

# **Rolle der Prostanoiden bei der Entstehung Bradykinin-induzierter Angioödem**

## **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Michael Krybus**

aus Mülheim an der Ruhr

Düsseldorf, Juli 2022



Angefertigt am Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Georg Kojda

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Kalscheuer

Tag der Disputation: 12.12.2022

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das nicht-allergische Angioödem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Einteilung nicht-allergischer Angioödeme.....	3
1.1.2 Epidemiologie .....	6
1.1.3 Diagnose und Therapie von Angioödemem .....	8
<b>1.2 Endothelpermeabilität und Extravasation .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Das Kallikrein-Kinin-System .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Biosynthese und Abbau der Kinine.....	14
1.3.2 Kininrezeptoren und Signalwege .....	15
<b>1.4 Prostanoiden.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Struktur und Einteilung .....	19
1.4.2 Cyclooxygenase-abhängige Biosynthese.....	20
1.4.3 Distribution und Metabolismus.....	21
1.4.4 Prostanoidrezeptoren und Signalwege.....	23
1.4.5 Pharmakologische Hemmung der Prostanoiden .....	24
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>28</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Labortiere.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Mauslinien und Tierhaltung.....	32
2.2.2 Genotypisierung transgener Mauslinien .....	33
<b>2.3 Zellkultur .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Proteinaufreinigung und -analyse .....</b>	<b>36</b>
2.4.1 Isolierung der Proteinfraktion.....	36
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	36
2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
2.4.4 Western Blot .....	37
<b>2.5 Miles Assay.....</b>	<b>40</b>
2.5.1 Theoretische Grundlagen .....	40
2.5.2 Durchführung .....	40
2.5.3 Standardkurve und Berechnung der Farbstoffkonzentration .....	46
<b>2.6 Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>47</b>

2.6.1	Theoretische Grundlagen .....	48
2.6.2	Durchführung .....	48
<b>2.7</b>	<b>Aufreinigung und Analyse des Prostacyclin-Metaboliten 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub>.....</b>	<b>51</b>
2.7.1	Probenvorbereitung .....	51
2.7.2	Aufreinigung von 6-Keto-Prostaglandin F <sub>1α</sub> .....	52
2.7.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	53
2.7.4	LC-MS/MS .....	56
<b>2.8</b>	<b>Präparation und Analyse von RNA (Genexpressionsanalyse) .....</b>	<b>61</b>
2.8.1	Isolierung und Aufreinigung der RNA .....	61
2.8.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	62
2.8.3	DNA-Microarray-Analyse .....	62
<b>2.9</b>	<b>Statistische Datenauswertung .....</b>	<b>66</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Nachweis des Cyclooxygenase-1-Knockouts in COX-1<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen der Bradykinin-vermittelten dermalen Extravasation .....</b>	<b>69</b>
3.2.1	Aktivierung des Bradykinin-B2-Rezeptors .....	69
3.2.2	Hemmung der Cyclooxygenase.....	69
3.2.3	Inhibition der 5-Lipoxygenase .....	72
3.2.4	Hemmung von Cytochrom P450-Isoenzymen .....	74
3.2.5	Hemmung vasodilatierend wirksamer Prostaglandin-Rezeptoren .....	74
3.2.6	Nachweis und Quantifizierung des Prostacyclin-Metaboliten 6-Keto-Prostaglandin F <sub>1α</sub> .....	79
3.2.7	Inhibition der cytosolischen Phospholipase A <sub>2α</sub> .....	81
<b>3.3</b>	<b>Genexpressionsanalysen .....</b>	<b>89</b>
3.3.1	Regulation der cytosolischen Phospholipase A <sub>2α</sub> .....	89
3.3.2	Regulation der Prostanoidwirkung .....	93
3.3.3	Regulation der Leukotrienwirkung .....	96
3.3.4	Regulation der Wirkung von Epoxyeicosatriensäuren .....	98
3.3.5	Regulation der Bradykinin-Signalgebung .....	101
3.3.6	Regulation Bradykinin-abbauender Enzyme .....	103
3.3.7	Regulation von Junction-Proteinen .....	104
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
<b>4.1</b>	<b>Rolle der Bradykinin-B2-Rezeptor-Aktivierung für die Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation .....</b>	<b>107</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss der Cyclooxygenase auf die Bradykinin-vermittelte Ödembildung in der Haut.....</b>	<b>110</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss der 5-LOX-abhängigen Cysteinyl-Leukotrienbildung .....</b>	<b>115</b>

<b>4.4 Rolle der Cytochrom P450-vermittelten Bildung von Epoxy-eicosatriensäuren.....</b>	<b>116</b>
<b>4.5 Beteiligung vasodilatatorisch wirksamer Prostaglandine .....</b>	<b>118</b>
<b>4.6 Rolle der cPLA<sub>2</sub>α-abhängigen Arachidonsäurefreisetzung .....</b>	<b>123</b>
<b>4.7 Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression in der Haut .....</b>	<b>129</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>137</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>139</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>141</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>161</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>164</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>167</b>
<b>Finanzierung und Danksagung .....</b>	<b>168</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>169</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
15-HPGD	15-Hydroxy-Prostaglandin-Dehydrogenase
5-LOX	5-Lipoxygenase
A	Adenin
AAE	Acquired Angioedema, erworbenes Angioödem
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin-converting Enzyme, Angiotensin I-konvertierendes Enzym
ACEi	Angiotensin-converting Enzyme-Inhibitor
AJ	Adherens Junction
APP	Aminopeptidase P
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARB	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1-Antagonist/-Blocker
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the Curve
B1	Bradykinin-B1-Rezeptor
B2	Bradykinin-B2-Rezeptor
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
bp	Basenpaare
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertiges Calciumion
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDS	Coding sequence, Kodierungssequenz
cGTP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
COX-1 <sup>-/-</sup>	Cyclooxygenase-1-defiziente Mauslinie
cP	Centipoise
cPLA <sub>2</sub> α	Cytosolische Phospholipase A <sub>2</sub> α
CPM	Carboxypeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N
CYP	Cytochrom P450
CysLT	Cysteinyl-Leukotrien
CysLT1	Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor 1
CysLT2	Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor 2
D	<i>dexter</i> , rechts(-drehend)
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat



dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DP	Prostaglandin D <sub>2</sub> -Rezeptor
DPP4	Dipeptidylpeptidase IV
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECE	Endothelin-konvertierendes Enzym
EDHF	Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor
EET	Epoxyeicosatriensäure
EH	Epoxidhydrolase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EP	Prostaglandin E <sub>2</sub> -Rezeptor; Endopeptidase
<i>et al.</i>	et alii [Lat.], und andere
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein
FP	Prostaglandin F <sub>2α</sub> -Rezeptor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	Guanine Nucleotide-binding (G)-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTL	Genomics & Transcriptomics Laboratory
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H1	Histamin-H1-Rezeptor
H <sub>2</sub> O	Wasser, Monohydrat
HAE	Hereditary Angioedema, hereditäres Angioödem
HCl	Hydrochlorid, Salzsäure
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HEPES-Na	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Natriumsalz
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HMWK	High Molecular Weight Kininogen, hochmolekulares Kininogen
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i. d.	intradermal
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IAE	Idiopathisches Angioödem
IFN-γ	Interferon-γ
IgE	Immunglobulin E
IL-1β	Interleukin-1β
IP	Prostacyclin-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JAM	Junction Adhesion Molecule
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LC	Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie

LC-MS/MS	Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry
LMWK	Low Molecular Weight Kininogen, niedermolekulares Kininogen
LTA <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub> S	Leukotrien C <sub>4</sub> -Synthase
M	molar, molekulare Masse
m/m	Masse pro Masse
m/V	Masse pro Volumen
max.	maximal
MCT	Medium-chain Triglycerides, mittelkettige Triglyceride
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
mind.	mindestens
mL	Milliliter
MLCK	Myosin Light Chain Kinase, Myosin-leichte-Ketten-Kinase
mM	millimolar
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid, Boten-Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug-resistance protein
MS	Massenspektrometrie
Na	Natrium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NEP	Nepriylsin
NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAE	Pseudoallergisches Angioödem
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphate-buffered Saline with Tween <sup>®</sup> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween <sup>®</sup>
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Prolyl-Endopeptidase
PG	Prostaglandin
PGDS	Prostaglandin D-Synthase
PGES	Prostaglandin E-Synthase
PGFS	Prostaglandin F-Synthase
PGIS	Prostaglandin I-Synthase
PGT	Prostaglandin-Transporter
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PLC	Phospholipase C
qs	<i>quantum satis</i> , so viel wie nötig
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFU	Relative fluorescence units, relative Intensität einer Fluoreszenz
RIN	RNA integrity number, Maß für die Qualität einer RNA-Probe
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
s.	siehe
SB296	3-(5-Carboxypentanoyl)-1-[3-(4-octylphenoxy)-2-oxopropyl]indol-5-carbonsäure
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler des Mittelwerts
sGC	Soluble guanylate cyclase, lösliche Guanylatcyclase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TJ	Tight Junction
TJP	Tight Junction Protein
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP	Thromboxan A <sub>2</sub> -Rezeptor
TPEM	Two-Photon Excitation Microscopy, Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie
TQD	Tripel-Quadrupol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX	Thromboxan(e)
TXAS	Thromboxan A-Synthase
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
V	Volumen, Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VE-Cadherin	Vaskuläres endotheliales Cadherin
Vis	visible, sichtbar
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem
$\lambda$	Wellenlänge

# Einleitung

## 1.1 Das nicht-allergische Angioödem

Das Angioödem (altgriechisch: *angeîon* = Gefäß, *oîdēma* = Schwellung) beschreibt einen Zustand, der sich in Form von subkutanen und submukösen Schwellungen verschiedener Organe äußern kann, die durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße entstehen. Diese resultiert in einem vermehrten Austritt von Blutplasma aus den versorgenden Gefäßen (Extravasation) und der Akkumulation der Flüssigkeit im interstitiellen Gewebe, die als Ödembildung bezeichnet wird. Der ältere Begriff Quincke-Ödem lässt sich zurückführen auf den deutschen Mediziner Heinrich Irenäus Quincke, der erstmalig 1882 anhand der Symptomatik eindeutig zwischen dem Angioödem und ähnlichen Krankheitsbildern wie der Urticaria differenzierte. Darauf aufbauend stellte Sir William Osler 1888 anhand von Beobachtungen mehrerer Generationen einer Familie fest, dass die genetische Veranlagung eine Rolle für das Auftreten von Angioödemen spielen könnte (1). Die zu Grunde liegende Ursache der heutzutage als Hereditäres Angioödem (Hereditary angioedema, HAE) bekannte Form konnte jedoch erst 75 Jahre später im Jahr 1963 durch Donaldson und Evans beschrieben werden, die den Zusammenhang zwischen einem genetisch bedingten Mangel an C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) und Angioödemen herstellten (2). Neun Jahre später identifizierten Caldwell *et al.* einen Angioödem-Patienten, bei dem der C1-INH-Mangel nicht erblich, sondern erworben war (Acquired angioedema, AAE) und mit einem begleitenden malignen Lymphom zusammenhing (3). In den folgenden Jahren konzentrierte sich die Angioödem-Forschung auf die Entschlüsselung der Pathophysiologie des Angioödems im Zusammenhang mit C1-INH-Mangel, wobei sich immer mehr andeutete, dass diese Form des Angioödems durch das vasoaktive Nonapeptid Bradykinin vermittelt wird (4,5). Diese Schlussfolgerung konnte später durch das klinische Ansprechen auf den spezifischen Bradykinin-B2-Rezeptor (B2)-Antagonisten Icatibant bestätigt werden (6). Die Einführung der Angiotensin-converting enzyme (ACE-)Inhibitoren (ACEi) im Jahr 1980, die als seltene Nebenwirkung Angioödeme verursachen können, hat das Bewusstsein für diese Krankheit verändert. Auch wenn Angioödeme bei nur < 1% der behandelten Personen vorkommen, hat sich die Inzidenz von Angioödemen deutlich erhöht, da Millionen von Menschen weltweit mit ACEi therapiert werden (7). Die beschriebenen Formen werden neben Angioödemen unbekanntem (idiopathischen) und pseudoallergischen Ursprungs (Pseudoallergisches Angioödem, PAE) als nicht-allergische Angioödeme bezeichnet, da sie nicht auf einer Immun-

