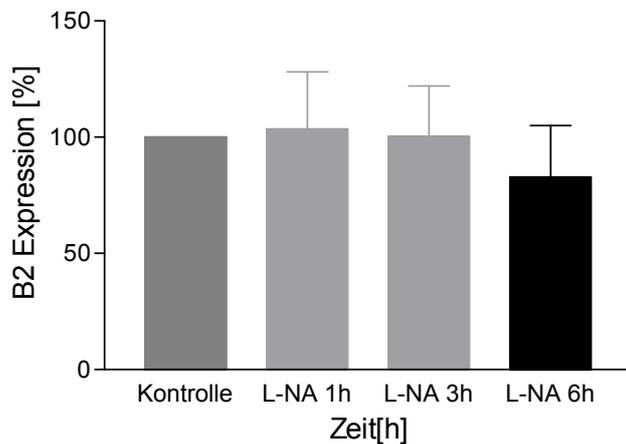
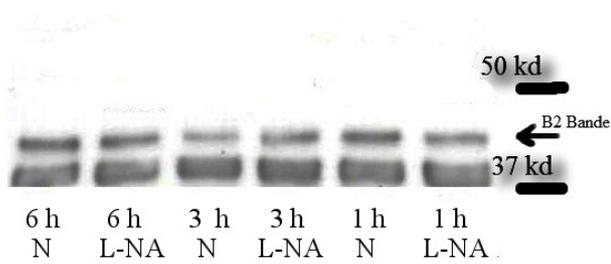


Abb. 27: Effekt einer L-NA Inkubation auf die Expression des B2 in PAEC.

Aufgetragen sind PAEC die mit 1 mM L-NA jeweils für 1 h, 3 h oder 6 h inkubiert wurden. Die Kontrolle für den jeweiligen Inkubationszeitraum waren ohne L-NA behandelte PAEC. Bei diesem Versuchsaufbau handelt es sich um eine pharmakologischen Hemmung. Das L-NA blockiert unselektiv alle NO Synthesen.

Unabhängig von der Expositionsdauer zum L-NA lässt sich keine signifikant veränderte B2 Expression zeigen. Lediglich nach einer 6 stündigen L-NA Inkubation lässt sich eine reduzierte B2 Expression dokumentieren. Im t-Test zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung.



N = Negativkontrolle, nur mit Medium inkubierte PAEC

Abb. 28: Westernblot der B2 Expression in PAEC nach L-NA Inkubation.

Aufgetragen sind PAEC, die über die Inkubationszeiträume 1-6 h einer NO Synthasen Blockade durch L-NA unterzogen wurden. Als Negativkontrolle dienten mit Medium inkubierte PAEC. Am rechten Bildrand sieht man den nachgezeichneten Größenmarker. Bei circa 42 kd befindet sich die B2 Bande.

Unabhängig von der Dauer der jeweiligen L-NA-Inkubation zeigte sich im Westenblot kein Unterschied der B2 Expression zwischen den mit L-NA behandelten und nicht behandelten Zellen (Abbildung 28). Die Blockade der NO Synthasen und die damit reduzierte bis aufgehobene Verfügbarkeit von NO nimmt keinen Einfluss auf die B2 Expression.

3.7. eNOS- Expression in L-NA inkubierten PAEC-Zellen

Auch die eNOS Expression unter Blockade mit L-NA als NOS Inhibitor wurde untersucht. Wir wählten Inkubationszeiträume von 1-6 h, um eine genügend lange Inhibitionsdauer zu erzeugen. So konnten wir sicherstellen, dass die eNOS in ihrer Funktion auch tatsächlich gehemmt wurde. In Abbildung 29 ist der Effekt der eNOS Blockade durch das L-NA als Balkendiagramm dargestellt. Abbildung 30 zeigt einen exemplarischen Westernblot aus der Versuchsreihe, aus dem Daten für das Balkendiagramm generiert wurden.

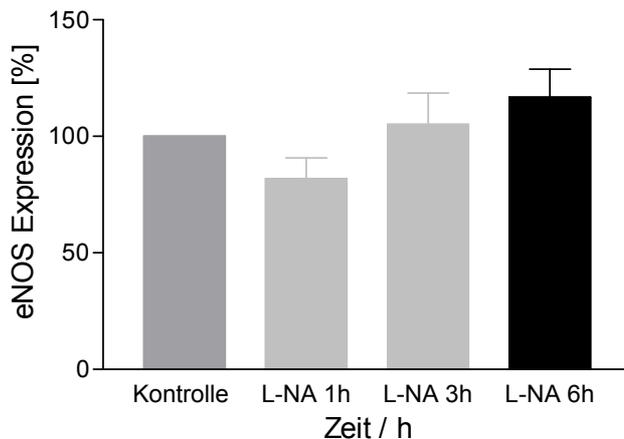
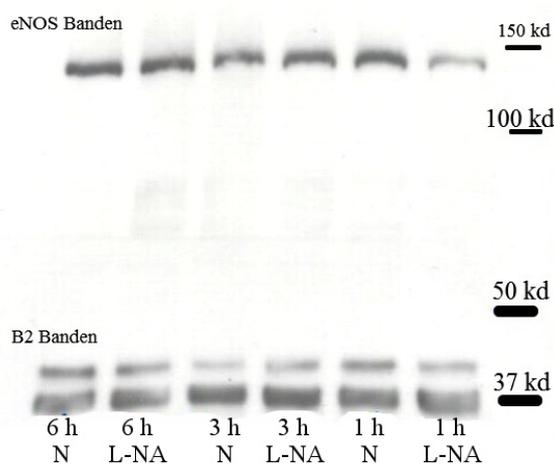


Abb. 29: Effekt einer L-NA Behandlung auf die Expression des eNOS in PAEC-Zellen (n = 8). Die Zellen wurden jeweils mit 1 mM L-NA über 1 h, 3 h oder 6 h inkubiert. Als Negativkontrollen dienten mit Medium behandelte Zellen.



N= Negativkontrolle, nur mit Medium inkubierte PAEC

Abb. 30: Darstellung der B2 Banden und eNOS- Banden für PAEC-Zellen. Nach dem Western Blot wurde die Membrane in Höhe von 75 kd in zwei Hälften geteilt und entsprechend den angegebenen Protokollen mit dem jeweiligen Antikörpern inkubiert. Gegeneinander aufgetragen sind jeweils die positiven und negativen Kontrollen der entsprechenden L-NA Inkubationszeiten.

Die eNOS-Expression änderte sich unabhängig von der Inkubationsdauer nicht signifikant. Eine kompensatorisch erhöhte Translationsrate und Stabilisierung der verbliebenen eNOS m-RNA nach der Blockade durch das L-NA nach 3 h und nach 6 h scheint theoretisch als Kompensationsmechanismus denkbar zu sein (siehe Abb. 29). Im Rahmen dieser Promotion wurde dies allerdings nicht näher untersucht. Unabhängig von der Dauer der jeweiligen L-NA-Inkubation zeigt sich auch für die B2 Expression keine Änderung (Abb.30).

3.8. B2 Expression in SNAP inkubierten PAEC-Zellen

Um den Einfluss von NO auf die B2 Expression in PAEC-Zellen zu untersuchen, wurden u.a. Zellkulturexperimente entworfen, in denen die Zellen entweder mit den NO-Donator SNAP oder DETA/NO über unterschiedlich lange Zeiträume behandelt wurden. Der jeweilige NO Donor wurde direkt dem Medium hinzu gefügt (siehe Kap. 4.4.2. und 4.4.3.). So konnten deutlich erhöhte NO Spiegeln in den Versuchen erzielt werden und ein ggf. vorhandener Einfluss von NO auf den B2 hätte sichtbar werden müssen. Die Halbwertszeit von SNAP beträgt bei pH Werten zwischen 6-8 und einer Temperatur von 37°C circa sechs Stunden. Es wurde also während der Inkubationsintervalle (1-6 h) auch ausreichend NO durch SNAP freigesetzt. DETA/NO ist ein NO Donor, der zwei Moleküle NO freisetzt und der pH abhängig dissoziiert. Die Halbwertszeit von DETA/NO beträgt bei 37°C und einem pH von 7,4 circa 20 und 56 Stunden. Es wurde also auch hier während der Inkubationsintervalle (1-6 h) garantiert ausreichend NO durch DETA/NO freigesetzt. Eine ungenügende NO Liberation durch die NO Donatoren kann somit ausgeschlossen werden.

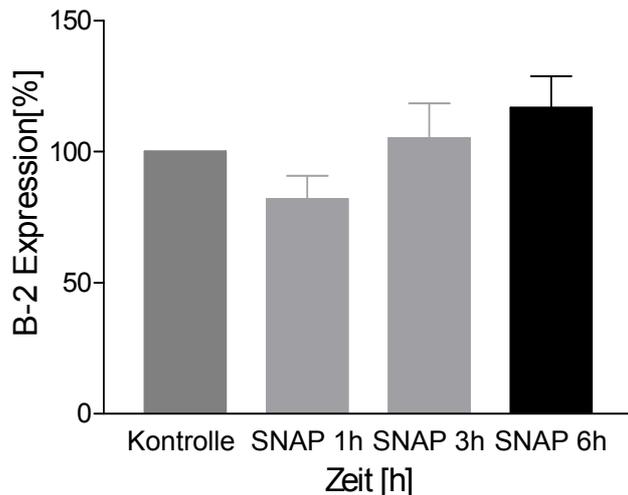
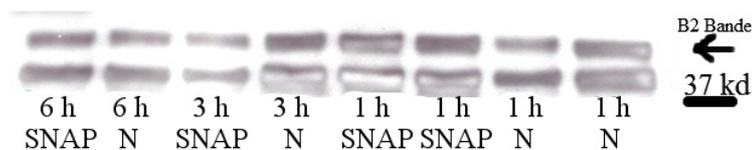


Abb. 31: Effekt einer SNAP-Inkubation (10 μ M) auf die Expression des B2 in PAEC-Zellen (n = 11). Die porvinen Aortenendothelzellen (PAEC) wurden jeweils mit der gleichen Konzentration SNAP über einen Zeitraum von 1-6 h behandelt. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden.

Die Abbildung 31 zeigt die B2 Expressionsrate unter dem Einfluss von SNAP als NO Donor über die Inkubationszeiträume 1-6 h. Eine Veränderung der B2 Expression lässt sich nicht feststellen. Nach einem Inkubationsintervall von 3 bzw. 6 h kommt es lediglich zu einem leichten Anstieg der B2 Expression.