globulin E (IgE)-vermittelten Mastzelldegranulation und dadurch hervorgerufenen Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin basieren (8). Nicht-allergische Angioödeme manifestieren sich als anfallsartige, selbstlimitierende jedoch wiederkehrende Schwellung der Schleimhaut und/oder Submukosa der Haut, die vor allem das Gesicht, die Lippen, die Zunge und die oberen Atemwege, aber auch viszerale Organe, die Genitalien oder Extremitäten befallen können. Schwellungen im Kopf- und Halsbereich, allen voran im Rachen und Kehlkopf, sind durch Beeinträchtigung der Atmung potentiell lebensbedrohlich und erfordern daher häufig eine Notfallbehandlung und einen mehrtägigen Krankenhausaufenthalt (9). Eine derartige Ausprägung ist charakteristisch für Angioödeme, die durch ACEi oder Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT1)-Antagonisten („Sartane“, ARB) hervorgerufen werden (Abb. 1) (10). In der klinischen Praxis ist die Diagnose und Behandlung von akuten Angioödemem jedoch nach wie vor eine Herausforderung und wird oft nur unzureichend gehandhabt. Die Erkrankung zeigt sich in klinisch leicht zu verwechselnden Symptomen, die durch unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen hervorgerufen werden. Eine kausale Therapie erfordert insbesondere im akuten Notfall eine gesicherte Diagnose und Ätiologie der vorliegenden Form des Angioödems (11). Nach heutigem Kenntnisstand sind die vasoaktiven Mediatoren Histamin und Bradykinin maßgeblich an der Entstehung von Angioödemem beteiligt (8). Beide Mediatoren sind in der Lage die Gefäßdurchlässigkeit im betroffenen Gewebe über ein physiologisches Maß hinaus zu erhöhen, was eine verstärkte Flüssigkeitsextravasation und schließlich die Bildung eines Ödems fördern kann (12). Die zu Grunde liegenden Mechanismen, insbesondere der nicht-allergischen, Bradykinin-vermittelten Angioödeme, sind allerdings noch nicht bis ins letzte Detail verstanden.



**Abb. 1:** Intensivpatient mit ausgeprägtem Angiotensin converting enzyme (ACE)-Inhibitor-induziertem Angioödem des Gesichts, der Zunge und des Pharynx (13).

### 1.1.1 Einteilung nicht-allergischer Angioödeme

Im Allgemeinen können Angioödeme in eine allergische bzw. IgE-vermittelte oder nicht-allergische Form eingeteilt werden. Bei der weitaus häufiger auftretenden allergischen Form des Angioödems handelt es sich in der Regel um eine Typ-1-Überempfindlichkeitsreaktion, die die B-Zell-vermittelte Freisetzung von IgE als Reaktion auf Nahrungsmittel (z. B. Erdnüsse), Medikamente (z. B. Penicilline, Opiate) oder Umweltfaktoren (z. B. Insektenstiche) initiiert. IgE kann über IgE-Rezeptoren an Mastzellen und Basophile binden und führt bei erneuter Allergenexposition innerhalb von Minuten zur Degranulation dieser Zellen und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Cysteinyl-Leukotrienen (CysLTs) und Prostaglandinen (PGs) (8,14). Hierbei fungiert vor allem Histamin als Hauptmediator und induziert durch Aktivierung endothelialer Histaminrezeptoren Vasodilatation und Hyperpermeabilität, was schließlich zu einer übermäßigen Plasmaextravasation und Ödembildung führen kann. Im Gegensatz zum Bradykinin-vermittelten Angioödem ist diese Form häufig mit Juckreiz und/oder dem Auftreten von Urticaria verbunden (15).

Gemäß Konsens der „Hereditary Angioedema International Working Group“ aus dem Jahr 2014 werden nicht-allergische Angioödeme in eine erblich bedingte (HAE) oder erworbene (AAE) Form eingeteilt (16). Diese Formen lassen sich daraufhin in weitere Subtypen aufteilen (Tab. 1). Die Klassifizierung betrachtet die Gruppe der nicht-allergischen Angioödeme, die durch ACEi ausgelöst werden (AAE-ACEi), aufgrund ihrer hohen Inzidenz als einen separaten Subtyp der AAE. Darüber hinaus ist jedoch bekannt, dass mit geringerer Inzidenz auch weitere Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)-Inhibitoren wie ARB (10) oder Aliskiren (17), aber auch der NEP-Inhibitor Sacubitril (10) oder Plasminogenaktivatoren wie Alteplase (18,19) ein Bradykinin-induziertes Angioödem auslösen können. Zudem wurden seit der Veröffentlichung 2014 noch weitere Formen des HAE mit normalen C1-INH-Leveln (HAE-nl-C1-INH) identifiziert, die durch andere Mutationen als die *F12*-Mutation hervorgerufen werden und die in Tab. 1 mit berücksichtigt wurden (20). Das PAE ist eine ebenfalls erworbene, Arzneimittel-induzierte Form des nicht-allergischen Angioödems (21), welche jedoch nicht in der Klassifikation von Cicardi *et al.*, 2014, (16) aufgeführt wird und daher zusätzlich in diesem Kapitel Erwähnung findet. Die überwiegende Mehrheit der nicht-allergischen Angioödeme wird durch erhöhte Bradykininspiegel ausgelöst, die durch eine Überproduktion und/oder einen verminderten Abbau von Bradykinin hervorgerufen werden (22). Bradykinin-vermittelte Angioödeme stehen im Fokus dieser wissenschaftlichen Arbeit.

**Tab. 1:** Aufteilung der verschiedenen Formen des nicht-allergischen Angioödems gemäß Konsens der „Hereditary Angioedema International Working Group“ aus dem Jahr 2014 (16) unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse nach (20).

Formen des nicht-allergischen Angioödems				
Hereditäres Angioödem (HAE)		Erworbenes Angioödem (AAE)		
HAE-C1-INH	HAE-nl-C1-INH (HAE-FXII, -PLG, -ANGPT1, -KNG1, -U)	AAE-ACEi	AAE-C1-INH	AAE-InH
<i>Auslöser</i>				
Mutation in <i>SERPING1</i> (Typ I: C1-INH-Mangel, Typ II: C1-INH-Dysfunktion)	Mutation in <i>F12</i> , <i>PLG</i> , <i>ANGPT1</i> , <i>KNG1</i> bzw. unbekanntem Gen (C1-INH-Level normal)	ACEi	Lymphome (Typ I), Autoimmunität gegen C1-INH (Typ II)	unbekannt
<i>Mediatoren</i>				
Bradykinin	Bradykinin	Bradykinin	Bradykinin	unbekannt (nicht-histaminerg)

AAE = erworbenes Angioödem, ACEi = Angiotensin converting enzyme-Inhibitor, ANGPT1 = Angiotensinogenase 1, C1-INH = C1-Esterase-Inhibitor, FXII = Gerinnungsfaktor FXII bzw. Hagemann-Faktor, HAE = hereditäres Angioödem, InH = idiopathisch nicht-histaminerg, KNG1 = Kininogen-1, nl = normales Level, PLG = Plasminogen, U = unbekannte Mutation

**Hereditäres Angioödem mit C1-INH-Mangel (HAE-C1-INH) oder normalem C1-INH-Level (HAE-nl-C1-INH)** Das HAE ist eine seltene autosomal-dominant vererbte Krankheit, die durch episodische, unvorhersehbare Angioödem-Anfälle gekennzeichnet ist. Die häufigste Form wird durch einen Mangel an C1-INH hervorgerufen, welcher die Plasmakallikrein-vermittelte Bradykinin-Abspaltung aus hochmolekularem Kininogen reguliert. Das HAE kann zunächst vereinfacht in zwei Typen unterteilt werden: HAE-C1-INH oder HAE-nl-C1-INH. HAE-C1-INH wird nochmals in zwei Subtypen unterteilt: Typ I, der durch einen C1-INH-Mangel gekennzeichnet ist (ca. 85% der Fälle) und Typ II, welcher durch dysfunktionales C1-INH zustande kommt (ca. 15% der Fälle) (20,23). Sowohl Typ I als auch Typ II werden durch Mutationen im *SERPING1*-Gen auf Chromosom 11 verursacht, das für C1-INH ko-

diert. Das HAE-nl-C1-INH weist normale Level (nl) an C1-INH auf und ist nicht so gut untersucht wie das HAE-C1-INH. Derzeit gibt es fünf Subtypen dieser Form, die anhand der zugrunde liegenden Mutation definiert werden (20): HAE-FXII (*F12*-Gen, Gerinnungsfaktor FXII bzw. Hagemann-Faktor) (24), HAE-PLG (*PLG*-Gen, Plasminogen) (25), HAE-ANGPT1 (*ANGPT1*-Gen, Angiotensinogenase 1) (26), HAE-KNG1 (*KNG1*-Gen, Kininogen-1) (27) sowie HAE-U (unbekanntes Gen) (28). Es ist sehr wahrscheinlich, dass HAE-nl-C1-INH ebenso wie HAE-C1-INH durch Bradykinin vermittelt wird, da beide Formen auf Medikamente ansprechen, die über eine Hemmung des Bradykinin-Signalwegs intervenieren (29).

**ACEi-vermitteltes, erworbenes Angioödem (AAE-ACEi)** Das AAE-ACEi gehört zu den RAAS-Inhibitor-induzierten Angioödem (RAE). RAE umfassen alle Angioödeme, die im Zusammenhang mit der Einnahme von Arzneistoffen, die in das RAAS intervenieren, auftreten. Angioödeme sind eine seit langem bekannte Nebenwirkung von ACEi (z. B. Captopril, Lisinopril), doch auch ARB (z. B. Losartan) oder der Renin-Inhibitor Aliskiren können diese hervorrufen (30). Fast alle durch ACEi oder ARB verursachten Angioödeme sind im oberen Aerodigestivtrakt lokalisiert (Zunge > Lippen > Pharynx/Larynx) (10), weshalb die Gefahr lebensbedrohlicher Komplikationen erhöht ist. Unter den RAE ist das AAE-ACEi die häufigste Form. Es ist bekannt, dass der zugrunde liegende Pathomechanismus insbesondere auf die Hemmung von ACE, dem Schlüsselenzym für den Abbau von Bradykinin, zurückzuführen ist (11). Im Gegensatz dazu ist nicht ganz klar, wie ARB oder Aliskiren sich auf den Bradykinin-Stoffwechsel auswirken und Angioödeme auslösen können. Neben ACE sind noch weitere Peptidasen wie die Neutrale Endopeptidase (Neprilysin, NEP) oder Dipeptidylpeptidase IV (DPP4) an der Degradation von Bradykinin beteiligt (10). Die Anwendung des NEP-Inhibitors Sacubitril in Kombination mit dem ARB Valsartan bei Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (31) oder auch der antidiabetisch wirksamen DPP4-Inhibitoren mit ACEi (32) könnten daher das Risiko für Angioödeme erhöhen.

**Erworbenes Angioödem mit C1-INH-Mangel (AAE-C1-INH)** Das AAE-C1-INH ist anders als das HAE-C1-INH nicht durch eine Mutation von *SERPING1* sondern durch einen erworbenen Mangel an C1-INH gekennzeichnet. Aus klinischer Sicht können AAE-C1-INH und HAE-C1-INH anhand der Symptome nicht unterschieden werden. Jedoch treten aufgrund der genetischen Grundlage diese bei Patienten mit HAE-C1-INH deutlich früher auf (< 20 Jahre) als bei AAE-C1-INH-Patienten (> 40 Jahre) (33). Beim AAE-C1-INH wird zwischen zwei Typen unterschieden: Typ I, der mit lymphoproliferativen Erkrankungen und damit zusammenhängenden C1-INH-Verbrauch assoziiert ist, und Typ II, bei dem der C1-INH-Mangel sekundär zu inaktivierenden Anti-C1-INH-Autoantikörpern bei ansonsten ge-



sunden Personen auftritt. Autoimmunität (ca. 74% der AAE-C1-INH-Patienten) und lymphoproliferative Störungen (ca. 46%) können jedoch auch parallel bestehen bzw. auseinander hervorgehen (33,34).

**Idiopathisches, nicht-histaminerges, erworbenes Angioödem (AAE-InH)** AAE, deren Ätiologie unbekannt ist bzw. die keiner der bisher genannten Formen entsprechen, werden zunächst als idiopathisch bezeichnet. Sofern Patienten bei der Therapie auf die kontinuierliche Verabreichung eines Antihistaminikums ansprechen, wird das Angioödem als histaminerg (IH) definiert. Der Mechanismus, durch den die Histaminfreisetzung bei dieser Form ausgelöst wird, ist jedoch unbekannt. Andersherum erfolgt die Definition als nicht-histaminerg (InH), wenn kein Ansprechen auf die Therapie beobachtet werden kann. Der Begriff nicht-histaminerg kann in diesem Zusammenhang suggerieren, dass Bradykinin dieses Angioödem vermittelt. Auch wenn sich die Experten einig sind, dass Bradykinin an dieser Form beteiligt ist, gibt es jedoch kaum Studien, die diese Hypothese bestätigen. Daher müssen auch andere vasoaktive Mediatoren als Bradykinin, z. B. CysLT, PGs oder Thrombozytenaktivierender Faktor, in Betracht gezogen werden (16).

**Pseudoallergisches Angioödem (PAE)** Das PAE ist eine weitere nicht-allergische, Arzneimittel-induzierte Form des Angioödems, die jedoch nicht auf eine Beteiligung von Bradykinin zurückzuführen ist und keine Erwähnung in der Klassifikation von Cicardi *et al.*, 2014, findet (16). Es wird durch so genannte pseudoallergische Reaktionen vermittelt, die den Symptomen der Anaphylaxie ähneln, jedoch nicht durch IgE ausgelöst werden und vermutlich mit dem Wirkmechanismus des auslösenden Arzneimittels zusammenhängen (11,21). Das durch Acetylsalicylsäure und andere nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) ausgelöste Angioödem ist wahrscheinlich die bekannteste Form des PAE und kann mit oder ohne Urticaria auftreten, wobei vermutlich eine Kreuzreaktivität zwischen allen Cyclooxygenase (COX)-hemmenden Arzneistoffen herrscht (22). Eine mögliche Ursache ist die vermehrte Bereitstellung des Substrats Arachidonsäure für die 5-Lipoxygenase (5-LOX)-abhängige Biosynthese von CysLT, die in der Lage sind, die Endothelpermeabilität zu erhöhen und so die Bildung von Ödemen begünstigen können (35,36).

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz des HAE-C1-INH (Typ I und Typ II) wird weltweit auf 1:50.000 Menschen geschätzt, wohingegen die Prävalenz des HAE-nl-C1-INH nicht bekannt ist (20). Noch weit aus seltener tritt das AAE-C1-INH auf (zwischen 1:100.000 und 1:500.000), wobei diese Werte nur auf groben Schätzungen basieren und die tatsächliche Zahl höher sein könnte, da die Erkrankung häufig nicht erkannt wird (33). Letztlich jedoch werden die meisten

Bradykinin-induzierten Angioödeme durch Arzneimittel hervorgerufen, allen voran ACEi (30). Seltener treten RAE durch ARB (37) oder Aliskiren (17) auf bzw. Angioödeme durch Wirkstoffe, die nicht direkt mit einer Hemmung des RAAS assoziiert sind, wie DPP4-Inhibitoren (32), dem NEP-Inhibitor Sacubitril (10) oder dem Plasminogenaktivator Alteplase (18). ACEi und ARB haben einen hohen Stellenwert in der Pharmakotherapie und werden zur Behandlung von Patienten mit Bluthochdruck, Herzinsuffizienz mit verminderter Ejektionsfraktion, linksventrikulärer Dysfunktion, Diabetes einschließlich Nephropathie oder Schlaganfall eingesetzt, da die pharmakologische Hemmung des RAAS organschützende Wirkungen hat und die Morbidität und Mortalität verringert (38). ACEi werden im Allgemeinen gut vertragen, jedoch treten bei bis zu 20% der Patienten unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf, die die weitere Therapie beeinträchtigen können. Die häufigsten gemeldeten Nebenwirkungen sind dabei anhaltender trockener Husten (88,2%), Hypotonie (4,1%), Angioödeme oder Anaphylaxie (1,3%) und Nierenfunktionsstörungen (1%). Der Wechsel zu einem ARB ist ein probates Mittel, die Therapie durch RAAS-Inhibition weiterhin aufrechtzuerhalten, da sie als besser verträglich gelten (39). Die klinischen Studien VALIANT (40), HOPE (41) und ONTARGET (42) zeigten, dass Angioödeme mit einer Häufigkeit von 0,3% bis 0,5% bei der Therapie mit den ACEi Captopril bzw. Ramipril aber auch bei der Einnahme der ARB Telmisartan bzw. Valsartan (0,1% bis 0,25%) auftreten können. Dieser Trend konnte in einer Metaanalyse bestätigt werden, die zeigte, dass die Inzidenz von Angioödemem unter Therapie mit ACEi (0,30%) höher ist als unter ARB (0,11%) (43). Zu den Patientengruppen mit erhöhtem Risiko für das Auftreten ACEi-induzierter Angioödeme zählen Frauen, Raucher, Allergiker, immunsupprimierte Patienten und insbesondere Patienten mit afrikanischer Abstammung (44). Eine Metaanalyse zur Untersuchung von Nebenwirkungen kardiovaskulärer Medikamente bei dieser Ethnie ergab ein dreimal höheres Risiko für die Entwicklung eines ACEi-induzierten Angioödems als bei Patienten kaukasischer Abstammung (45). Das zeitliche Spektrum des Auftretens von Angioödemem nach Anwendung von ACEi reicht vom ersten Anwendungstag bis zu mehreren Jahren der Anwendung. Allerdings treten ca. zwei Drittel der Angioödeme innerhalb der ersten drei Monate auf (46). Dabei ist das Risiko nach erstmaligem Auftreten eines ACEi-induzierten Angioödems, erneut einen Anfall zu erleiden, bei Fortsetzung der Therapie deutlich erhöht (47).

Die breite therapeutische Bedeutung von Hemmstoffen des RAAS manifestiert sich weiterhin in ihrer praktischen Anwendung. Seit 2011 stiegen die Verordnungen von RAAS-Inhibitoren in Deutschland kontinuierlich an, sodass sie im Jahr 2020 mit über 10 Milliarden definierten Tagesdosen 59,6% des Verordnungsvolumens der Antihypertensiva ausmachten und die mit Abstand am häufigsten angewendete Arzneimittelgruppe bilden (48). Mit der

wachsenden Lebenserwartung der Menschen (49) ist davon auszugehen, dass sich diese Zahl in Zukunft noch weiter erhöht und damit die Inzidenz von RAE steigen wird.

### 1.1.3 Diagnose und Therapie von Angioödemem

Die Therapie von Angioödemem erfolgt unter Berücksichtigung der wichtigsten beteiligten Mediatoren, die in der Regel Histamin und Bradykinin darstellen. Die meisten Fälle von Angioödemem sind Histamin-vermittelt und treten im Rahmen einer allergischen Reaktion innerhalb von Minuten nach Allergenexposition auf. Charakteristisch hierbei sind Schwellungen, die gleichzeitig mit Urticaria, Erythem und Juckreiz auftreten und in der Regel innerhalb von 24 bis 37 h abklingen. Das Bradykinin-vermittelte Angioödem, allen voran induziert durch ACEi, ist meist im Gesicht oder im oberen Aerodigestivtrakt lokalisiert und bildet sich nach 24 bis 72 h spontan zurück. Es bilden sich keine Urticaria oder Erytheme mit assoziiertem Juckreiz (50). Es ist wichtig, Patienten und Familienmitglieder nach der Einnahme von Nahrungsmitteln zu fragen, die häufiger Allergien auslösen (z. B. Erdnüsse, Schalentiere). Zudem sollte eine Medikamentenanamnese, insbesondere mit Blick auf die jüngste Einnahme von Antibiotika, Antihypertonika wie RAAS-Inhibitoren oder Analgetika, erfolgen (15). Die Notfallbehandlung eines Patienten mit Angioödemem fokussiert sich in der klinischen Praxis auf die lebensrettenden Sofortmaßnahmen zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen unter Mitberücksichtigung des verantwortlichen Mediators. Hilfestellungen wie der DAMSEL-Score (Akronym für Dyspnoe, Alter, Medikamente, Steroide, Erythem, Larynxschwellung) können die ätiologische Zuteilung von Angioödemem mit kritischer Lokalisation im Kopf- und Halsbereich erleichtern (51). Die Punktevergabe erfolgt mit jeweils einem Punkt für das Vorliegen von Atemnot, ein Alter über 65 Jahre, die Medikation mit RAAS-Inhibitoren, fehlende Erythembildung/Juckreiz, eine laryngeale Lokalisation des Angioödemem sowie mit zwei Punkten für ein fehlendes Ansprechen auf Glucocorticoide. Ab drei Punkten gilt das Vorliegen eines Bradykinin-induzierten Angioödemem als wahrscheinlicher und könnte demnach eine kausale Therapie mit Hemmstoffen des B2-Signalwegs wie z. B. dem B2-Antagonisten Icatibant nach sich ziehen. Im akuten Notfall bleibt die Ätiologie des Angioödemem zunächst jedoch oftmals ungeklärt, weshalb die Initialtherapie wie beim anaphylaktischen Schock aus der Gabe von Adrenalin, Antihistaminika und Glucocorticoiden besteht, einer Kombination, deren Wirksamkeit für das Bradykinin-vermittelte Angioödemem nicht belegt ist. Bei drohender Erstickungsgefahr müssen daher eine fiberoptische Intubation und als letztes Mittel die Koniotomie in Erwägung gezogen werden (52).

**Differentialdiagnose Bradykinin-induzierter Angioödemem** Ein unzureichendes Ansprechen auf Antihistaminika, Glucocorticoide und Epinephrin kann ein Hinweis für das Vorliegen eines Bradykinin-vermittelten Angioödemem sein. Ein Angioödemem kann klinisch als nicht-