Die Abbildung 32 zeigt einen exemplarischen Western Blot aus der Versuchsreihe.



N= Negativkontrolle, nur mit Medium inkubierte PAEC

Abb. 32: Darstellung der B2 Banden PAEC-Zellen nach SNAP-Inkubation im Westernblot. Aufgetragen wurden die jeweiligen Inkubationsintervalle mit SNAP im direkten Vergleich zu ihrer Negativkontrolle. Am rechten Bildrand befindet sich der Größenstandard. Dieser wurde zur besseren Darstellung gesondert markiert. Die obere der beiden Banden stellt die B2 Bande (42kd) dar.

Unabhängig von der Anwesenheit des NO Donors SNAP und der damit konsekutiv erhöhten NO Menge, zeigte sich keine Änderung der B2 Expression. Auch die Inkubationsdauer und die damit unterschiedliche Expositionsdauer zum NO nimmt keinen Einfluss auf die B2 Expression.

3.9. eNOS Expression in SNAP inkubierten PAEC

Um einen möglichen Einfluss von NO auf die eNOS Expression zu untersuchen, wurden die PAEC mit SNAP als NO-Donor über unterschiedliche Inkubationsintervalle behandelt und die eNOS Expression mit einem Westernblot überprüft. Durch die Behandlung mit SNAP standen in den Versuchen hohe Mengen von NO zur Verfügung. Ein Einfluss von NO auf die eNOS wäre so gut sichtbar geworden. Außerdem konnte sichergestellt werden, dass ein ausbleibender Effekt nicht auf zu niedrige NO Dosen zurückgeführt werden konnte, da durch SNAP als NO Donor hohe Mengen von exogen zugeführtem NO vorlagen.

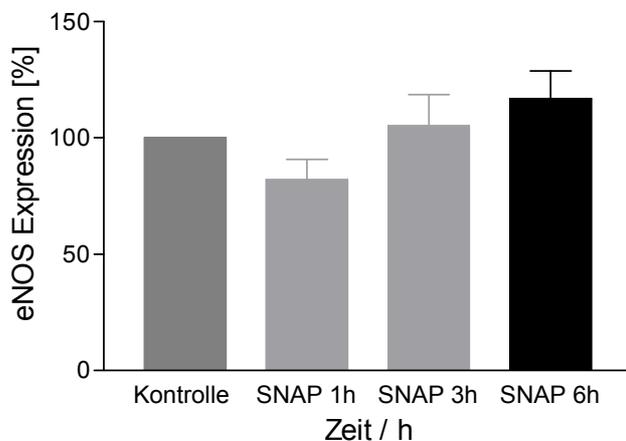


Abb. 33: Effekt einer SNAP-Inkubation (10 μ M) auf die Expression der eNOS in PAEC

(n=11). Die Zellen wurden über 1-6 h mit SNAP behandelt und damit einem erhöhten NO Spiegel ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Medium ohne SNAP-Zugabe behandelt wurden.

In Abbildung 33 ist die Expression der eNOS in Abhängigkeit zur jeweiligen Inkubationsdauer mit SNAP dargestellt. Zu erkennen ist keine Änderung der eNOS Expression. Diese bleibt über den gewählten Zeitraum von bis zu 6 h vergleichbar mit der Negativkontrolle. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h lässt sich eine leicht reduzierte eNOS Expression, möglicherweise im Rahmen einer Herabregulation der Transkriptions-u./o. Translationsrate, detekMäusen. Die eNOS Expression betrug für die Kontrolle 100 % \pm 0 %, SNAP 1 h 82 % \pm 29,4 %, SNAP 3 h 105 % \pm 40,2 % und für SNAP 6 h 117 % \pm 38 %

Die Abbildung 34 stellt einen exemplarischen Western Blot aus der Versuchsreihe dar. Eine signifikante Veränderung der eNOS Expression ist unabhängig von der Inkubationsdauer nicht detektierbar.

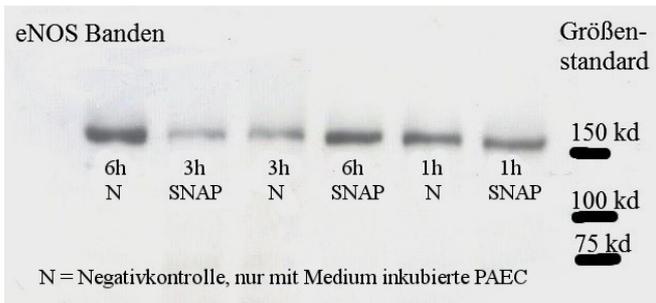


Abb. 34: Westernblot der eNOS Expression in PAEC nach SNAP-Inkubation. Dargestellt ist die eNOS Expression nach SNAP Behandlung der PAEC Zellen. Aufgetragen wurden die jeweiligen Inkubationsintervalle mit ihren entsprechenden Negativkontrollen. Am rechten Bildrand befindet sich der Größenstandard (Marker). Dieser wurde zur besseren Darstellung gesondert markiert, weil man ihn teilweise im Scan nur schlecht erkennen konnte. Die eNOS Bande (135 kd) läuft fast auf Höhe der 150 kd Bande des Markers .

Abbildung 35 stellt die eNOS- und B2-Expression in PAEC nach L-NA- bzw. SNAP-Inkubation im direkten Vergleich in einem Westernblot dar. Weder das völlige Fehlen von NO (L-NA Behandlung) noch eine deutlich erhöhte NO Konzentration (SNAP) zeigen Einfluss auf die jeweiligen Expressionsraten. Ebensovienig wie die Inkubationsdauer.

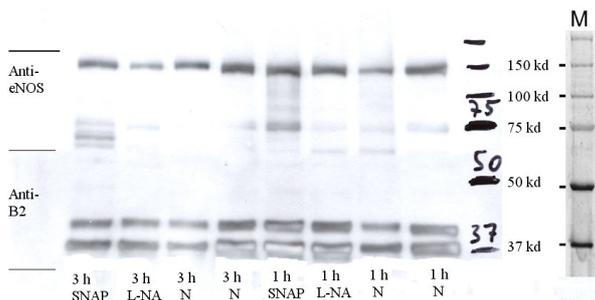


Abb. 35 eNOS- und B2-Expression in PAEC nach L-NA- bzw. SNAP-Inkubation im direkten Vergleich im Westernblot. Nach dem Blotting wurde die Membrane in Höhe von 75 kd in zwei Hälften geteilt und mit den entsprechenden Antikörpern (Anti-eNOS oder Anti-B2) inkubiert. Aufgetragen sind die jeweiligen Inkubationszeiträume mit SNAP, L-NA und die entsprechende Negativkontrolle. Am rechten Bildrand befindet sich der handschriftlich übertragene Größenstandard (M= Marker von Biorad, Precision plus Protein, All blue standards) . Dieser war teilweise nach dem Blotting auf der Membrane schlecht sichtbar. Daneben befindet sich ein exemplarisch hinzugefügter Größenstandard. So wird ersichtlich, dass die Größen auf der Membrane korrekt markiert wurden. Am linken Bildrand ist die Unterteilung der Membrane und die entsprechende Antikörperbehandlung dargestellt. Die B2 Bande befindet sich in Höhe von 42 kd und die eNOS Bande in Höhe von 135 kd.

3.10 Effekte der DETA/NO Inkubation auf die B2 Expression in PAEC-Zellen

Da viele Faktoren Einfluss auf die NO Dissoziation von SNAP haben, wie zum Beispiel die Pufferzusammensetzung, Zeit, Temperatur und der pH Wert, sollte ein chemisch anders aufgebauter NO-Donor getestet werden. Hierzu wurde DETA/NO für die nun folgenden Versuche verwendet. DETA/NO setzt im Gegensatz zu SNAP zwei Moleküle NO frei. Ein ausreichend hoher NO Spiegel ist daher als gesichert anzunehmen. In Abbildung 36 ist die B2 Expression als Balkendiagramm nach DETA/NO Behandlung für die jeweiligen Inkubationsintervalle (1-12 h) und der entsprechenden Negativkontrollen gegeneinander aufgetragen. Die Abbildung 37 zeigt einen exemplarischen Western Blot aus der Versuchsreihe.

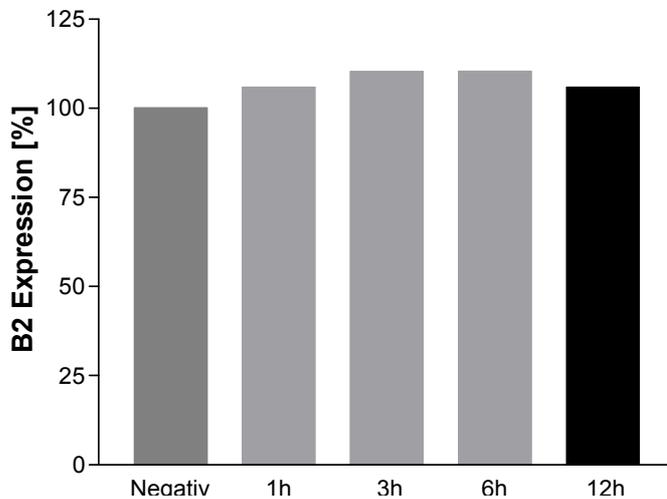


Abb. 36: B2 Expression nach Inkubationen von PAEC mit DETA/NO. Die Zellen wurden 1h, 3h, 6h bzw. 12h mit DETA/NO behandelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen die nur mit Medium behandelt wurden.

Die B2 Expression bleibt nach Behandlung mit dem NO Donor DETA/NO über die gewählten Inkubationszeiträume konstant. Auch ein langer Inkubationszeitraum von 12 h ändert die B2 Expression nicht.

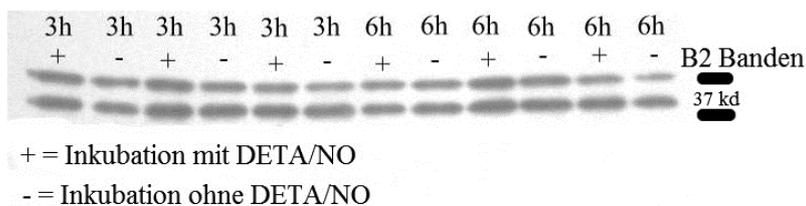


Abb. 37: Darstellung eines DETA/NO Westernblots mit PAEC (3h und 6h). Inkubiert wurden die Zellen jeweils über einen Zeitraum von 3 Stunden bzw. 6 Stunden. Das + stellt dabei eine DETA/NO Behandlung für den angegebenen Zeitraum dar. Das – ist die entsprechende Negativkontrolle.

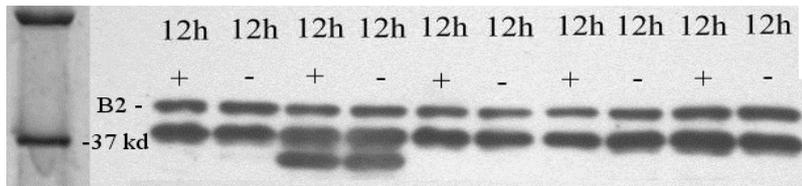


Abb. 38: Darstellung eines DETA/NO Westernblots mit PAEC (12h). Das – markiert die Negativkontrollen (PAEC nur mit Medium inkubiert). Das + steht für mit DETA/NO behandelte Zellen. Am linken Bildrand befindet sich exemplarisch der Größenstandard (BioRad, Precision™, All Blue Standards). Die B2 Bande befindet sich in Höhe von 42 kd.

Unabhängig vom gewählten Inkubationszeitraum lässt sich kein Effekte auf die B2 Expression dokumenMäusen. Sie bleibt konstant und ist vergleichbar mit der Expressionsrate der Negativkontrollen. Ein Einfluss von NO durch die Behandlung mit dem NO Donor DETA/NO wird im Rahmen dieser Versuchsreihe nicht sichtbar.

4. Diskussion

Die Regulation der B2 Expression ist bis dato nur unzureichend verstanden. So ist z.B. noch weitgehend unbekannt, ob sich die B2 Expression im Rahmen eines Feedback-Mechanismus, ähnlich wie bereits für das NO beschrieben, selbst regulieren kann und ob NO einen Einfluss darauf hat. In dieser Promotion sollte daher der Einfluss von NO auf die B2 Expression näher untersucht werden. Denn gerade im Rahmen einer antihypertensiven Therapie mit ACE Hemmern oder AT1 Blockern kommt es, über die verbesserte Endothelfunktion, zu einer gesteigerten eNOS Aktivität, so dass letztlich vermehrt NO gebildet wird. Gleichzeitig wird aber auch der Abbau des Bradykinins durch die Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) reduziert, so dass es zu einem erhöhten Bradykininspiegel und so gehäuft zur Ausbildung eines nicht allergischen Angioödemes kommen kann. Um die Zusammenhänge besser zu verstehen, untersuchten wir den Einfluss von NO auf Zellen und Gewebe verschiedener Spezies (porvine aortale Zellen, Zellen aus der humanen Nabelschnur und humane Tumorzellen in Vorversuchen, sowie Herz- und Lungengewebe von genetisch in ihrer eNOS Expression modifizierten (eNOS⁺⁺ und eNOS Knockout) und nicht modifizierten Mäusestämmen (eNOSⁿ und C57/Bl6)). Durch die verschieden angelegten Experimente konnten wir daher speziesspezifische und organspezifische Unterschiede weitgehend ausschließen.

4.1 Zellexperimente

Für unsere Zellexperimente wurden porcine aortale Endothelzellen eingesetzt und unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurde der Effekt von NO auf die endotheliale B2 Expression untersucht. Die Zellen wurden entweder mit NO Donatoren oder NO Inhibitoren behandelt. Als NO Donor diente DETA/NO oder SNAP und die Zellen wurden über die Inkubationszeiträume 1h, 3h, 6h und 12h inkubiert. Als Negativkontrolle dienten in allen Experimenten unbehandelte Zellen (nur mit Medium inkubiert). Wie die Versuche mit den NO Donatoren unter 5.10 zeigen, konnte unabhängig vom eingesetzten Donor keine NO Abhängigkeit der B2 Expression detektiert werden. Auch die Abwesenheit von NO durch die Hemmung der eNOS mit L-NA zeigte keinen signifikanten Effekt auf die B2 Expression. Untersucht wurden auch hier die Inkubationszeiträume 1h, 3h, 6h und 12h. Eine Abhängigkeit der B2 Expression zum Inkubationszeitraum konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (Kapitel 5.6).

Die gleichen Ergebnisse erhielten wir bei der Untersuchung der eNOS Expression unter dem Einfluss von NO. Die eNOS Expression wird, wie die B2 Expression, zum Beispiel durch exogen zugeführtes NO nicht beeinflusst. Das vermehrt vorliegende NO (durch die exogene NO Zufuhr) induziert keine messbare Herabregulation der eNOS Expression. Eine Steigerung des NO Angebotes hatte somit keinen Effekt auf die eNOS Expression. Auf den ersten Blick erstaunlich, da bis dato eine Feedback-Inhibition durch NO auf die eigene Generation postuliert wird (Ignarro L J, 1994 ; Suvorava T, Pick S, Kojda G, 2017). Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre eine reduzierte Transkriptions- oder Translationsrate der eNOS. Auch eine kürzere Halbwertszeit der eNOS mRNA ist denkbar. Die kompensatorische Herabregulation der nNOS und der iNOS, damit der NO Spiegel unter dem Einfluss von exogenem NO konstant bleibt, ist unwahrscheinlich, da die nNOS nur in neuronalem Gewebe vorhanden ist und die iNOS lediglich in Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und neutrophilen Granulocyten induzierbar ist. Ferner würden die produzierten NO Mengen durch die beiden NO Synthesen nicht ausreichen, um die Funktion der eNOS zu ersetzen. Dies konnte bereits in den Versuchen mit eNOS-Knockout Mäusen im Vorfeld gezeigt werden (s. Kapitel 3.5).

Auch die Behandlung der Zellen mit einem NO Inhibitor (L-NA) zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die eNOS Expression. Inkubiert wurden die Zellen jeweils über den Zeitraum 1h, 3h und 6h. In keinem Inkubationsintervall lässt sich eine signifikante Veränderung der eNOS Expression als Folge der pharmakologischen Hemmung dokumentieren. Der detektierte Anstieg der eNOS Expression für die Inkubationszeiträume 3h und 6h in Abbildung 29 erklärt

sich am ehesten durch eine erhöhte Translationsrate der noch verbliebenen eNOS mRNA (Hobbs A J, Fukuto J M and Ignarro L J, 1994).

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Zellversuche auch in vivo reproduzierbar sind, führten wir ergänzend Versuche mit genetisch in ihrer eNOS Expression modifizierten Mäusestämmen durch. Die Mäuse erhielten, analog zu den Zellversuchen, entweder einen NO Donor (PETN) oder einen NO Inhibitor (L-NA). Uns interessierte auch, ob es zwischen einer pharmakologischen Hemmung der eNOS (durch L-NA) und dem genetischen Knockout (eNOS Knockout Mäuse) unterschiedliche Kompensationsmechanismen in der fehlenden endothelialen NO Generation gibt.

4.2 Ergebnisse der Mäuseexperimente

4.2.1 eNOSⁿ und eNOS⁺⁺ Mäuse

Für unsere in vivo Versuche wurde unter anderem ein transgener Mäusestamm (eNOS⁺⁺) eingesetzt, dessen endotheliale eNOS-Expression 3,3-fach höher ist als in nicht transgenen Mäusen und der dadurch eine deutlich erhöhte vaskuläre Verfügbarkeit von NO hat (Oppermann M, et al. 2011; Suvorova T, et al. 2005). Diese Tierlinie eignete sich daher sehr gut, um die möglicherweise vorhandenen Effekte von NO auf die Expression des B2 besser darstellen zu können. Bestimmt wurde die B2 Expression für die Organsysteme Lunge, Herz und Aorta (Aorta in Vorversuchen und nicht im Rahmen dieser Promotion) (Oppermann M, et al., 2009). Es konnte zwischen den eNOS⁺⁺ und eNOSⁿ Mäusen aber weder für die Lunge (124,6±28,4%), noch für das Herz (114,5±18,1%) ein signifikanter Unterschied in der B2 Expression dokumentiert werden. Ein Einfluss von NO auf die Expression des B2 in vivo ist nicht wahrscheinlich. Da aber eine 3,3-fach höhere eNOS Expression ggf. nicht ausreichend hohe NO Spiegel generiert, um Effekte die von NO auf die B2 Expression sichtbar zu machen, wurden ergänzende Versuche mit dem NO Donator PETN durchgeführt (Versuche 5.3 und 5.4). Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von PETN getestet (0mg, 6mg, 60 mg). Das Vorhandensein ausreichend hoher Plasmaspiegel von PETN bzw. dessen Metabolite PEDN und PEMN, wurde vor dem Einsatz der Mäuse in den Versuchen überprüft (Oppermann M, et al., 2009). Eine veränderte B2 Expression unter dem Einfluss eines erhöhten vaskulären NO Angebotes konnte aber nicht dokumentiert werden.

4.2.2 L-NA Behandlung:

Das L-NA wurde als Inhibitor aller NO Synthesen eingesetzt, es blockiert die endogene NO Produktion vollständig und erzeugt so die pharmakologische Hemmung der eNOS. Die endotheliale NO Produktion kommt vollständig zum Erliegen. Eine Kompensation durch den B2 wäre denkbar gewesen, denn eine Aktivierung des B2 führt ebenfalls u.a. zur NO Produktion.

Uns interessierte im Rahmen der L-NA Experimente auch, ob es einen Unterschied im Kompensationsmechanismus zwischen einem akuten pharmakologischen versus permanenten genetischen Knockout gibt. Zusätzlich wollten wir untersuchen, ob die B2 Expression in eNOS Knockout Mäusen, durch den genetischen Verlust der eNOS, verändert ist. Bradykinin ist ein potenter Vasodilatator und wäre es denkbar gewesen, dass bei fehlender vaskulärer NO Generation durch die eNOS, die vasodilatorische Funktion durch das Bradykinin bzw. über die NO Generation durch Bradykinin übernommen werden kann.

Die gestellten Fragen können aber vollständig negiert werden. Zwischen einer pharmakologischen Hemmung und dem genetischen Knockout gibt es keine Unterschiede im B2 Expressionsmuster (siehe Versuche 5.2 und 5.5). In L-NA behandelten eNOSⁿ und in genetisch nicht veränderten C57/Bl6 Mäusen konnte ebenfalls keine Veränderung der B2 Expression für die Lunge ($24,0 \pm 9,5\%$, $p < 0,01$) und das Herz gezeigt werden. Exakt die gleichen Ergebnisse (Abb.24, Abb.25, Abb.26) erhielt man in Versuchen mit L-NA behandelten eNOS⁺⁺ Mäusen. In eNOS⁺⁺ Mäusen liegt eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO vor, die Hemmung der eNOS durch das L-NA hätte daher messbare Effekte auf die B2 Expression zeigen müssen, wenn es denn eine Interaktion zwischen NO und B2 geben würde. Es kam aber in keinem der untersuchten Fälle zu einer veränderten B2 Expression, somit ist eine Interaktion des NO mit dem B2 auszuschließen.