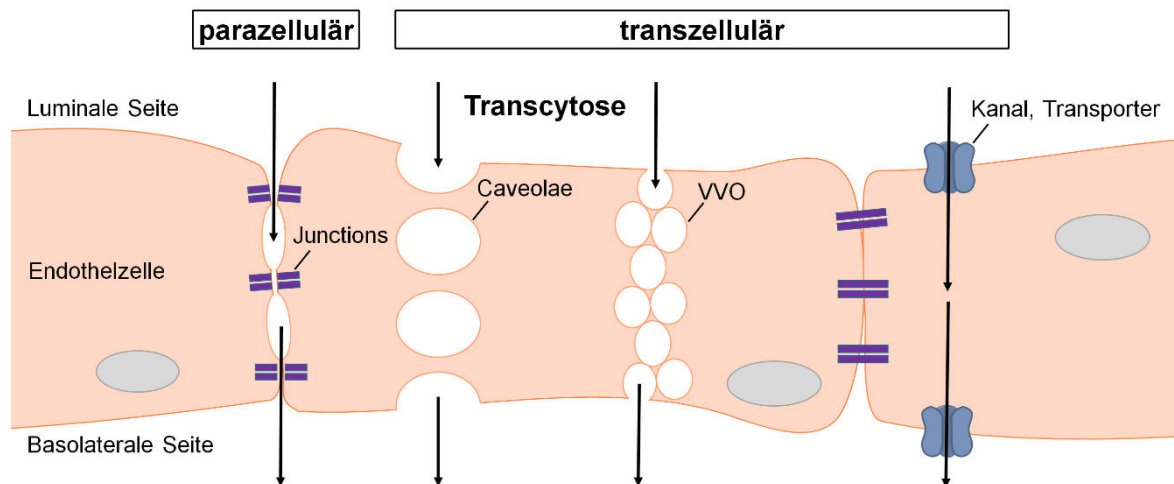
histaminerg eingestuft werden, wenn eine Gabe von Antihistaminika in bis zu vierfacher Menge der zugelassenen antiallergischen Dosis keine Linderung verschafft (15). Die Quantifizierung von Bradykinin als Biomarker zum Nachweis Bradykinin-induzierter Angioödeme ist aufgrund der kurzen Plasmahalbwertszeit und Steigerung der Biosynthese durch Kontaktaktivierung während der Venenpunktion nicht praktikabel (14). Treten nicht-histaminerge Angioödeme trotz Absetzen potentiell auslösender Arzneimittel wie ACEi oder ARB über mehrere Monate in wiederkehrenden Schüben auf, sollte eine hereditäre Pathogenese in Betracht gezogen werden. Hinweise auf das Vorliegen eines HAE können sich aus der Familienanamnese und der Ausprägung mit Beteiligung viszeraler Organe, die bei Anfällen mit Bauchschmerzen einhergehen kann, ergeben. HAE wird typischerweise in der Kindheit oder im jungen Erwachsenenalter symptomatisch, Etwa 50% der Patienten zeigen bis zum Alter von zehn Jahren Symptome, wobei Häufigkeit und Schweregrad der Attacken nach der Pubertät häufig zunehmen. Bis zum Alter von zwanzig Jahren prägen fast alle HAE-Patienten Symptome aus (53). Um das HAE nachzuweisen und den Typ zu ermitteln sind biochemische Tests meist ausreichend. Erniedrigte Serumkonzentrationen des Komplementfaktors C4 deuten auf ein HAE-C1-INH hin. Dies muss anschließend durch direkte Bestimmung von C1-INH und seiner Funktionalität bestätigt werden. Typ I weist eine erniedrigte Konzentration und Funktionalität von C1-INH auf, wohingegen bei Typ II nur die Funktionalität reduziert ist. Die biochemischen Tests für HAE-C1-INH sind ausreichend empfindlich und spezifisch, sodass eine genetische Sequenzierung auf *SERPING1*-Mutationen in der Regel nicht notwendig ist, um die Diagnose zu stellen (29). Genetische Tests werden jedoch aufgrund fehlender Alternativen zur Identifizierung von HAE-nl-C1-INH, die mit Mutationen von Gerinnungsfaktor FXII bzw. Hagemann-Faktor (HAE-FXII, *F12*-Gen) (24), Plasminogen (HAE-PLG, *PLG*-Gen) (25), Angiotensinogen 1 (HAE-ANGPT1, *ANGPT1*-Gen) (26), Kininogen-1 (HAE-KNG1, *KNG1*-Gen) (27) oder anderer Gene (HAE-U, unbekanntes Gen) (28) einhergehen können, verwendet (20). Tests auf AAE-C1-INH sind sinnvoll bei Patienten, bei denen eine Erstmanifestation des Angioödems eher untypisch erst im höheren Alter aufgetreten ist ( $\geq 40$  Jahre) oder Patienten mit begleitenden lymphoproliferativen oder autoimmunbedingten Störungen. Anders als beim HAE-C1-INH zeigt sich in 80% der AAE-C1-INH eine erniedrigte Serumkonzentration des Komplementfaktors C1q (54).

**Pharmakologische Therapie** Die Prophylaxe und Behandlung akuter Angioödem-Attacken basiert entweder auf der Hemmung der Bradykinin-Synthese oder des B2-Rezeptors. Eine Hemmung der Bradykinin-Synthese kann durch Substitution von aus Plasma gewonnenem (Berinert® und Cinryze®, akut und prophylaktisch vor operativen Eingriffen) oder rekombinantem (Ruconest®, akut) C1-INH erzielt werden (55). Darüber hinaus ist es auch

möglich, Plasmakallikrein durch das rekombinante Peptid Ecallantid (Kalbitor<sup>®</sup>, nur USA, akut)(56), den Kallikrein-Antikörper Lanadelumab (Takhzyro<sup>®</sup>, prophylaktisch)(57) oder den niedermolekularen Kallikrein-Inhibitor Berotralstat (Orladeyo<sup>®</sup>, prophylaktisch)(58) direkt zu hemmen. Icatibant (Fyrazyr<sup>®</sup>, akut)(6) ist der einzige zugelassene Vertreter der B2-Antagonisten, wobei bereits an weiteren, niedermolekularen B2-Antagonisten geforscht wird (59). Die Zulassungen der sich derzeit auf dem Markt befindlichen Pharmaka zur Therapie von Angioödemem beziehen sich alle nur auf das HAE-C1-INH, sodass jegliche Anwendung bei anderen Formen wie RAE off-label erfolgt. In Anbetracht der Tatsache, dass ACEi-induzierte Angioödeme lebensbedrohlich sein können und es keine zugelassene Behandlung gibt, wird trotz begrenzter Nachweise zur Wirksamkeit Icatibant als Mittel der ersten Wahl für die Behandlung schwerer Verlaufsformen empfohlen (30).

## 1.2 Endothelpermeabilität und Extravasation

Das Angioödem ist ein Zustand, der durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße charakterisiert ist (1). Unter physiologischen Bedingungen bildet die Blutgefäßwand eine Barriere für Flüssigkeiten, gelöste Stoffe und Zellen, die im Gefäßsystem zirkulieren. Diese Barriere wird in erster Linie von Endothelzellen gebildet, die die innere Oberfläche der Blutgefäße auskleiden. Die vaskuläre Barriere ist jedoch nicht völlig dicht, sondern lässt einen geregelten Transport von Bestandteilen des Bluts bzw. Plasmas in den interstitiellen Raum zu. Dieser Prozess wird Extravasation genannt und findet vorwiegend in kleinen Gefäßen, insbesondere in Kapillaren und postkapillären Venolen, statt. Die überwiegende Mehrheit dieser Stoffe hat ein niedriges Molekulargewicht und eine höhere Konzentration im Plasma als im Interstitium, weshalb sie durch passive Diffusion das Endothel passieren können. Fortwährend werden so Ionen, Gase, Hormone und Nährstoffe kontinuierlich durch die Endothelschicht aller mikrovaskulären Betten transportiert, um die Zellen des Körpers mit Energieträgern und anderen wichtigen löslichen Faktoren zu versorgen. Neben der passiven Diffusion werden weitere konstitutive Transportprozesse durch eine Vielzahl von Mechanismen vermittelt, an denen passive und aktive Transporter, Ionenkanäle sowie transzelluläre Vesikeltransportsysteme beteiligt sind (60). Größere Plasmaproteine wie Albumin und andere Makromoleküle mit einer Größe über 40 kDa können so auch unter physiologischen Bedingungen die Endothelschicht von der luminalen zur basolateralen Seite passieren. Dieser transzelluläre Transport (Transcytose) kann durch Caveolae oder vesiculo-vacuolare Organellen (VVOs) erfolgen (Abb. 2) (61,62).



**Abb. 2:** Vereinfachte Darstellung der transendothelialen Transportwege. Neben der passiven Diffusion kleinerer Moleküle wie Gasen können größere Verbindungen auch auf transzellulärem oder parazellulärem Weg das Endothel passieren. Der transzelluläre Transport kann passiv oder aktiv durch Kanäle und Transporter erfolgen oder aber durch Vesikeltransportsysteme wie Caveolae oder vesiculo-vacuolare Organellen (VVOs). Makromoleküle und Zellen gelangen hingegen insbesondere über den parazellulären Weg von der luminalen zur basolateralen Seite des Endothels (63).

Darüber hinaus sind Endothelzellen jedoch auf weitere mechanische und humorale Faktoren angewiesen, um die endotheliale Barrierefunktion und Extravasation zu regulieren. Unter pathologischen Bedingungen, z. B. bei Entzündungen, werden endotheliale Signalkaskaden durch Mediatoren wie Bradykinin oder Histamin aktiviert, die zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und zur Extravasation von Plasma, Plasmaproteinen und Immunzellen führen. Der Anstieg der Extravasation resultiert zum einen aus einem gesteigerten Blutfluss durch Freisetzung vasodilatierender Faktoren wie  $\text{PGI}_2$  oder Stickstoffmonoxid (NO) (12). Zum anderen kommt es zu einem lokalen Verlust des Kontakts zwischen mikrovaskulären Endothelzellen aufgrund von Veränderungen der zellulären Kontraktilität und der Öffnung der interzellulären Verbindungen, wodurch insbesondere der Transport auf parazellulärem Weg ermöglicht wird. Die Zell-Zell-Verbindungen werden dabei von zwei großen Proteinkomplexen gebildet, den Tight Junctions (TJs) und den Adherens Junctions (AJs), die sich unter bestimmten Bedingungen auseinander bewegen, öffnen oder internalisiert werden können, um Raum zwischen den Endothelzellen zu schaffen, damit Flüssigkeit oder Zellen in den interstitiellen Raum gelangen können (60).

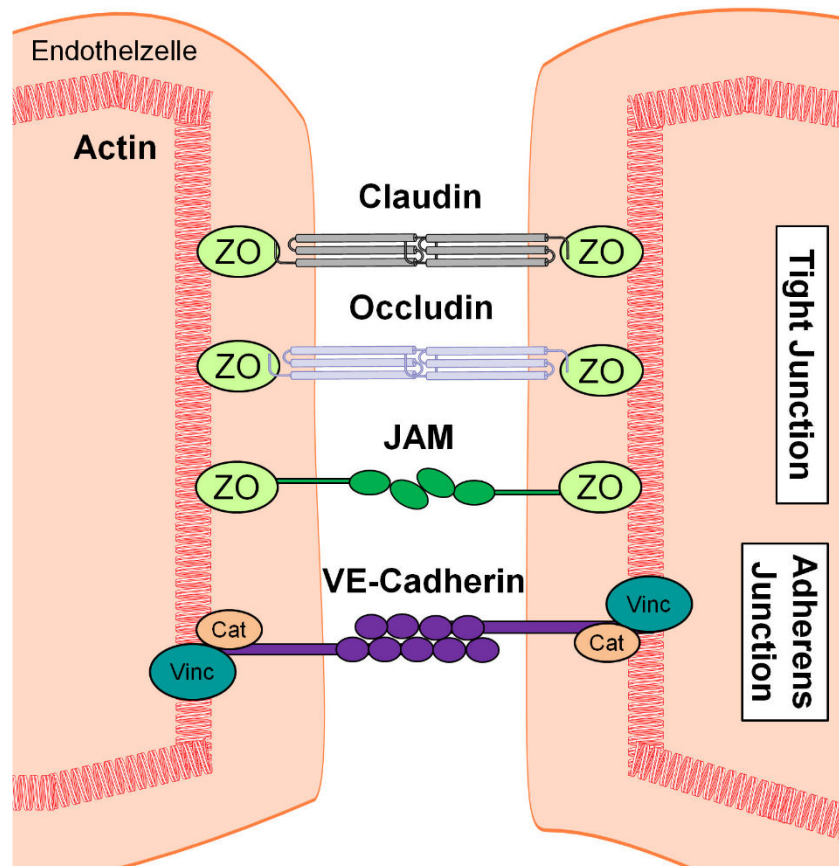
**Adherens Junctions** AJs sind Proteinkomplexe, die Zell-Zell-Verbindungen bilden. Mit ihrem cytoplasmatischen Teil sind sie an das Actomyosin-Cytoskelett der Endothelzelle gebunden, wodurch sie effektiv die Cytoskelette benachbarter Zellen verbinden. Vasculäres endotheliales (VE)-Cadherin wird spezifisch in Endothelzellen exprimiert und ist im Komplex mit Proteinen der Catenin-Familie strukturell und funktionell ein zentraler Bestandteil

der AJ. VE-Cadherin bildet über homophile,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktionen seiner extrazellulären Domänen Zell-Zell-Verbindungen aus. Je nach Konformation dieser Verbindungen und des damit verbundenen Actomyosin-Cytoskeletts interagiert der VE-Cadherin/Catenin-Komplex mit verschiedenen anderen Proteinen, darunter Aktin-bindenden Proteinen wie Vinculin (Abb. 3). Die Verbindung zum Actomyosin-Cytoskelett ist wichtig für die Regulierung der adhesiven Eigenschaften des VE-Cadherins (64). Im ruhenden Endothel sind die AJ durch kortikale Aktinbündel ausgerichtet. Unter diesen Bedingungen unterstützen lineare AJ die Stabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen (369, 551). Permeabilitätserhöhende Faktoren führen zu einer Umstrukturierung des Cytoskeletts durch Kontraktion des Actomyosin-Komplexes, was zu einer Destabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen und Erhöhung der endothelialen Permeabilität führt (65). Ein weiterer entscheidender Faktor ist die Phosphorylierung von VE-Cadherin und assoziierten Proteinen an Tyrosin- und Serinresten durch verschiedene Kinasen, wodurch eine Internalisierung von VE-Cadherin initialisiert werden kann und die Stabilität der darauf basierenden Zell-Zell-Adhäsion abnimmt (66). Da Bradykinin die Signalwege beider Mechanismen initiiert und so die Endothelpermeabilität erhöhen kann, sollen diese entscheidend an der Auslösung von Bradykinin-vermittelten Angioödemem wie HAE beteiligt sein (67).

**Tight Junctions** TJs sind verantwortlich für die starke Adhäsion zwischen Endothelzellen und bilden ebenfalls einen Komplex aus mehreren Proteinen wie Claudinen, Occludinen, JAMs (Junctional adhesion molecules) und ESAMs (Endothelial cell-selective adhesion molecules) (Abb. 3) (68). Sie interagieren über intrazelluläre Proteine wie Zona occludens-Proteine ebenfalls mit dem Cytoskelett (69). Anders als beispielsweise im Endothel von Gefäßen des Gehirns, wo die TJ zur Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke besonders stark ausgeprägt sein müssen, sind sie im Endothel der Kapillaren und postkapillären Venolen deutlich einfacher ausgebildet und lockerer organisiert, da hier besonders viele basale Transportvorgänge und Extravasation stattfinden (70). In mikrovaskulären Endothelien tragen TJ daher anders als AJ weniger zur Regulation der endothelialen Permeabilität bei (71).

### 1.3 Das Kallikrein-Kinin-System

Kallikrein und Kinine sind Bestandteile eines komplexen regulatorischen Systems aus biologisch aktiven Peptiden, das an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist und vereinfacht als Kallikrein-Kinin-System (KKS) bezeichnet wird. Die Mechanismen umfassen unter anderem die Regulierung des Blutdrucks und der Natriumhomöostase oder die Beteiligung an Entzündungsprozessen (72). Die ersten Beschreibungen des KKS stammen aus dem Jahr 1930 in dem Kraut *et al.* nach Injektion von menschlichem Urin in



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der endothelialen Zell-Zell-Verknüpfungen. Die Zell-Zell-Verbindungen werden von zwei großen Proteinkomplexen gebildet, den Tight Junctions und den Adherens Junctions, die sich auseinander bewegen, öffnen oder internalisiert werden können, und so parazellulären Transport ermöglichen. Während sich Tight Junctions aus Proteinen wie Claudin, Occludin oder JAMs (Junctional adhesion molecules) bilden, die über Zona occludens (ZO)-Proteine an kortikale Actinfilamente gebunden sind, ist das Hauptprotein der Adherens Junctions Vaskuläres endotheliales (VE)-Cadherin. Dieses bildet einen Komplex mit Proteinen der Catenin-Familie (Cat) und kann neben der direkten Bindung zum Actin-Cytoskelett noch über weitere Actin-bindende Proteine wie Vinculin (Vinc) interagieren (63).

den Blutkreislauf von Hunden eine blutdrucksenkende Wirkung beobachten konnten. Die Entdeckung der damals vermuteten verantwortlichen Substanz in Extrakten des Pankreas führte letztlich zum Namen Kallikrein (von griechisch: *kallikreas* = „schönes Fleisch“, synonym für Pankreas bzw. Bauchspeicheldrüse) (73). Als Eugen Werle einige Jahre später Versuche mit Kallikrein im Blutserum durchführte, machte er für die Wirkung die proteolytische Spaltung eines Plasmaproteins, Kininogen, unter Bildung eines thermostabilen Polypeptids verantwortlich, das in der Lage ist, das isolierte Ileum von Meerschweinchen zu kontrahieren. Dieses damals als DK bezeichnete Oligopeptid war das erste entdeckte Kinin und ist heute als Kallidin bzw. Lysyl-Bradykinin bekannt (74,75). Erste Beschreibungen von Bradykinin wurden 1949 von Rocha e Silva *et al.* geliefert. Bei der Untersuchung der physiologischen Wirkungen des Schlangengifts der Grubenotter *Bothrops jararaca*, stellten sie nach Inkubation der aus Hundeplasma gewonnenen Globulinfraktion mit dem Gift fest, dass



diese die Kontraktion isolierter Ileumpräparate aus Meerschweinchen stimulierte. Diese Wirkung konnte jedoch nicht auf das Schlangengift selbst zurückgeführt werden (76). Die Entdeckung beschreibt die erste bekannte Wirkung von Bradykinin im Zusammenhang mit der Regulierung glatter Muskulatur. Damals wurde dem Schlangengift eine Bradykinin-verstärkende Wirkung zugeschrieben, da Patienten, die von *Bothrops jararaca* gebissen wurden, einen starken Blutdruckabfall entwickelten. Erst Jahre später wurde diese Wirkung auf die Hemmung des wichtigsten Bradykinin-degradierenden Enzyms, ACE, zurückgeführt (77). Auf der Grundlage der ACE-hemmenden Peptidsequenz aus dem Schlangengift wurde Captopril als erster oral verfügbarer ACEi entwickelt und bis heute werden Captopril und neuere Derivate zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt (78). Inzwischen ist belegt, dass Bradykinin nicht nur an der Regulierung des Gefäßtonus beteiligt ist, sondern auch viele weitere physiologische und pathophysiologische Prozesse wie Entzündung, Nozizeption und Endothelpermeabilität vermittelt (79).

### 1.3.1 Biosynthese und Abbau der Kinine

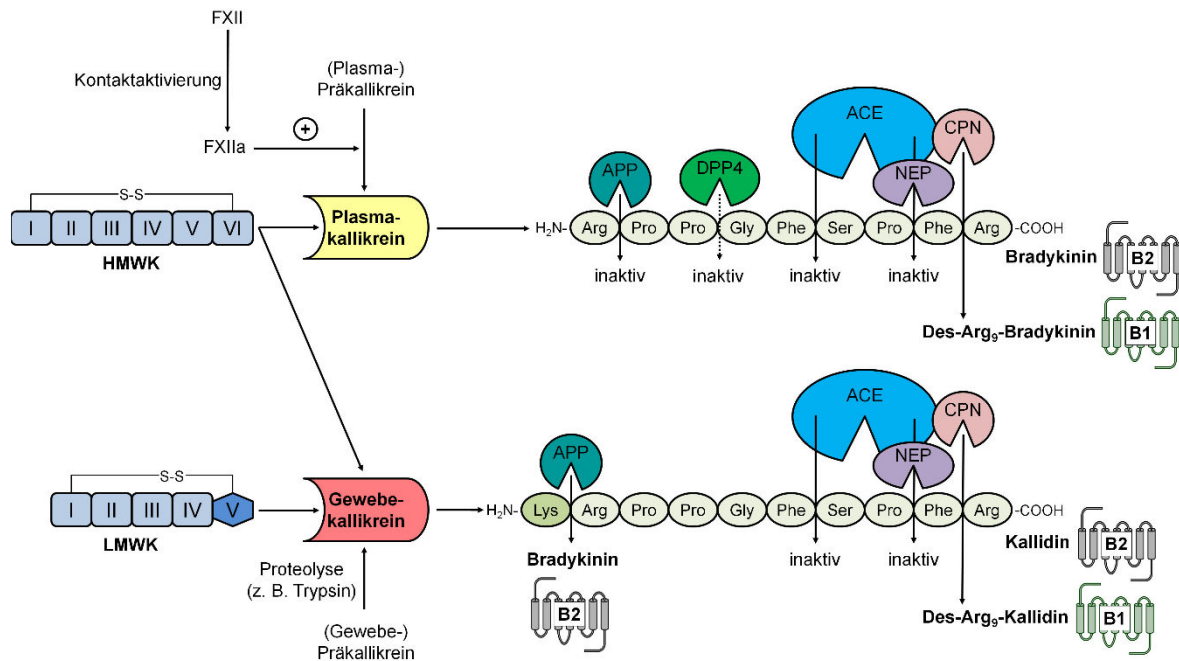
Das Nonapeptid Bradykinin und auch das Decapeptid Lysyl-Bradykinin (Kallidin) werden von spezifischen Serinproteasen, sogenannten Kallikreinen, aus Kininogenen, die in der Leber produziert werden, freigesetzt. Bei den Kininogenen handelt es sich um niedermolekulares Kininogen (LMWK) und hochmolekulares Kininogen (HMWK), die durch alternatives Spleißen aus dem gleichen Gen (*KNG1*) als Multidomänen-Proteine hervorgehen und sich durch eine veränderte fünfte und zusätzliche C-terminale sechste Domäne im HMWK unterscheiden (Abb. 4) (80). Beide Kininogene sind Substrate für die proteolytische Freisetzung von Kininen durch Gewebe- bzw. Plasmakallikrein (81). Diese werden zunächst in Form inaktiver Vorstufen synthetisiert. Während die Bildung von Gewebekallikrein in einer Vielzahl von Geweben und sekretorischen Organen erfolgt, wird Plasmakallikrein hauptsächlich in der Leber produziert und kann in vergleichsweise höheren Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden (82). Die inaktive Vorstufe (Plasma-)Präkallikrein zirkuliert als Komplex mit HMWK im Plasma und bildet so nach Aktivierung den Hauptweg der Kininsynthese unter Bildung von Bradykinin. Der Präkallikrein/HMWK-Komplex ist in der Lage, an der Oberfläche von Endothelzellen zu binden, sodass im Rahmen der Kontaktaktivierung der Gerinnungsfaktor FXIIa Präkallikrein aktivieren kann und Bradykinin aus HMWK freigesetzt wird (83). Da Kallikrein wiederum in der Lage ist, FXII zu FXIIa zu aktivieren, wird dieser Effekt durch eine positive Rückkopplung noch weiter verstärkt (84). Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung von Gewebe-Präkallikrein nicht an das System der Kontaktaktivierung gekoppelt und kann durch verschiedene Proteasen wie Trypsin erfolgen. Gewebekallikrein setzt insbesondere LMWK aber auch mit geringerer Affinität HMWK zum

Decapeptid Kallidin um (85). Sowohl Bradykinin als auch Kallidin können anschließend ihre Wirkung über Aktivierung des B2-Rezeptors vermitteln (83).

Kinine unterliegen mit einer Plasmahalbwertszeit von weniger als 30 Sekunden einem raschen enzymatischen Abbau durch Peptidasen (86). Es handelt sich um Zink-abhängige Metalloproteasen, die in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten vorkommen (83). Dazu gehören neben ACE (synonym: Kininase II) auch NEP, Aminopeptidase P (APP) und Carboxypeptidase N (CPN, synonym: Kininase I) (Abb. 4) (87). DPP4 ist hingegen nur in der Lage, das bereits inaktive APP-generierte Bradykinin<sub>[2-9]</sub> weiter zu degradieren (83). Die enzymatische Hydrolyse führt meistens zur Inaktivierung des Kinins, allen voran durch eine ACE-vermittelte C-terminale Dipeptidabspaltung. Allerdings können auch weiterhin biologisch aktive Metaboliten hervorgehen. So führt die Umsetzung von Kallidin mit APP zum Verlust des C-terminalen L-Lysins unter Bildung von Bradykinin. CPN spaltet hingegen C-terminales L-Arginin ab, was in der Bildung der Des-Arg<sup>9</sup>-Metaboliten und Steigerung der Affinität zum Bradykinin-B1-Rezeptor (B1) resultiert (83).