4.2.3 PETN / NO-Donor Behandlung:

In den mit PETN behandelten Mäusen kam es unabhängig von der eingesetzten PETN-Konzentration weder in der Lunge noch im Herzen zu einer signifikanten Veränderung der B2 Expression. Eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO (durch das über PETN exogen zugeführte NO) verändert in beiden Organsystemen die B2 Expression nicht (siehe Abb. 16 und Abb. 18). Es läßt sich daher ableiten, dass es keine Interaktion zwischen dem NO und B2 gibt. Denn der deutlich erhöhte vaskuläre NO Spiegel beeinflusst die B2 Expression nicht. Auch die Dauer der erhöht vorliegenden NO Spiegel ändern diese Tatsache nicht. In eNOS⁺⁺ Mäusen liegen zum Beispiel dauerhaft erhöhte NO Spiegel vor. Ob es sich um endogenes NO (eNOS⁺⁺) oder

exogenes NO (PETN) handelt ist ebenfalls unerheblich.

4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse

Alle eingesetzten Mäusestämme wurden u.a. mit L-NA als unselektivem NOS-Inhibitor behandelt und dadurch einer akuten pharmakologischen Hemmung der eNOS unterzogen. Unter diesen Bedingungen konnte überprüft werden, ob das Ausschalten der endogenen NO Produktion kompensatorisch zu einer veränderten B2 Expression führt. Bei fehlender eNOS Aktivität, wäre z.B. eine Hochregulation des B2 theoretisch denkbar, da Bradykinin ebenfalls NO generieren kann und somit auch vasodilierend wirkt. Bradykinin hätte somit theoretisch die fehlende NO Generation nach Blockade der eNOS durch das L-NA kompensieren können. Eine beobachtbar erhöhte B2 Expression wäre die Folge eines solchen Kompensationsmechanismus gewesen. Die B2 Expression blieb aber unverändert, ein Kompensationsmechanismus findet daher folglich nicht statt. Auch die pharmakologische NO-Substitution mit einem resultierenden Überangebot von vaskulär zur Verfügung stehendem NO durch PETN, DETA/NO oder SNAP veränderte die B2 Expression nicht. Dies untermauert erneut, dass es zwischen NO und B2 keine Interaktion gibt. Auch in eNOS⁺⁺ Mäusen mit einer genetisch bedingt 3,3-fach höheren aortalen eNOS Expression, konnte kein Zusammenhang zwischen NO und der B2 Expression dokumentiert werden. In diesen Mäusen liegt ein dauerhaft erhöhter vaskulärer NO Spiegel vor und würde es eine Interaktion zwischen NO und Bradykinin geben, so hätte sich gerade hier dies im Expressionsmuster des B2 zeigen müssen. Tatsächlich ist aber auch hier die B2 Expression konstant. Gleiches gilt für die Experimente mit den anderen Tierlinien (C57BL/6, eNOSⁿ, eNOS Knockout). Auch hier konnte übereinstimmend keine NO-Abhängigkeit der B2 Expression gezeigt werden. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass NO unter keinen Umständen direkt Einfluss auf die B2 Expression nimmt. Würde NO einen Einfluss auf die B2 Expression ausüben, dann hätte dies in den unterschiedlich angelegten Experimenten manifest werden müssen. Auch die ebenfalls untersuchte eNOS Expression blieb sowohl in den in vivo als auch in den in vitro Experimenten konstant und untermauert damit ebenfalls die fehlende Interaktion zwischen NO und dem B2. In geringer Menge kann NO noch zusätzlich durch die Isoformen nNOS und iNOS generiert werden (Buga, G. M., et.al., 1993). Diese beiden Isoformen der NO-Synthasen wurden allerdings im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht. Es wäre interessant zu überprüfen, ob ein Überangebot von NO auch eine kompensatorische Herabregulation der Isoformen bewirkt oder sich nur die Translationsraten u./o. die Stabilität der eNOS mRNA verändert (Hobbs A J, Fukuto J M and Ignarro L J, 1994).

Um die Effekte von NO auf die B2 Expression zu untersuchen, wurde bereits in Vorversuchen

auch der NO-Donor PETN eingesetzt. Eine ausreichend erhöhte Bioverfügbarkeit von NO war während unserer Experimente sicher gewährleistet (Oppermann M et al., 2008), da der NO Gehalt bzw. die Metabolite des PETN (PEDN und PEMN) im Plasma der Mäuse kontrolliert wurden. Ein zu niedriger NO Spiegel, durch eine zu niedrig gewählte PETN-Dosis, kommt also als Fehlerquelle für die erzielten Ergebnisse nicht in Frage. Und auch die erhobenen Daten der eNOS⁺⁺ Versuche legen kongruent zu den PETN Versuchen nahe, dass NO keinen Einfluss auf die Expression des B2 hat. Das Überangebot von NO ändert die B2 Expression nicht. Dieser Sachverhalt zeigte sich deckungsgleich in den untersuchten Organsystemen Herz, Lunge und Aorta, so dass auch organspezifische Effekte keine bedeutende Rolle spielen. Der durchgeführte Vergleich zwischen dem so genannten Hochdrucksystem (Herz) und dem Niederdrucksystem (Lunge) des Kreislaufes war interessant, weil diese Systeme unterschiedliche Aufgaben und Funktionen erfüllen. Das Niederdrucksystem des Kreislaufs besteht aus dem Lungenkreislauf, den Venen, dem Kapillarbett und dem rechten Herzen. In diesem System herrschen Blutdruckwerte zwischen 0-15 mmHg und die Hauptaufgabe des Niederdrucksystems ist die Zwischenspeicherung von Blut (venöses Pooling). Dies wird über die entsprechende Dehnbarkeit der Gefäße erreicht. Kommt es beispielsweise zu einem akuten Blutverlust, wird das im Niederdrucksystem gepoolte Blutvolumen dem Kreislauf wieder zur Verfügung gestellt und sichert damit den für die Perfusion notwendigen Blutdruck. Um dieser Aufgabe entsprechen zu können, ist die Fähigkeit zur Vasodilatation der Gefäße essentiell. Das NO die Vasodilatation in Gefäßen bewirkt ist mittlerweile ein anerkanntes Faktum. Umso interessanter war daher die Frage, ob diese Funktion in Abwesenheit von NO, z.B. durch einen genetischen Knockout oder die pharmakologische Inhibition der eNOS, von Bradykinin übernommen werden kann. Und da die Lunge am leichtesten bei einer Präparation zugänglich ist und ausreichend Untersuchungsmaterial liefert, wurde sie stellvertretend für das Niederdrucksystem ausgewählt und untersucht.

Das so genannte Hochdrucksystem des Kreislaufes besteht aus dem linken Herzen, sowie den Arterien. Der dort vorliegende Blutdruck liegt in Ruhe zwischen 70 und 120 mm Hg. In akuten Belastungssituationen kann der Blutdruck entsprechend bei Bedarf gesteigert werden. Die Hauptaufgabe des Hochdrucksystems ist u.a. die gesicherte Perfusion der Organe. Trotz der unterschiedlichen Aufgaben der beiden Systeme zeigt sich aber in der B2 Expression kein Unterschied. Auch hier ist die B2-Expression unabhängig von NO, denn auch hier spielt die eingesetzte NO-Konzentration und die Expositionsdauer zum NO keine Rolle. Um dies auch als gesichert annehmen zu können, wurden bewusst sehr hohe NO-Konzentrationen und lange Expositionszeiträume zum NO gewählt. So wurden z.B. die NO-Donatoren DETA/NO und SNAP in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt, wodurch in den Zellen eine Konzentration von circa 30 µM NO erreicht wurde (Patzner et al., 1998). Dies entspricht ungefähr einer 1000 x höheren NO-Konzentration, als sie in vivo im Steady State überhaupt

erreicht werden kann (Vallance et al., 1995). Selbst diese hohen NO-Konzentrationen zeigten keinen Effekt auf die B2 Expression in Lunge, Herz, Aorta und PAEC. Ein gewebespezifischer und speziesspezifischer Effekt darf daher ausgeschlossen werden.

Initial wurde in den Versuchen mit den eNOS Knockout Mäusen fälschlicherweise ein Artefakt in Höhe der B2 Bande (42 kD) durch den eingesetzten Sekundärantikörper als erhöhte B2 Expression fehlinterpretiert. Es schien so zu sein, dass kompensatorisch für den Verlust der eNOS eine signifikante Hochregulation des B2 Rezeptors statt gefunden hätte. Dies wäre plausibel gewesen, wenn man bedenkt, dass möglicherweise der Prostacyclin-Weg und die NO Generation durch Bradykinin, neben der theoretisch denkbaren Kompensation durch die nNOS und iNOS, eine Rolle spielen könnte. Denn neben NO können auch Prostaglandine eine wichtige Mediatorfunktion ausüben und die Synthese von Prostacyclin ist mit einem Anstieg der Calciumkonzentration in den Endothelzellen verbunden. Beim Prostacyclin-Weg spaltet die Phospholipase A2 strikt calciumabhängig aus Phospholipiden der Zellmembran Arachidonsäure ab. Diese wird durch die Cyclooxygenase in Prostaglandin H₂ umwandelt, aus welcher die Prostaglandin I₂-Synthase die Bildung des vasodilatorischen Prostacyclins katalysiert. Prostacyclin bindet in den glatten Muskelzellen an den membranständigen G-Protein-gekoppelten IP-Rezeptor (Smyth and Fitz Gerald 2002). Über ein G-Protein wird jetzt die Adenylatcyclase aktiviert, die den zweiten wichtigen second messenger in glatten Muskelzellen, das zyklische Adenosin-5-Monophosphat (cAMP), synthetisiert. Das cAMP führt dann zur Aktivierung der Proteinkinase A, die ähnlich wie die cGK, über Phosphorylierungen unterschiedlicher Zielproteine eine Relaxation der glatten Muskelzelle bewirkt (Shaul et al., 1992).

Prostacyclin kann also eine vom sekundären Botenstoff cAMP unabhängige Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen durch Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanälen bewirken (Jackson et al., 1993; Jackson 1993) und somit zur Relaxation der glatten Gewäßwandmuskulatur führen, wodurch eine Vasodilatation möglich wird. Dieser theoretisch denkbare Kompensationsmechanismus scheint aber in den eNOS Knockout Mäusen keine Rolle zu spielen, da sich zwischenzeitlich durch weitere Experimente mit einem anderen Antikörper und der standardisierten Messung gegen Actin belegen ließ, dass der B2 Rezeptor seine Expression in eNOS Knockout Mäusen nicht verändert (Khosravani M, et al., 2015).

Hochregulationen des B2 konnten aber durchaus bereits schon dokumentiert werden. So weiß man z.B. das bei bestimmten genuinen Erkrankungen, wie dem angeborenen Angioödem, regelmäßig eine erhöhte B2-Expression detektiert werden kann (Kivity et al., 2010). Auch das ACE-Hemmer und AT I-Inhibitoren den Abbau von Bradykinin hemmen und so zur Manifestation eines nicht allergischen Angioödemes führen können ist bereits bekannt. Bei

dieser Angioödemform spielt das Bradykinin als auslösendes Agens eine entscheidende Rolle (Bas M et al., 2007). Es bewirkt als Mediator eine erhöhte Permeabilität der Gefäße und vor allem in den postkapillären Venolen eine Vasodilatation. Ausgelöst wird die Vasodilatation über die Bindung an B2 und normalerweise wird das dabei entstehende kurzlebige Nonapeptid (Halbwertszeit im Plasma circa 7 Sekunden) von spezifischen Metalloproteasen in Gewebe und Serum wieder abgebaut. In diesem Prozess sind auch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), die neutrale Endopeptidase (NEP), die Aminopeptidase (APP), und indirekt auch die Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) involviert.

Auch in vaskulären glatten Muskelzellen, pulmonalen Fibroblasten und in der Trachealmuskulatur von Ratten konnte bereits eine Hochregulation des B2 durch Interleukin 1 β (Schmidlin et al., 1998), Glucocorticoide (Scherrer et al., 1999), Tumornekrose Faktor α (Haddad et al., 2000), Glucose (Christopher et al., 2001), Östrogen (Madeddu et al., 1997) und plated derived growth factor (Dixon et al., 1996) gezeigt werden.

Die Hypoxie und die Applikation von Lovastatin bewirken ebenfalls eine gesteigerte B2 Expression (Liesmaa et al., 2009; Liesmaa et al., 2007). Als Erklärungsansatz wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, welche die untranslatierte 3'- und 5'-Region der B2 Gene, den Transkriptionsfaktor p53, KLF-4 und das cAMP response element binding protein (CREB) u./o. CREB-binding Protein beinhalteten. Interessanterweise tritt hier die Phosphorylierung von CREB in vaskulären glatten Muskelzellen nach der Stimulation mit NO-Donatoren auf und wird vermittelt durch die cGMP-abhängige Hemmung der Phosphodiesterase III, sowie die nachfolgende Erhöhung des cAMP (Steinbicker et al., 2011). Durch Nutzung eines Reportergenes konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des B2 mit Bradykinin die B2 Promotor Aktivität erhöht (Pesquero et al., 1996). Allerdings nimmt in transfizierten HEK 293 Zellen, die mit einem grünfluoreszierenden Protein markiert sind, nach prolongierter Stimulation mit einem nicht inaktivierbaren Bradykininrezeptoragonist die B2 Dichte wieder ab, weil der B2 Rezeptor im Rahmen einer Endocytose nach Überstimulation verstärkt sequestriert wird (Bawolak et al., 2009). In wie weit bei diesem Prozess zusätzlich noch eine verringerte Transkriptionsrate oder reduzierte mRNA-Stabilität eine weitere Rolle spielen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Da diese Vorgänge aber in den HEK 293 Zellen ohne die Anwesenheit von NO stattfinden (HEK 293 Zellen exprimieren keine eNOS), darf angenommen werden, dass NO keinen direkten Einfluß auf die B2 Expression ausübt (Schmidt et al., 2001).

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass das durch die B2 Aktivierung gebildete NO und Prostacyclin möglicherweise zu einer so genannten Signaling pathway Modulation der Genexpression des B2 führt (Busse and Fleming, 2003).

Die vielen Studien zum Bradykinin liefern also noch recht widersprüchliche Ergebnisse, so wurde z.B. beschrieben, dass abdominale Aortenringe von C57BL/6 Mäusen in Anwesenheit von Bradykinin konzentrationsabhängig verstärkt kontrahieren. Diese Kontraktionen lassen sich fast vollständig durch den Bradykininantagonisten Icatibant unterbinden (Felipe et al., 2007). Somit darf ein Einfluss des Bradykinins auf die Kontraktion angenommen werden. Nur widerspricht diese Beobachtung der bereits bekannten bradykininvermittelten Relaxation der glatten Muskulatur und der dadurch vermittelten Vasodilatation in der Aorta (Ding et al., 2002; Talikder et al., 2004).

Interessanterweise ist Diclofenac, als unselektiver Cyclooxygenase-Inhibitor, in der Lage die bradykininvermittelten Kontraktion vollständig zu unterbinden. Daher wäre denkbar, dass vom Endothel und der glatten Gefäßwandmuskulatur nach Stimulation durch Bradykinin ein Cyclooxygenase-Produkt freigesetzt wird, welches dann die Vasokonstriktion induziert. Vergleichbar wäre dies mit der bekannten Acetylcholinvermittelten Vasokonstriktion in aortalen Ringen bei Hamstern (Wong et al., 2009). Dies würde bedeuten, dass die Vasokonstriktion nicht direkt durch das Bradykinin ausgelöst wird, sondern durch ein Cyclooxygenase-Produkt und eine durch dieses Produkt initiierte Signalkettenkaskade. Bradykininvermittelte Vasokonstriktionen wurden auch in den von uns verwendeten eNOS Knockout Mäusen bereits beschrieben. Nach Stimulation mit Bradykinin fiel dort die Vasokonstriktion fast doppelt so hoch aus, so dass dieser Umstand eine funktionelle Relevanz des Bradykinins bei der Vasokonstriktion nahelegt. Möglicherweise ist die erhöhte Kontraktilität durch die fehlende eNOS und die dadurch reduzierte vaskuläre NO-Generation bedingt und es so zu einer reduzierten Fähigkeit zur Vasodilatation in den eNOS Knockout Mäusen kommt.

Zusammengefasst untermauern die Befunde stimmig, dass NO nicht in die Regulation und Expression des B2 involviert ist. Dann ist auch plausibel, warum Änderungen des vorliegenden vaskulären NO Angebotes keinerlei Effekt auf die B2 Expression ausüben.

Die erzielten Resultate unserer Experimente sollten zukünftig durch weitere Experimente ergänzt werden, z.B. könnten Westernblots mit anderen Organsystemen einen möglicherweise doch vorhandenen organspezifischen Effekt nachweisen. Die Tatsache das nicht nur das linke Herz, sondern auch das rechte Herz in den Experimenten verwendet wurden und somit keine exakte Trennung zwischen dem Hochdrucksystem und dem Niederdrucksystem stattfand, hatte eher keinen Einfluss auf die erzielten Resultate, da der Gewebeanteil des rechten Herzens am kardialen Gesamtvolumen vernachlässigt werden kann. Somit war der Vergleich des kompletten Herzens mit der Lunge, die komplett zum Niederdrucksystem gehört keine Fehlerquelle für fehlende organspezifische Effekte. Es wäre interessant

Widerstandsarterien, die einen entscheidenden Einfluss auf die Blutdruckregulation haben zu untersuchen. Auch die Untersuchung von Schleimhäuten wäre mehr als wichtig, denn gerade hier kommt es bei der Ausbildung von nicht allergischen Angioödemem zu einer ausgeprägten bradykininvermittelten Vasodilatation. Dabei wird durch Bradykinin NO generiert und es wäre interessant zu wissen, ob in den Zellen der Schleimhäute die NO-Generierung durch die eNOS beeinflusst wird. Denn dies würde bedeuten, dass Bradykinin doch einen Einfluss auf NO hat und dieser gewebespezifisch ist. Geradezu zwingend sollten Experimente mit B2-Knockout-Mäusen durchgeführt werden. Ließe sich in den B2-Knockout-Mäusen eine signifikante Veränderung der eNOS-Expression oder einer anderen NO-Synthase nachweisen, so wäre die Interaktion zwischen den beiden Mediatoren NO und Bradykinin nicht mehr auszuschließen.

Auch die Regulation des B2 unter dem Einfluss von Antagonisten sollte weiter untersucht werden. Dies ist für die Entwicklung von Medikamenten, die an den B2 binden und dadurch dessen Funktion und Wirkung modifizieren und damit für die Therapie des nicht allergischen Angioödemem weiterhin essentiell (Khosravani M, et al., 2015). Mit Icatibant steht bereits seit 2008 ein selektiver B2-Antagonist für die Behandlung des genuinen Angioödemem in Deutschland zur Verfügung. Icatibant ist ein Dekapeptid mit ähnlicher Struktur wie das Bradykinin. Es blockiert den B2-Rezeptor, so dass Bradykinin seine permeabilitätsfördernden und vasodilatierenden Effekte nicht mehr ausüben kann. Letztlich wird so die klinische Ausbildung des nicht allergischen Angioödemem verhindert. Zur Prophylaxe eines akuten Schubes bei bereits bekanntem hereditärem Angioödemem (HAE) steht seit circa 30 Jahren die Therapie mit Berinert® zur Verfügung. Berinert® ist ein C1-INH-Konzentrat aus Spenderblut. Es wird intravenös appliziert und ist in Deutschland Mittel der Wahl. Seit 2010 steht zudem mit Conestat alfa®, als rekombinantes C1-INH-Konzentrat, ein Präparat zur Verfügung für das kein Spenderplasma mehr benötigt wird. Ein weiterer klinisch zur Verfügung stehender Wirkstoff ist der rekombinante Kallikrein-Inhibitor Ecallantide, der die Biosynthese von Bradykinin reduziert. Als Nebenwirkung führt dieser durch die Hemmung des Faktors XII zu einer verlängerten aPPT-Zeit, die letztlich zu einer erhöhten Blutungsneigung führt. Insbesondere bei zeitgleicher Anwendung anderer Antikoagulantien ist hier erhöhte Vorsicht geboten und regelmäßige aPPT-Kontrollen sind zwingend notwendig. Historisch wurde bereits Danazol® zur Prophylaxe des hereditären Angioödemem seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts eingesetzt. Allerdings gibt es in Deutschland seit 2005 keine Danazol-haltigen Fertigarzneimittel mehr auf dem Markt, da der Hersteller aufgrund des ungünstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses der oralen Darreichungsform auf eine Nachzulassung verzichtet hatte (Quelle : <https://de.wikipedia.org/wiki/Danazol>).