### 1.3.2 Kininrezeptoren und Signalwege

Kinine wie Bradykinin (Abb. 4) sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen beteiligt wie der Vasodilatation, Erhöhung der Endothelpermeabilität, Entzündung, Nozizeption oder der Natriurese (79). Diese Wirkungen werden durch die homologen Kininrezeptoren B1 und B2 vermittelt, bei denen es sich um Guanine nucleotide-binding (G)-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) handelt, die über sieben Transmembranhelices verfügen (88). B2 wird in einer Vielzahl von Geweben konstitutiv exprimiert und spielt insbesondere bei akuten Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu ist die Expression von B1 in gesundem Gewebe gering, steigt jedoch durch Verletzungen und Entzündungen an (89). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überaktivierung von B2 eine wichtige Rolle bei ACEi-induzierten Angioödemem spielt (90). Ebenso wird angenommen, dass die B2-Aktivierung auch an Angioödemem beteiligt ist, die im Zusammenhang mit der Anwendung von ARB wie Losartan (91), DPP4-Hemmern wie Vildagliptin (32) oder auch dem NEP-Inhibitor Sacubitril (10) stehen.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Kallikrein-vermittelten Kininsynthese aus Kininogenen und des enzymatischen Kininabbaus. Die Synthese des Nonapeptids Bradykinin erfolgt aus hochmolekularem Kininogen (High Molecular Weight Kininogen, HMWK), welches sich aus sechs Domänen zusammensetzt (I bis VI). Dafür verantwortlich ist Plasmakallikrein, welches wiederum zuvor durch den kontaktaktivierten Faktor XII (FXIIa) aktiviert wird. Das Decapeptid Kallidin (synonym: Lys-Bradykinin) kann entweder aus HMWK oder niedermolekularem Kininogen (Low Molecular Weight Kininogen, LMWK, Domänen I bis V) durch Umsetzung mittels Gewebekallikrein, welches im Vorfeld durch Proteolyse durch z. B. Trypsin aktiviert werden kann, gebildet. Der Abbau der Kinine zu meist inaktiven Metaboliten erfolgt durch Zink-abhängige Metalloproteasen, allen voran ACE (Angiotensin-converting enzyme) aber auch Nephrylysin (NEP), welche sequentiell C-terminale Dipeptide abspalten. APP (Aminopeptidase P) kann Kallidin durch Entfernung des N-terminalen Lysins in Bradykinin überführen, wohingegen die weitere Umsetzung durch APP zur Inaktivierung führt und auch erst dann ein weiterer Abbau durch Dipeptidylpeptidase IV (DPP4, gestrichelter Pfeil) erfolgen kann. Im Gegensatz dazu können jedoch auch aktive Metaboliten durch Abspaltung des C-terminalen Arginins mittels Carboxypeptidase N (CPN) resultieren. Während Bradykinin und Kallidin ihre Wirkung über den Bradykinin-B2-Rezeptor (B2) vermitteln, zeigen ihre Des-Arg<sub>9</sub>-Derivate eine deutlich höhere Affinität zum Bradykinin-B1-Rezeptor (B1) (83,85).

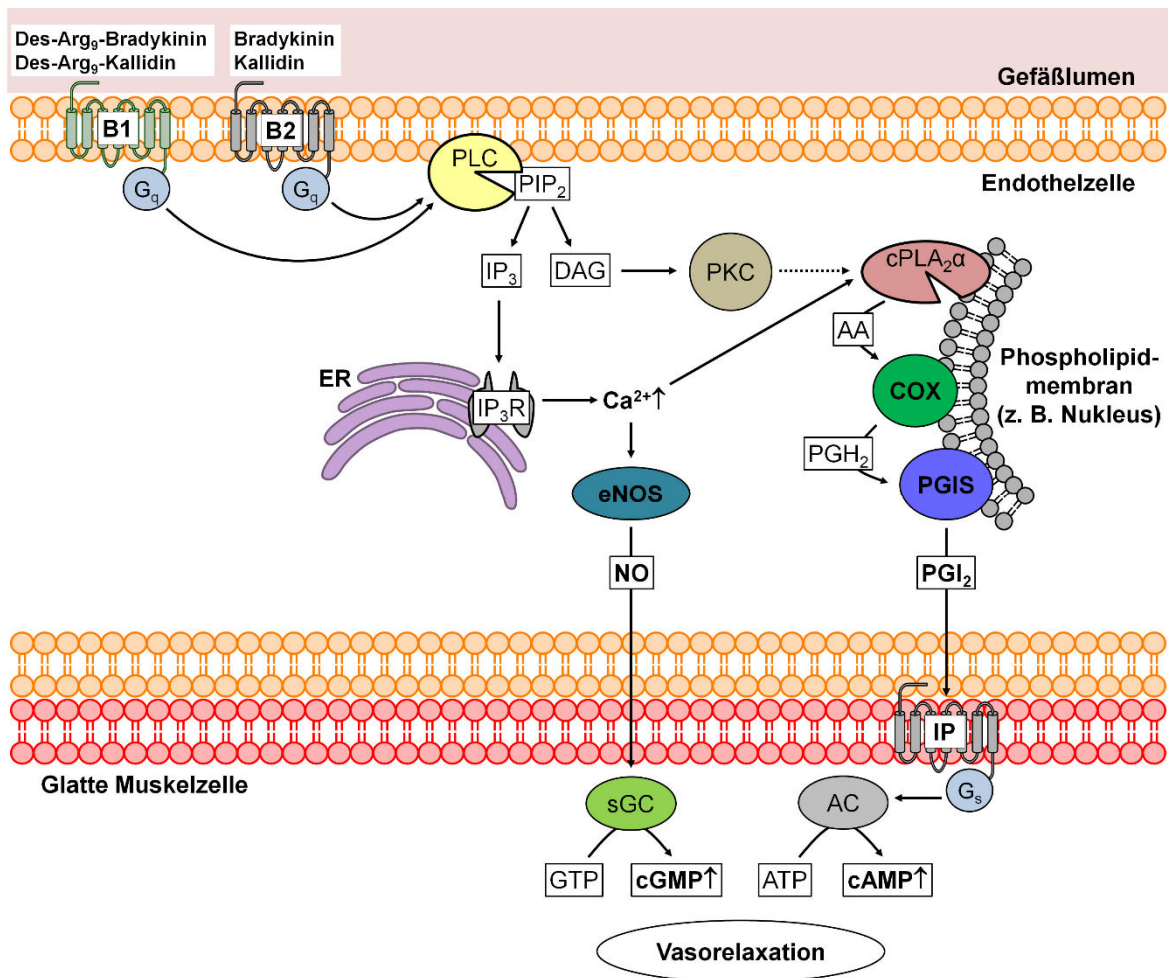
Sowohl B1 als auch B2 sind GPCRs, die in der Regel an G<sub>q</sub>-Proteine gekoppelt sind und deren Aktivierung eine Stimulation der Phospholipase C (PLC) nach sich zieht (Abb. 5). PLC hydrolysiert das in der Phospholipidmembran vorhandene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und produziert so Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> ermöglicht die Freisetzung von Calciumionen (Ca<sup>2+</sup>) aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die an mehreren Phosphorylierungskaskaden beteiligt ist. Die Phosphorylierung von Zielproteinen fördert in Verbindung mit Ca<sup>2+</sup> die Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>α (cPLA<sub>2</sub>α) und damit die Bildung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden (83). Ca<sup>2+</sup> kann als Komplex mit Calmodulin (CaM) weitere Proteine wie die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (Myosin light chain kinase, MLCK) aktivieren und in Endothelzellen eine Retraktion bewirken, die die Erhöhung der endothelialen Permeabilität zur Folge haben kann (92).

Des Weiteren ist CaM in der Lage die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) zu aktivieren, ein Enzym, das NO aus L-Arginin synthetisiert. NO kann in benachbarte glatte Muskelzellen diffundieren und stimuliert die lösliche Guanylatcyclase (sGC), die Guanosin triphosphat (GTP) in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt (93). Darüber hinaus wird COX-abhängiges PGI<sub>2</sub> synthetisiert, welches als parakriner Mediator durch Stimulierung des PGI<sub>2</sub>-Rezeptors (IP) die Adenylatcyclase (AC) in glatten Muskelzellen aktivieren kann und in einer vermehrten Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosin triphosphat (ATP) resultiert (94). Steigende Konzentrationen von cGMP und cAMP in glatten Muskelzellen führen zu einer Abnahme des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels und damit zur Relaxation glatter Muskulatur. Dies wird durch die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen wie der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) oder der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG) erreicht, die nachfolgend Schlüsselproteine, die den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel kontrollieren (z. B. Ionenkanäle und Ca<sup>2+</sup>-Pumpen), regulieren (95).

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Wirkung von Bradykinin spielt das Protein  $\beta$ -Arrestin.  $\beta$ -Arrestine sind in der Lage, durch Bindung an GPCRs, diese zu desensibilisieren, indem sie die endosomale Internalisierung der Rezeptoren initiieren oder sie funktionell von ihren G-Proteinen entkoppeln. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des konstitutiv exprimierten B2-Rezeptors eine schnelle Desensibilisierung und Internalisierung nach sich zieht. Trotz der hohen Affinität von  $\beta$ -Arrestin zu B2 kommt es in den Endosomen zu einer schnellen Dissoziation des B2/ $\beta$ -Arrestin-Komplexes und erneuten funktionellen Eingliederung des Rezeptors in die Plasmamembran (96). Es konnte nachgewiesen werden, dass B2 am intrazellulär lokalisierten C-Terminus über eine spezifische Sequenz aus den polaren Aminosäuren Serin und Threonin verfügt, über die  $\beta$ -Arrestin binden kann. Die Stabilität des  $\beta$ -Arrestin/Rezeptor-Komplexes kann unter anderem durch die Phosphorylierung dieses Serin/Threonin-Clusters reguliert werden, sodass auf diesem Wege die Resensibilisierung des B2-Rezeptors und damit die Wirkung von Bradykinin reguliert werden kann (97).

Die Synthese von Prostanoiden und weiteren Arachidonsäure-Metaboliten als Reaktion auf die B2-Aktivierung und deren Bedeutung für das Bradykinin-induzierte Angioödem sind der Fokus dieser wissenschaftlichen Arbeit. Sie werden über verschiedene Stoffwechselwege gebildet, die von COX, 5-LOX oder Cytochrom P450-Enzymen (CYP) initiiert werden. Die resultierenden Prostanoiden, CysLTs und Epoxyeicosatriensäuren (EET) können unter anderem zur Regulierung von Gefäßpermeabilität und Gefäßtonus, Entzündungsprozessen sowie der Immunantwort beitragen (98). Aus pathologischer Sicht spielt insbesondere die Beteiligung von Prostanoiden eine wichtige Rolle bei bestimmten Formen von Allergien,

Autoimmunerkrankungen und vermutlich bei Bradykinin-induzierten Angioödemem (99,100).



**Abb. 5:** Vereinfachte Darstellung der Signalwege nach Aktivierung der endothelialen G<sub>q</sub>-gekoppelten Kininrezeptoren B1 und B2, die zur Vasorelaxation führen. Nach Bindung der Liganden Bradykinin bzw. Kallidin an den Bradykinin-B2- (B2) oder ihrer Des-Arg<sub>9</sub>-Metabolite an den Bradykinin-B1-Rezeptor (B1) kommt es zur Dissoziation der α-Untereinheit des G<sub>q</sub>-Proteins und Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese setzt Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) um. IP<sub>3</sub> ermöglicht die Freisetzung von Calciumionen (Ca<sup>2+</sup>) aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Cytosol über Aktivierung des IP<sub>3</sub>-Rezeptors (IP<sub>3</sub>R), während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die an mehreren Phosphorylierungskaskaden beteiligt ist. Die Phosphorylierung von Zielproteinen fördert in Verbindung mit Ca<sup>2+</sup> die Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>α (cPLA<sub>2</sub>α), die daraufhin insbesondere zur Phospholipidmembran des Nukleus, des Golgi-Apparats oder des ER transloziert und dort Arachidonsäure (AA) freisetzt (101). AA wird durch COX zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) und durch Prostacyclin-Synthase (PGIS) zu Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) umgewandelt, welches durch Stimulation von G<sub>s</sub>-gekoppelten PGI<sub>2</sub>-Rezeptoren (IP) an der Oberfläche glatter Muskelzellen über Adenylatcyclase (AC) zu einer vermehrten Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosinriphosphat (ATP) führt. Gleichzeitig wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) Stickstoffmonoxid (NO) produziert, das in die glatte Muskelzelle diffundiert. NO stimuliert die lösliche Guanylatcyclase (sGC) unter Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosinriphosphat (GTP). Das Resultat ist eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (83).