Gerade im Hinblick auf die Therapie der Bradykinin-vermittelten nicht allergischen Angioödeme, die sich schnell zu einem akut lebensbedrohlichen Krankheitsbild entwickeln können, wäre es wünschenswert weitere schnell wirksame Medikamente zur Verfügung zu haben. Leider ist die Datenlage zum kompletten Mechanismus der B2 Expression aber zum aktuellen Zeitpunkt noch widersprüchlich und unzureichend. Es werden zwar fast täglich neue Erkenntnisse gewonnen, wie z.B. das es beim nicht allergischem Angioödem zu einer veränderten B2 Signalkette kommt (Bas M, et al., 2010), aber es sind bei weitem noch nicht alle beteiligten Mechanismen und Mediatoren bekannt.

Es lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt und in der Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse im Rahmen dieser Promotion aber postulieren, dass NO keinen direkten Effekt auf die B2 Expression ausübt. NO wird ständig im Endothel generiert und hat in seiner Summe vasoprotektive Eigenschaften, es spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation, indem es die Vasodilatation auslöst. Bradykinin führt zwar ebenfalls zur Vasodilatation, erhöht gleichzeitig aber auch die Gefäßpermeabilität. Es wirkt ähnlich wie Histamin und ist an Inflammationen, Algesie und der Ausbildung des nicht allergischen Angioödems beteiligt. Es fördert in der Summe seiner Wirkungen auch die Ausbildung und Progression der Arteriosklerose. Wenn nun NO kontinuierlich im Endothel gebildet wird und dabei, durch Interaktion mit dem B2, auch ständig Bradykinin generiert würde, wird plausibel warum NO keinen direkten Einfluss auf die B2 Expression haben sollte.

5. Anhang

5.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über B2-Rezeptor gekoppelte Mechanismen

Abb. 2: Exemplarische Eichgerade

Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Blot-Kammer

Abb. 4: Schema der Antikörper-Bindung und Peroxidase-Reaktion auf der Membran

Abb. 5: Beispiel einer Coomassie-Färbung

Abb. 6: Exemplarische Ponceau- Färbung

Abb. 7: Schritte während einer PCR

Abb. 8: PCR-Ergebnis transgen-positiver eNOS⁺- Mäuse

Abb. 9: Beispiel einer PCR zur Bestimmung des eNOS- Knockout-Genotyps

Abb. 10: Exemplarisches PCR-Beispiel einer Geschlechtsbestimmung

Abb. 11: Vergleich der B2 Expression in der Lunge zwischen eNOSⁿ und eNOS⁺ Mäusen

Abb. 12: Vergleich der pulmonalen B2 Expression zwischen zwischen eNOSⁿ und eNOS⁺ Mäusen

Abb. 13: Vergleich der kardialen B2 Expression von eNOSⁿ und eNOS⁺ Mäusen

Abb. 14: Vergleich der kardialen B2 Expression von eNOSⁿ und eNOS⁺ Mäusen im Westernblot

Abb. 15: Darstellung der IgG Bande in einer Coomassie Färbung eines SDS-Geles bei eNOS Knockout Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6

Abb. 16: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die B2 Expression in der Lunge

Abb. 17: Exemplarischer PETN-Westernblot für die Lunge

Abb. 18: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die B2 Expression im Herzen

Abb. 19: Exemplarischer PETN-Westernblot für das Herz

Abb. 20: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die eNOS Expression in der Lunge

Abb. 21: Westernblot von eNOS Expression im Lungengewebe von PETN behandelten C57/B6 Mäusen

Abb. 22: Einfluss verschiedener PETN Konzentrationen auf die eNOS-Expression im Herzen

Abb. 23: Westernblot von eNOS Expression im Herzgewebe von PETN behandelten C57/B6 Mäusen

Abb. 24: Exemplarischer Blot für Lungengewebe

Abb. 25: Exemplarischer Blot für Herzgewebe

Abb. 26: Zusammenfassung der bisher dargestellten Effekte auf die B2 Expression im Herzen von eNOSⁿ und eNOS⁺ Mäusen mit und ohne L-NA Behandlung

Abb. 27: Effekt einer L-NA Inkubation auf die Expression des B2 in PAEC

Abb. 28: Westernblot der B2 Expression in PAEC nach L-NA Inkubation

Abb. 29: Effekt einer L-NA Behandlung auf die Expression des eNOS-Rezeptors in PAEC-Zellen

Abb. 30: Darstellung der B2 Banden und eNOS- Banden für PAEC-Zellen

Abb. 31: Effekt einer SNAP-Inkubation (10 μ M) Inkubation auf die Expression des B2 in PAEC-Zellen

Abb. 32: Darstellung der B2 Banden PAEC-Zellen nach SNAP-Inkubation im Westernblot

Abb. 33: Effekt einer SNAP-Inkubation (10 μ M) auf die Expression der eNOS in PAEC

Abb. 34: Westernblot der eNOS Expression in PAEC nach SNAP-Inkubation

Abb. 35: eNOS- und B2-Expression in PAEC nach L-NA- bzw. SNAP-Inkubation im direkten Vergleich im Westernblot

Abb. 36: B2 Expression nach Inkubationen von PAEC mit DETA/NO

Abb. 37: Darstellung eines DETA/NO Westernblots mit PAEC

Abb. 38: Darstellung eines DETA/NO Westernblots mit PAEC

5. 2. Literaturverzeichnis

Abu-Soud H M, Wang J, Rousseau D L, Fukuto J M, Ignarro L J, and Stuehr D J. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. 1995. *J Biol Chem* 270: 22997-23006

Awolesi M A, Sessa W C, and Sumpio B E. Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells. 1995. *J Clin Invest* 96: 1449-1454

Bas M, Greve J, Stelter K, Bier H, Stark T, Hoffmann T K, Kojda G.

Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series. 2010. *Epub* 56(3):278-82

Bas M, Adams V, Suvorava T, Niehues T, Hoffman T K, Kojda G. Non-Allergic Angioedema. Rolle of bradykinin. 2015. *Allergy*, 62:842-853

Bas M, Greve J, Stelter K, Havel M, Strassen U, Rotter N, Veit J, Schossow B, Hapfelmeier A, Kehl V, Kojda G and Hoffmann T K, et al. A Randomized Trial of Icatibant in ACE-Inhibitor–Induced Angioedema. 2015. *N Engl J Med* ; 372:418-425.

Bas M, et al. Notfallsituation akutes Angioödem. *Dtsch Med Wochenschr.* 2010; 135: 1027-1031

Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. In: *Anal Biochem Bd* 72, S. 248-254

Bouloumie A, Schini-Kerth V B and Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. 1999. *Cardiovasc Res* 41: 773-780

Björkgvist J, de Maat S, Lewandrowski U, Di Gennaro A, Oschatz C, Schönig K, Nöthen M M, Drouet C, Braley H, Nolte M W, Sickmann A, Panousis C, Maas C, Renne T. Defective glycosylation of coagulation factor XII underlies hereditary angioedema type III. 2015. *J Clin Invest* 125(8) : 3132-46

Buga G M, Griscavage J M, Rogers N E and Ignarro L J. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. 1993. *Circ Res* 73: 808-812

Cicardi M, Banerji A, Bracho F, Malbrán A, Rosenkranz B, Riedl M, Bork K, Lumry W, Aberer W, Bier H, Bas M, Greve J, Hoffmann T K, Farkas H, Reshef A, Ritchie B, Yang W, Grabbe J, Kivity S, Kreuz W, Levy RJ, Luger T, Obtulowicz K, Schmid-Grendelmeier P, Bull

C, Sitkauskiene B, Smith W B, Toubi E, Werner S, Anné S, Björkander J, Bouillet L, Cillari E, Hurewitz D, Jacobson K W, Katelaris C H, Maurer M, Merk H, Bernstein J A, Feighery C, Floccard B, Gleich G, Hébert J, Kaatz M, Keith P, Kirkpatrick CH, Langton D, Martin L, Pichler C, Resnick D, Wombolt D, Fernández Romero DS, Zanichelli A, Arcoletto F, Knolle J, Kravec I, Dong L, Zimmermann J, Rosen K, Fan W T. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. 2010. *N Engl J Med* 5;363(6):532-41

Cohen R A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. 1995. *Prog Cardiovasc Dis* 38: 05-128

Compton S J, Jones C G.: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. 1985. In: *Anal Biochem* Bd 151, S. 369–374

Cosentino F and Katusic Z S. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide Synthase in coronary arteries. 1995. *Circulation* 91: 139-144

Davies K J, Delsignore M E and Lin S W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. 1987. *J Biol Chem.*262: 9902-9907

Davis M E, Grumbach I M, Fukai T, Cutchins A, & Harrison D G. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappa B binding. 2004. *J Biol Chem* 279, 163–168

Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P. Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. 2001. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, S. H2182–H2188

De Vriese A S, Verbeuren T J, Van de Voorde J, Lameire N H, Vanhoutte P M. Endothelial dysfunction in diabetes. 2000. *Br J Pharmacol* 130: 963- 974

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher A M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. 1999. *Nature* 399: 601-605

Förstermann U and Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. 2006. *Circulation* 113:1708-14

Fulton D, Gratton J P, McCabe T J, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke T F, Papapetropoulos A, and Sessa W C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. 1999. *Nature* 399: 597-601

Furchgott R F and Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. 1980. *Nature* 288: 373-376

Garcia-Cardena G, Fan R , Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, and Sessa W

C. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. 1998. *Nature* 392: 821-824

Gewaltig M T, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. 2002. *Cardiovasc Res*; 55: 250 – 260

Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E, and Mayer B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. 1992. *Biochem J* 281: 627-630

Hirata K, Kuroda R, Sakoda T, Katayama M, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, and Yokoyama M. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. 1995. *Hypertension* 25: 180-185

Huang P L, Huang Z, Mashimo H, Bloch K D, Moskowitz M A, Bevan J A & Fishman M C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. 1995. *Nature* 377:239-42

Hobbs A J, Fukuto J M and L J Ignarro. Formation of free nitric oxide from Larginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10992-10996

<https://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>

Ikawa T, Kakegawa A, Nagano T, Ando H, Yamakoshi Y, Tanabe T, Simmer J P, Hu C C, Fukae M, and Oida S. Porcine amelogenin is expressed from the X and Y chromosomes. 2005. *J Dent Res* 84, 144-148

Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem R, Inoue N, Venema R C, Sayegh H, Ohara Y, Murphy T, and Harrison D G. Molecular regulation of the endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor b-1. 1995. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1255-1261

Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa WC, Grozmann RJ. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. 2002. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G1074-1081

Khosravani M, Suvorava T, Dao V T, 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. 2014 Dec 24.

Kojda G and Harrison D G. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure.

1999. *Cardiovasc Res*, 43: 562-571

Kojda G, Bas M, et al., Nonallergic angioedema: role of bradykinin. 2007. *Allergy* 62 (8): 842-56 R

Kroll J and Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). 1998. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 743-746

Laufs U, La Fata V, Plutzky J, and Liao J K. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. 1998. *Circulation* 97: 1129-1135

Li H and Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. 2000. *J Pathol* 190:244-54

Liu J, Garcia-Cardena G, and Sessa W C. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. 1995. *Biochemistry* 34: 12333-12340

Mahmoudpour S H, Asselbergs F W, Terreehorst I, Souverein P C, De Boer A, Maitland-Van Der Zee A H. Continuation of angiotensin converting enzyme inhibitor therapy, in spite of occurrence of angioedema. 2015. *International Journal of Cardiology* 201:644–645

Mazumder B, Seshadri V and Fox P L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. 2003. *Trends Biochem Sci* 28:91-8

Moncada S and Higgs A. Mechanisms of disease. The L-arginine-nitric oxide pathway. 1993. *N.Engl.J.Med.* 329: 2002-2012

Meulemans A. Production of NA by endothelial NO-Synthase: an in vitro versus vivo study. 2005. *C R Biol* 328: 271-279

Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold H K, Fishman M C, and Huang P L. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. 1998. *J Clin Invest* 101: 1225-1232

Nathan C and Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. 1994. *J Biol Chem* 269: 13725-13728

Ohara Y, Sayegh H S, Yamin J J, and Harrison D G. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. 1995. *Hypertension* 25: 415-420

Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, and Yokoyama M. Hypotension and Reduced Nitric Oxide-elicited Vasorelaxation in Transgenic Mice Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase. 1998.

Oppermann M et al.,. Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide

dismutase expression in vivo. 2009. *J Cell Mol Med.*,13: 1271–1278

Oppermann M, Suvorava T, Freudenberger T, Dao V T, Fischer J, Weber M, Kojda G. Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-dependent posttranslational modification. 2011. *Basic Research in Cardiology*

Patzner M, Kojda G, Hacker A, Noack E. Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate: a novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates. 1998. *Mol Pharmacol* 53(3):547-54.

Pou S, Pou W S, Bredt D S, Snyder S H, and Rosen G M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. 1992. *J Biol Chem* 267: 24173-24176

Pritchard K A, Groszek jr. L, Smalley D M, Sessa W C, Wu M D, Villalon P, Wolin M S, and Stemerman M B. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. 1995. *Circ.Res.* 77: 510-518

Quaschnig T, Voss F, Relle K, Kalk P, Vignon-Zellweger N, Pfab T, Bauer C, Theilig F, Bachmann S, Kraemer-Guth A, Wanner C, Theuring F, Galle J, Hoher B. Lack of endothelial nitric oxide synthase promotes endothelin-induced hypertension: lessons from endothelin-1 transgenic/endothelial nitric oxide synthase knockout mice. 2007. *J Am Soc Nephrol.* Epub ahead of print.

Raidoo D M, Ramsaroop R, Naidoo S and Bhoola K D. Visualisation of tissue kallikrein and kinin receptors in human astrocytomas. 1997. *British Journal of Pharmacology* 122: 107

Ravichandran L V and Jones R A . Upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. 1995. *FEBS Lett* 374: 295-298

Rizzo V, Sung A, Oh P, and Schnitzer J E. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. 1998. *J Biol Chem* 273: 26323-26329

Schmidt K, Andrew P, Schrammel A, Groschner K, Schmitz V, Kojda G, and Mayer B. Comparison of neuronal and endothelial isoforms of nitric oxide synthase in stably transfected HEK 293 cells. 2001. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2053-H2061

SenBanerjee S, Lin Z, Atkins G B, Greif D M, Rao R M, Kumar A, Feinberg M W, Chen Z, Simon D I, Luscinskas F W, Michel T M, Gimbrone M A, Garcia-Cardena Jr. G and Jain M K. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. 2004. *J Exp Med* 199:1305-15

- Shesely E G, Maeda N, Kim H S, Desai K M, Krege J H, Laubach V E, Sherman P A, Sessa W C, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Proc. 1996. Natl. Acad. Sci. 93: 13176-13181
- Stuehr D, Pou S and Rosen G M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. 2001. J Biol Chem 276:14533-6
- Suvorava T, et al., Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tensin in vivo. 2005. Circulation; 112: 2487-2495
- Suvorava T, Weber M, Valcaccia S, Dao V T, Kojda G . Effects of Vascular Oxidative Stress Induced by Endothelium-Specific Overexpression of Uncoupled eNOS in Mice. 2009. Clin Res Cardiol 98, Suppl 1
- Suvorava T, et.al., Sustained hypertension despite endothelial-specific eNOS rescue in eNOS-deficient mice. 2011. Biochem Biophys Res Commun. 458(3):576-83.
- Suvorava T, Nagy N, Pick S, Lieven O, R  ther U, Thao-Vi Dao V T, Fischer J, Weber M, Kojda G. Impact of eNOS-Dependent Oxidative Stress on Endothelial Function and Neointima Formation. 2015. Antioxid Redox Signal. 23(9): 711–723.
- Suvorava T, Pick S, Kojda G. Selective impairment of blood pressure reduction by endothelial nitric oxide synthase dimer destabilization in mice. 2017. J Hypertens 35:76-88
- Sydow K, Boger R H. Homocyst(e)in, endotheliale Dysfunktion und kardiovaskulares Risiko. 2001. Z Kardiol 90: 1-11
- Uematsu M, Ohara Y, Navas J P, Nishida K, Murphy T J, Alexander R W, Nerem R M and Harrison D G. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. 1995. Am J Physiol Cell Physiol 269: C1371-C1378
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters B S, Karoui H, Tordo P and Pritchard K A Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. 1998. Proc Natl Acad Sci U S A 95:9220-5
- Weber M, Hagedorn C H, Harrison D G and Searles C D. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. 2005. Circ Res 96:1161-8
- Zembowicz A, Tang J, and Wu K K. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. 1995. J Biol Chem 270: 17006-17010

Effekt des eNOS-Knockouts auf die Expression des Bradykinin-Rezeptors Typ II in Mäusen

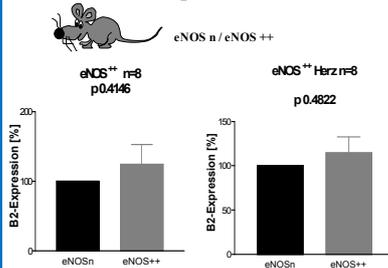
Valcaccia S, Dao VT, Kocgirli O, Suvorava T, Kumpf S, Floeren M, Oppermann M, Kojda G.

Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany

Einführung

Die Aktivierung des vaskulären Bradykinin Rezeptors Typ II (BKR-2) führt u.a. zur Bildung des vasodilatatorisch wirksamen Prostacyclins und zur Bildung von NO durch die eNOS. Noch ist unbekannt, ob diese beiden Mediatoren die Expression des BKR-2 beeinflussen, deshalb untersuchen wir den Effekt von NO auf die vaskuläre BKR-2 Expression.

Transgene Tiere



Zusammenfassung

Unsere Daten deuten darauf hin, dass die BKR-2 Expression in normalen und überexprimierenden eNOS-Mäusen in vivo durch NO hoch reguliert werden kann, allerdings scheint unter physiologischen Bedingungen die NO-Produktion schon maximiert zu sein, da keine signifikanten Steigerungen durch genetische Überexpression der eNOS oder durch Zugabe von NO-Donatoren erreicht werden konnte. In eNOS-Knockout Mäusen scheint die signifikante Erhöhung des BKR-2 wahrscheinlich als Kompensation für den Verlust der endothelialen NO-Synthese zu dienen. Möglicherweise spielt hier der Prostacyclin-Weg, neben der Kompensation durch die nNOS, eine bedeutende Rolle. Der Vergleich des Anstiegs der BKR-2 Expression in Herz und Lunge legt außerdem nahe, dass der Hauptteil der BKR-2 Expression im Gefäßsystem selbst reguliert werden kann, da beide Organe ähnlich hohe signifikante Veränderungen bzgl. der BKR-2 Expression zeigen.

Methoden

Mit Hilfe eines Tie-2 Promotors wurden eNOS⁺⁺-Mäuse mit einer 2,3-fach höheren aortalen eNOS-Expression generiert. Als Negativkontrolle dienten transgenegative Wurfgeschwister (eNOSn). Die Daten der eNOSn Tiere wurden mit den Daten der eNOS⁺⁺ Tiere verglichen und in Relation gesetzt.

eNOS-Knockout Mäuse

Die Knockout Tiere wurden in den Jackson Laboratories generiert und 10x mit dem Stamm C57BL/6 zurück gekreuzt. Der Genotyp der Tiere wurde mit Hilfe einer PCR und der DNA aus den Schwanzspitzen der Tiere verifiziert.

L-NA Behandlung

eNOSn und eNOS⁺⁺ Mäuse erhielten über 3 Wochen den NO-Inhibitor L-Nitroarginin (100mg/kg/KG/d), welcher die endogene NO-Freisetzung durch die eNOS hemmt.

PETN Behandlung

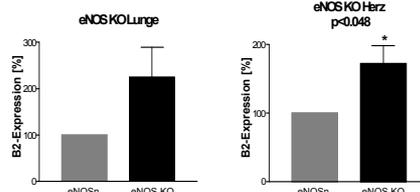
C57BL/6 Mäuse wurden randomisiert in 3 Gruppen eingeteilt (n=6 je Gruppe) und erhielten 4 Wochen lang entweder ein Placebo des NO-Donors Pentaxerythryl-Tetranitrat (PETN) 0mg, 6mg (PETN-6) oder 60mg (PETN-60)/PETN/kg/KG/d.

Zellinkubationen

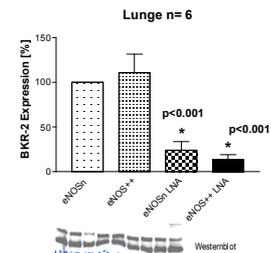
Endothelzellen aus Schweinearterien (PAEC) wurden mit dem NO-Inhibitor L-NA bzw. dem NO-Donor SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin) inkubiert. Die Inkubationen erfolgten über 1h, 3h und 6h. Zellen, die mit L-NA inkubiert wurden, sind zusätzlich mit Calciumionophor stimuliert worden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit Medium + Calciumionophor behandelt worden sind. Die mit SNAP behandelten Zellen wurden vor der Inkubation nicht stimuliert. Als Negativkontrollen dienten nur mit Medium inkubierte Zellen. Die Zellen wurden nach der Inkubation lysiert und für die Westernblots genutzt.