## 1.4 Prostanoid

Prostanoid sind eine Familie vorwiegend biologisch aktiver Verbindungen, die sich aus den PGs und Thromboxanen (TX) zusammensetzt. Sie sind Überträger von inter- und intrazellulären Signalen, die eine Vielzahl von (patho-)physiologischen Funktionen vermitteln wie unter anderem Entzündungsprozesse, Thrombozytenaggregation oder Vasokonstriktion und -relaxation (102). Spätestens mit der Verleihung des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin 1982 an Bergström, Samuelsson und Vane für ihre „bahnbrechenden Arbeiten auf dem Gebiet der Prostaglandine und nahe verwandter biologischer Substanzen“ stellte sich heraus, welches Potential die pharmakologische Beeinflussung dieser körpereigenen Substanzen in sich birgt (103). PG haben ihren Ursprung in den Arbeiten von Euler und Goldblatt aus den frühen 1930er Jahren, deren Experimente gezeigt haben, dass die Verabreichung menschlicher Samenflüssigkeit und menschlichen Prostatasekrets in den Blutkreislauf von Kaninchen zu einer Senkung des Blutdrucks sowie Kontraktion der glatten Darm- und Uterusmuskulatur führt. In der Annahme, die dafür verantwortliche Substanz stamme aus der Prostata des Mannes (englisch: prostate gland), wurde sie kurzerhand als „Prostaglandin“ bezeichnet (104-106). Heutzutage ist bekannt, dass es sich nicht nur um eine einzelne Substanz handelt, sondern PGs zusammen mit TX eine ganze Gruppe größtenteils biologisch aktiver Verbindungen bilden, die als Prostanoid bezeichnet werden (107,108). Letztlich ausschlaggebend waren jedoch die Arbeiten der Nobelpreisträger: Bergström und Samuelsson gelang es in den 1950er und 1960er Jahren, die ersten PG-Isomere aufzureinigen und zu isolieren (109) und zudem 1964 gleichzeitig mit van Dorp *et al.* die vierfach ungesättigte Omega-6-Fettsäure Arachidonsäure als Hauptvorstufe der PGs und TX zu identifizieren (110,111). Dagegen lag der Fokus von Vane insbesondere auf der Aufklärung der Struktur, Biosynthese und den Eigenschaften des vasoaktiven Prostanoids PGI<sub>2</sub> (112,113).

### 1.4.1 Struktur und Einteilung

Chemisch betrachtet handelt es sich bei den Prostanoiden wie auch bei den Leukotrienen und EETs um Vertreter aus der Gruppe der Eicosanoide (griechisch: *eicosa* = zwanzig), die über zwanzig Kohlenstoffatome verfügen und aus bestimmten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren hervorgehen. In der Folge verfügen PG über gemeinsame Strukturelemente wie einen Cyclopentan-Ring, eine *trans*-Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C<sub>13</sub> und C<sub>14</sub> und eine Hydroxylgruppe an Position 15 (Abb. 6) (114). Gemeinsam mit den TX, die einen Cyclohexan- anstelle eines Cyclopentan-Rings aufweisen, bilden sie die Untergruppe der Prostanoid (102). PGs werden in Abhängigkeit von den Modifizierungen des

Cyclopentans in die Typen A bis J eingeteilt. Die Typen A bis C und J entstehen allerdings durch Dehydratisierung anderer PGs und Isomerisierung *in vitro*, sodass diese als Artefakte im Rahmen von Extraktionsprozessen auftreten (115). In Anlehnung daran werden TX, abhängig von den Substituenten des Cyclohexans, in A und B unterteilt (116). Zur näheren Klassifizierung erfolgt des Weiteren die Angabe einer Indexzahl (z. B. PGE<sub>2</sub> oder TXA<sub>2</sub>), die aussagt, über wie viele Doppelbindungen das Prostanoid verfügt. Basierend auf dieser Anzahl erfolgt die Einteilung in die Reihen 1, 2 oder 3, wobei das entsprechende PG bzw. TX jeweils aus der Vorläuferfettsäure Dihomo- $\gamma$ -linolensäure [20:3 ( $\omega$ -6)], Arachidonsäure [20:4 ( $\omega$ -6)] oder Eicosa-5,8,11,14,17-pentaensäure [20:5 ( $\omega$ -3)] hervorgeht (114). Die zusätzliche Angabe des griechischen Buchstabens  $\alpha$  in Kombination mit der Indexzahl (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , Abb. 6) bezieht sich auf die Konfiguration des Substituenten an Kohlenstoffatom C<sub>9</sub>, im Fall von PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  eine Hydroxylgruppe (117).

#### 1.4.2 Cyclooxygenase-abhängige Biosynthese

In Säugetieren (einschließlich Menschen) kommt von den erwähnten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die als Vorläufer der Prostanoiden dienen, überwiegend Arachidonsäure vor. Daher werden vornehmlich die bekannten physiologisch wichtigen PGs und TX der Reihe 2 (z. B. PGE<sub>2</sub>) gebildet (102). Da Prostanoiden im Körper nicht gespeichert werden, erfolgt die Synthese *de novo* nach Zellaktivierung durch mechanisches Trauma, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Mediatoren wie Bradykinin oder Thrombin (108). Zunächst jedoch wird in Reaktion auf physiologische und pathologische Signale Arachidonsäure aus Phospholipidmembranen freigesetzt. Das Schlüsselenzym bei diesem entscheidenden Schritt ist cPLA<sub>2 $\alpha$</sub>  (synonym: cPLA<sub>2</sub>-4A), die anders als andere Acylhydrolasen der Gruppe IV PLA<sub>2</sub>-Familie aufgrund der besonderen Struktur des aktiven Zentrums eine Selektivität für Arachidonoylreste der Phospholipide aufweist (101,118). Dafür essentiell ist die Bindung von Ca<sup>2+</sup>, was zu einer Erhöhung der Membranaffinität führt und die Translokation des Enzyms vom Cytosol zu den Phospholipidmembranen des Golgi-Apparats, des Endoplasmatischen Retikulums oder des Nukleus initiiert, wo letztlich die Freisetzung der Arachidonsäure durch Hydrolyse der Esterbindung stattfindet (119,120). Die Reaktion, in der Arachidonsäure enzymatisch zum endoperoxidhaltigen PGG<sub>2</sub> cyclisiert und oxidiert wird, erfolgt substratgesteuert durch COX (synonym: PG-G/H-Synthase, PG-Endoperoxid-Synthase), die membrangebunden im endoplasmatischem Retikulum und in der Zellkernmembran vorliegen (121,122). Gleichermaßen katalysieren COX die weitere Reduktion des instabilen Hydroperoxids in PGG<sub>2</sub> zur Hydroxylgruppe unter Bildung von PGH<sub>2</sub> mittels einer separaten

Peroxidase-Untereinheit (123,124).  $\text{PGH}_2$  dient als Substrat gewebsspezifischer Isomerasen und Oxidoreduktasen für die Produktion von  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$  (Abb. 6), die ihre Wirkung über GPCRs entfalten (108).

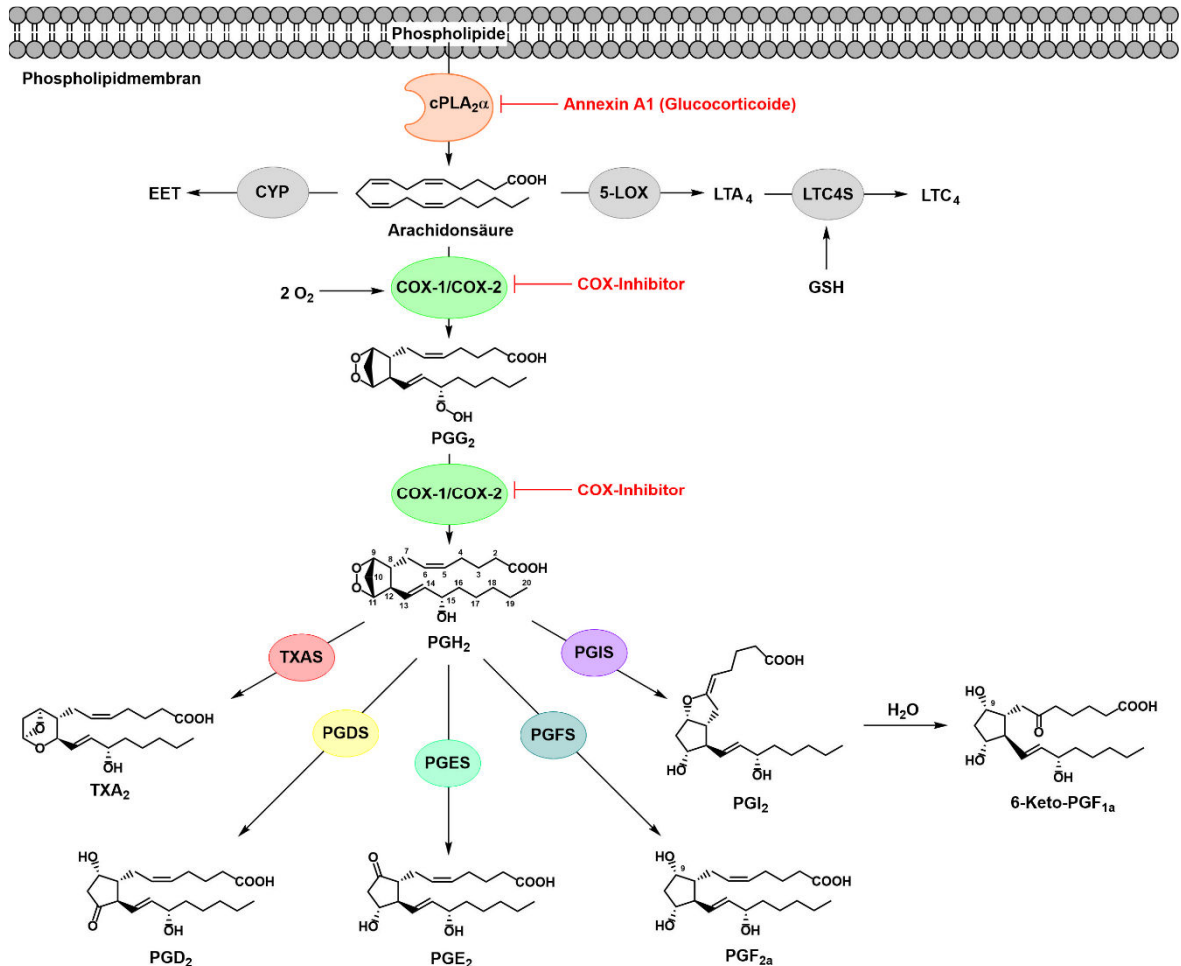
Bereits zu Beginn der 1970er Jahre gab es Hinweise darauf, dass es mehr als ein COX-Enzym gibt, welches für die Bildung der Prostanoiden verantwortlich ist (125). Erst Untersuchungen zur PG-Induktion mithilfe von proinflammatorischen Substanzen und Mitogenen lieferten konkrete Beweise, die diese Hypothese stützten. 1985 berichteten Habenicht *et al.*, dass die Behandlung von Fibroblasten mit Platelet-derived growth factor (PDGF) zu einem frühen (10 min) und einem späten (2 bis 4 h) Peak in der PG-Produktion führt. Dabei stellten sie fest, dass nur der späte Peak mithilfe von Cycloheximid, einer Substanz, die die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen blockiert, gehemmt werden kann (126). Anhand dieser frühen Beobachtungen und weiteren Untersuchungen konnte geschlossen werden, dass die PG-Synthese durch sowohl eine konstitutiv exprimierte (COX-1) als auch eine induzierbare COX (COX-2), die nach Stimulation *de novo* synthetisiert wird, zustande kommt (127). Nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen steht allerdings fest, dass diese vereinfachte Sichtweise, mit der sich z. B. bestimmte (Neben-)Wirkungsprofile von COX-Inhibitoren erklären lassen, nicht ganz korrekt ist, da beide Isoformen sowohl unter physiologischen Bedingungen in menschlichen Geweben vorkommen als auch in verschiedenen pathologischen Zuständen hochreguliert werden können (128). Eine andere Spleißvariante der COX-1, COX-1b (ursprünglich als COX-3 bezeichnet), wird vornehmlich im Gehirn exprimiert und unterscheidet sich nur durch Erhaltung des ersten Introns (129). COX-1 und -2 verfügen ebenfalls über eine sehr ähnliche Struktur, die sich allerdings insbesondere durch eine Aminosäure im aktiven Zentrum (Isoleucin 523 Valin) unterscheidet und so COX-2 durch Ausprägung einer größeren Bindetasche gezielt für Pharmaka wie den COX-2-Inhibitoren bzw. Coxiben zugänglich macht (130).