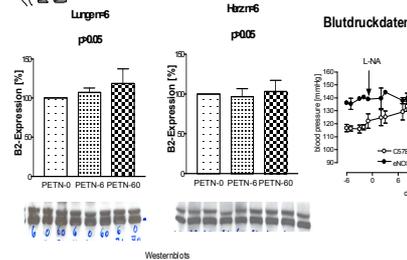
eNOS Knockout



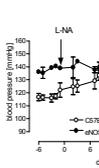
L-NA behandelte Mäuse



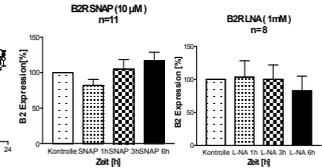
PETN behandelte Mäuse



Blutdruckdaten



Behandelte Zellen



Westernblots

Die BKR-2 Expression wurde durch Westernblots und die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen BKR-2 ermittelt. Lunge und Herz wurden den Mäusen im Alter von 4-6 Monaten entnommen und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Homogenisate der Organe wurden für die Westernblots genutzt.

Ergebnisse

BKR-2 Expression in eNOS n und eNOS ++ Mäusen

Leider konnte bezüglich der BKR-2 Expression zwischen den eNOS⁺⁺ und eNOSn Mäusen weder für die Lunge (124.6±28.4), noch für das Herz (114.5±18.1) ein signifikanter Unterschied gezeigt werden, obwohl sich eine Upregulierung des BKR-2 in der Lunge und auch im Herzen nachweisen ließ. Dies legt die Vermutung nahe, dass die endogene NO-Produktion unter physiologischen Bedingungen bereits maximal ist und nicht weiter gesteigert werden kann.

BKR-2 Expression in eNOS-Knockout Mäusen

Überraschenderweise kam es nicht wie erwartet zu einer deutlichen Abnahme der BKR-2 Expression, vielmehr konnte stattdessen eine signifikante Upregulierung der BKR-2 Expression von 130.7±6.5% (p<0.005) für die Lunge und 172±26% (p<0.05) für das Herz nachgewiesen werden. Diese Daten legen nahe, dass es bedingt durch das Fehlen der eNOS zu einem kompensatorischen Anstieg der BKR-2 Expression kommt.

BKR-2 Expression in den PETN und L-NA behandelten Tieren

In den PETN behandelten Tieren kam es unabhängig von der eingesetzten PETN-Konzentration weder in der Lunge noch im Herzen zu einer signifikanten Veränderung der BKR-2 Expression. Gleiches ließ sich bei den Zellversuchen für die mit SNAP behandelten Zellen zeigen. Beide NO-Donoren können die BKR-2 Expression nicht mehr steigern. In L-NA behandelten eNOSn Mäusen konnte dagegen eine signifikante Abnahme der BKR-2 Expression in der Lunge von 24.0 ±9.5% (p<0.01) nachgewiesen werden. Eine ähnlich hohe Abnahme von 13.5±5.7% (p<0.01) der BKR-2 Expression konnte auch für L-NA behandelte eNOS⁺⁺ Mäuse gezeigt werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass es bei dem genetischen Knockout und dem pharmakologischen Knockout zu unterschiedlichen Kompensationsmechanismen kommt.

5.4. Abstracts

1. Abstract

NO-Synthase knockout effects on protein expression of bradykinin receptor type-2 in mice in-vivo

Valcaccia S, Dao V T, Kocgirli O, Suvorava T, Kumpf S, Floeren M, Oppermann M, Kojda G.

Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Präsentiert auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Bonn vom 08.10.-11.10.2008

Activation of vascular bradykinin receptor type 2 (B2) leads to generation of the vasodilators prostacyclin and NO. It is not known whether these mediators impact on the expression of B2. We sought to investigate the effect of NO on vascular B2. eNOS⁺⁺ mice with 3.3 fold higher aortic eNOS-expression were generated using endothelium-specific Tie-2 promotor and transgene negative littermates served as controls (eNOSⁿ). B2 expression was determined by Westernblotting using a monoclonal antibody directed against B2. Mice were sacrificed at an age of 4-6 months. Lungs and hearts were flash frozen in liquid nitrogen. Thawed and homogenized pieces of frozen organs were used for Westernblotting. In some cases, eNOSⁿ and eNOS⁺⁺ were fed for 3 weeks with 100 mg/kg BW/day. Blood pressure was measured with a tail-cuff system. Treatment with L-NA resulted in a strong increase of systolic blood pressure from 118.2±1.4 to 134±4.7 mmHg. A similar increase was in eNOS^{-/-} mice (138±2.3 mmHg) confirming that treatment with L-NA was completely effective. In L-NA treated eNOSⁿ mice we found a very strong decrease of B2 expression in the lung to 24.0±9.5 % (P<0.01). A similar decrease to 13.5±5.7 was seen in eNOS⁺⁺ (P<0.01). These data suggest that B2 protein expression is upregulated by NO in-vivo. To substantiate this hypothesis we determined B2 expression in eNOS⁺⁺. However, there was no difference to eNOSⁿ, neither in the lungs (124.6±28.4 %, P>0.05) nor in the heart. (114.5±18.1 %, P>0.05). These data suggest that the effect of NO on expression of B2 is almost exploited by physiologic NO-generation. Finally, we investigated whether B2 in eNOS^{-/-} and expected a strong decrease as found in the L-NA treated animals. In striking contrast, we found a significant Hochregulation of B2 expression to 130.7±6.5 % (P<0.005) in lungs and to 172±26 % (P<0.05) in the heart. These data suggest that the increase of B2 expression is likely a compensation for the lack of vascular NO. This might be an important mediator of reactive hyperemia in the heart of these animals. Furthermore, the comparable increase of B2 in the lung and the heart suggest that the majority of regulation of B2 takes place in the vasculature, the most important common cell types in these organs. NO appears to upregulate protein expression of B2 in normal mice and mice with

an overexpression of endothelial NO. In eNOS knockout mice, the increase of B2 expression seems to be regulated by different molecular mechanisms and might compensate for the loss of endothelial NO.

2. Abstract

Generation of Animal Model for Increased Vascular Oxidative Stress

Suvorava T¹, Weber M², Valcaccia S¹, Dao V T¹, Kojda G¹

¹ Institut of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Heinrich Heine University, Duesseldorf, Germany

² Division of Cardiology, Emory University School of Medicine, Atlanta, USA

Präsentiert auf der 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vom 16.04.-18.04.2009 in Mannheim.

Purpose: Compelling evidence suggest that numerous pathological conditions are associated with increased vascular oxidative stress. Whether elevated vascular levels of reactive oxygen species promote cardiovascular pathology or are the consequences of the disease state is an important but unanswered question.

Methods: We have generated a mutant of bovine eNOS in which cysteine 101 was replaced by alanine (C101A) resulting in uncoupling of eNOS. The effects of C101A mutation have been characterized in cultured human embryonic kidney cells (HEK) transfected with either mutant eNOS (eNOS^{mu}) or wild type eNOS (eNOS^{wt}). Transgenic mice carrying eNOS^{mu} have been generated on a C57BL/6 background using the endothelium-specific Tie-2 promotor. By breeding these mice with eNOS knockouts (eNOS^{-/-}), mice that only express eNOS^{mu} (eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+}) or no eNOS at all (eNOS^{-/-}/eNOS^{mu-}) were obtained.

Results: Studies in HEK cells transfected with eNOS^{mu} revealed decreased eNOS activity, increased superoxide generation inhibited by L-NAME treatment, less NO production (45.8±6.2 %), strongly elevated protein oxidation level and decreased eNOS dimer stability in native SDS-gels as compared to eNOS^{wt} suggesting that eNOS^{mu} has the typical features of uncoupled eNOS.

Organ bath experiments showed increased aortic sensitivity of eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+} to NO-donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine. In striking contrast, there was a significant rightward shift in acetylcholine dose-response curve in eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+} (p=0.0062 vs C57Bl/6, n=11-13). eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+} mice have elevated systolic blood pressure as compared to C57Bl/6 (138±2.3 vs 118.4±3.1 mmHg in C57BL/6, n=6-8, p<0.05), but not to eNOS^{-/-}/eNOS^{mu-} (135.5±0.8, n=8). Western blot analysis confirmed the expression of eNOS in eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+} and revealed an increased phosphorylation of eNOS at Ser1179

in aorta, heart and muscle of eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+} as compared to C57Bl/6 (p<0.05, n=4-8). Since the number of circulating endothelial progenitor cells may serve as a marker of ongoing endothelial dysfunction, EPCs were counted using Fluorescent Activated Cell Sorter. Amount of circulating EPCs defined as CD34/Flk-1 or as Sca-1/Flk-1 double positive cells was significantly lower in peripheral blood of eNOS^{-/-}/eNOS^{mu+} as compared to eNOS^{-/-}/eNOS^{mu-} (n=7-8, p<0.05) strongly suggesting a role of uncoupled eNOS and increased vascular oxidative stress in regulation of circulating EPCs.

Conclusions: Endothelial specific overexpression of uncoupled eNOS and increased vascular oxidative stress decrease the number of circulating stem cells with endothelial progenitor capacity.

5.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meinen Vorhaben unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas, für die stets freundliche Hilfe und Unterstützung und dafür, dass er nie die Geduld mit mir verloren hat.

Herrn Dr. rer. nat. Marc Oppermann und Frau Dr. rer. nat. Tanja Suvorava danke ich für die gute und schnelle Einarbeitung in die Methodik und die freundschaftliche Betreuung. Während der Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit standen sie mir bei Problemen und Fragen immer hilfreich zur Seite.

Bei Frau Stefanie Pick, Frau Melanie Floeren, Herrn Oktay Kocgirli, Frau Dr. rer. nat. Thaoi Vi Dao und Frau Yvonne Petry möchte ich mich ganz herzlich für die stete Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank jedoch geht an meine Eltern Herr Michele und Frau Ursula Valcaccia und an meine Schwester Frau Nadine Valcaccia. Ihr habt stets an mich geglaubt und mir durch eure Hilfe und Unterstützung mein Studium erst ermöglicht. Ich liebe euch.