### 1.4.3 Distribution und Metabolismus

Nach ihrer Synthese sind Prostanoiden in der Lage, die Plasmamembran, neben dem Transport über Effluxpumpen wie MRP1 oder MRP2 (Multidrug-resistance protein), durch Diffusion zu überwinden und ihre Wirkung an membranständigen Rezeptoren der synthetisierenden Zellen (autokrine Wirkung) und benachbarter Zellen (parakrine Wirkung) im Interzellularraum zu entfalten. Prostanoiden liegen bei physiologischem pH von 7,4 größtenteils deprotoniert als organische Anionen vor und weisen damit eine geringe Membranpermeabilität auf. Dennoch kommt es durch Kombination aus elektrochemischen Gradienten auf-



grund der negativen Ladung im Zellinneren und der durch passiven Einstrom erhöhten Protonenkonzentration an der Membran zu einem begünstigten Ausstrom der Prostanoiden (136).



**Abb. 6:** Vereinfachte Darstellung der Arachidonsäurekaskade unter Bildung von Prostanoiden, Leukotrienen und Epoxyeicosatriensäuren (EETs). Die cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>α) setzt zunächst selektiv Arachidonsäure aus Phospholipiden der Membran frei (101). Cyclooxygenasen (COX) können daraufhin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) über die instabile Zwischenstufe Prostaglandin (PG) G<sub>2</sub> PGH<sub>2</sub> bilden, welches als Substrat für die Prostanoidsynthese durch die Isomerasen und Oxidoreduktasen TXA-Synthase (TXAS, Thromboxan A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>), PGD-Synthase (PGDS, PGD<sub>2</sub>), PGE-Synthase (PGES, PGE<sub>2</sub>), PGF-Synthase (PGFS, PGF<sub>2α</sub>) und PGI-Synthase (PGIS, Prostacyclin, PGI<sub>2</sub>) dient (131). PGI<sub>2</sub> verfügt nur über eine sehr kurze Halbwertszeit und wird innerhalb von wenigen Minuten nicht-enzymatisch zum inaktiven jedoch stabileren 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> hydrolysiert (H<sub>2</sub>O), dessen Bestimmung auch zur indirekten Quantifizierung von PGI<sub>2</sub> herangezogen werden kann (132). Die Prostanoidsynthese kann pharmakologisch durch COX-Inhibitoren oder Glucocorticoide, die unter anderem über Hochregulation des physiologischen cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitors Annexin A1 wirken (133), gehemmt werden (rot). Daneben dient Arachidonsäure auch als Substrat für bestimmte Cytochrom P450-Enzyme (CYP), die durch Epoxidierung EETs bilden (134) oder aber für 5-Lipoxygenase (5-LOX), woraus über Bildung von Leukotrien (LT) A<sub>4</sub> und die anschließende LTC<sub>4</sub>-Synthase (LTC<sub>4</sub>S)-vermittelte Konjugation an Glutathion (GSH) das Cysteinyl-Leukotrien LTC<sub>4</sub> hervorgeht (135).

Da ein einzelner Prostanoid-Typ je nach Zelltyp und aktiviertem Rezeptor-Subtyp unterschiedliche Effekte auslösen kann, muss die Signalbeendigung lokal erfolgen, um unerwünschte periphere Effekte zu vermeiden. Neben nicht-enzymatischer Reaktionen, die zu einer Inaktivierung des PG führen, wie der raschen Hydrolyse von  $\text{PGI}_2$  zu 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  (137), führt insbesondere die Oxidation durch die 15-Hydroxy-PG-Dehydrogenase (15-HPGD) zur Bildung eines 15-Keto-Metaboliten mit stark reduzierter biologischer Aktivität (138). Da kaum eine Aktivität der 15-HPGD in Blut und Plasma vorhanden ist, erfolgt die Inaktivierung der Prostanoiden nach Wiederaufnahme in die Zelle durch Transporter wie PGT (PG transporter) und dortiger Oxidation (139,140).

#### 1.4.4 Prostanoidrezeptoren und Signalwege

Prostanoiden werden von den meisten Zellen unseres Körpers gebildet und fungieren als auto- und parakrine Lipidmediatoren (108). Ihre Wirkung entfalten sie durch Aktivierung von GPCRs des Rhodopsin-Typs, die über sieben Transmembrandomänen verfügen und eine starke Homologie aufweisen (131). Für die Prostanoid-Typen  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$  sind acht entsprechend benannte homologe Rezeptorsubtypen bekannt: PGD-Rezeptor 1 (DP1), PGE-Rezeptoren 1-4 (EP1-EP4), PGF- (FP), PGI- (IP) und TX-Rezeptor (TP) (141). Ein weiterer PGD-Rezeptor, das sogenannte Chemoattractant receptor-homologous molecule (CRTh2 bzw. DP2), wird insbesondere auf Typ-2-T-Helferzellen (Th2-Zellen) und Mastzellen exprimiert. DP2 zeigt allerdings keine signifikante Homologie zu DP1 oder anderen Prostanoidrezeptoren und gehört zur Familie der Chemokinrezeptoren (142). Des Weiteren existieren Isoformen des EP3- (acht Varianten), FP- ( $\text{FP}_A$ ,  $\text{FP}_B$ ) und TP-Rezeptors ( $\text{TP}_\alpha$ ,  $\text{TP}_\beta$ ), die durch alternatives Spleißen gebildet werden und sich nur anhand ihrer C-terminalen Sequenzen unterscheiden (143). Außer DP2 koppeln alle diese Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine und lösen nach Aktivierung intrazelluläre Signalwege aus, die Effekte auf die Zellfunktion vermitteln. Diese Rezeptoren können auf der Grundlage ihrer Signaltransduktion und Wirkung auf glatte Muskulatur vereinfacht in drei Kategorien eingeteilt werden: die konstringierenden  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren (EP1, FP, TP), die relaxierenden bzw. stimulatorischen  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren (DP1, EP2, EP4, IP) und der hemmende  $G_i$ -gekoppelte Rezeptor EP3. Die Aktivierung der konstringierenden  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren führt ähnlich wie die Kininrezeptoren B1 und B2 zu einer Aktivierung von PLC und Bildung von  $\text{IP}_3$  und DAG aus  $\text{PIP}_2$ , was in einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration resultiert. Dies führt unter anderem in den glatten Muskelzellen zu einer vermehrten Bildung von Ca/CaM, das die MLCK stimuliert und durch nachfolgende Phosphorylierung der leichten Myosinkette eine Kontraktion glatter Muskelzellen hervorruft (144). Die Aktivierung der relaxierenden  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren führt hingegen durch

Stimulation der AC zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dadurch kommt es zur Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA. Neben der Steuerung  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierender Proteine, was zu einer Reduktion des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  führt, ist PKA außerdem in der Lage, durch Phosphorylierung die Affinität der MLCK zu Ca/CaM zu reduzieren, was eine Erklärung für die relaxierende Wirkung von  $G_s$ -Proteinen auf glatte Muskelzellen darstellt (144). Die vielfältigen Effekte der Prostanoiden sind stark abhängig von den Expressionsmustern ihrer Rezeptoren in den verschiedenen Geweben (131). In Tab. 2 sind die PG-Rezeptoren mit den für wichtige Effekte und Funktionen relevanten Expressionsorten zusammengefasst.

#### 1.4.5 Pharmakologische Hemmung der Prostanoiden

Prostanoiden haben viele Funktionen und können sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse im Körper vermitteln (131). Da sie insbesondere mit Schmerz und Entzündung verbunden werden, ist die Hemmung ihrer Produktion oft wünschenswert. Allerdings kann dies auch zu ernststen Nebenwirkungen führen, die die Therapie einschränken können

**COX-Inhibitoren** COX-Inhibitoren gehören zu der Gruppe der NSAR und entfalten ihre analgetische, antiphlogistische und antipyretische Wirkung durch Hemmung der Bildung von  $\text{PGH}_2$  aus Arachidonsäure und der damit verbundenen Synthese weiterer Prostanoiden. Dabei wird zwischen unselektiven COX-Inhibitoren, die COX-1 und COX-2 mit ähnlicher Affinität hemmen, und selektiven COX-2-Inhibitoren (Coxibe), die eine deutlich höhere Affinität zu COX-2 aufweisen, unterschieden (145). Unselektive COX-Inhibitoren wie Ibuprofen werden oft in der Selbstmedikation zur kurzzeitigen Behandlung von Kopf-, Zahnschmerzen oder Fieber eingesetzt (146). Längerfristig und in höheren Dosen können sie unter ärztlicher Aufsicht auch zur Therapie rheumatischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis verwendet werden (147). Der ebenfalls unselektive COX-Inhibitor Acetylsalicylsäure nimmt eine besondere Stellung ein, da er die COX irreversibel hemmt und deswegen auch zur Thromboseprophylaxe eingesetzt werden kann. Da Thrombozyten über keinen Zellkern verfügen sind sie nach der Hemmung nicht in der Lage, COX neu zu synthetisieren und können dadurch kein vasokonstriktorisches und aggregatorisch wirksames  $\text{TXA}_2$  mehr produzieren. Die Hemmung erfolgt somit über ihre gesamte Lebensdauer von 8 bis 10 Tagen. Dementsprechend steigt allerdings bereits nach Einnahme geringer Dosen das Blutungsrisiko deutlich an (148). Die bei längerer Einnahme auftretenden Nebenwirkungen von NSAR beziehen sich hingegen insbesondere auf den Magen, da die Produktion des für die Bildung des basischen, bicarbonathaltigen Magenschleims verantwortlichen  $\text{PGE}_2$  ebenfalls gehemmt wird. Dadurch kann es zu gastrointestinalen Blutungen, Ulcerationen und Perforationen

kommen. Neben einer Hemmung der Magensäureproduktion durch Protonenpumpenhemmer ist eine weitere Möglichkeit zur Prophylaxe NSAR-bedingter Magen- oder Zwölffingerdarmgeschwüre die zusätzliche Einnahme des PGE<sub>1</sub>-Analogons Misoprostol. Misoprostol aktiviert EP2, EP3 und EP4 und stimuliert so die Bicarbonat- und Mukussekretion sowie hemmt die Salzsäureproduktion (143,149).

**Tab. 2:** Übersicht der Prostanoiden, ihrer Rezeptoren sowie Expressionsorte, die für wichtige Effekte und Funktionen nach (131) relevant sind.

Klasse	Rezeptoren	Expressionsort	Effekte/Funktionen
<b>PGD<sub>2</sub></b>	DP1, CRTh2 (= DP2)	Mastzellen, Typ-2-T-Helferzellen, Gefäßendothel, glatte Gefäßmuskulatur, glatte Bronchialmuskulatur, Thrombozyten, ZNS	Immunzellmigration, Entzündung, Vasodilatation, Bronchokonstriktion, Thrombozytenaggregationshemmung, Schlafregulation
<b>PGE<sub>2</sub></b>	EP1, EP2, EP3 (acht Isoformen), EP4	Magen, Niere, Uterus, glatte Gefäßmuskulatur, Gefäßendothel, ZNS	Magenprotektion, Aufrechterhaltung der Nierenfunktion/GFR, Blutdruckregulation, Uteruskontraktion, Vasodilatation/Vasokonstriktion, Entzündung/Entzündungshemmung, Ödembildung, Fieber, Nozizeption
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	FP (FP <sub>A</sub> , FP <sub>B</sub> )	Uterus, Ovarien, Auge	Uteruskontraktion, Luteolyse, Regulation des Kammerwasserabflusses/Augeninnendrucks
<b>PGI<sub>2</sub></b>	IP	glatte Gefäßmuskulatur, Thrombozyten, Gefäßendothel, Niere, ZNS	Vasodilatation, Thrombozytenaggregationshemmung, Hemmung der Gefäßproliferation, Entzündung, Ödembildung, Aufrechterhaltung der Nierenfunktion/GFR, Schmerzpotenzierung
<b>TXA<sub>2</sub></b>	TP (TP <sub>α</sub> , TP <sub>β</sub> )	Thrombozyten, glatte Gefäßmuskulatur, Gefäßendothel, glatte Bronchialmuskulatur	Thrombozytenaktivierung/-aggregation, Vasokonstriktion, Immunzellmigration, Entzündung, Bronchokonstriktion

GFR = Glomeruläre Filtrationsrate, PG = Prostaglandin, TX = Thromboxan, ZNS = Zentrales Nervensystem

Selektive COX-2-Inhibitoren (Coxibe) wie Celecoxib oder Etoricoxib weisen eine höhere Affinität zu COX-2 auf, wobei eine Restaffinität gegenüber COX-1 besteht (150). Coxibe sind sterisch anspruchsvoller als unselektive COX-Inhibitoren und binden so bevorzugt in der größeren Substratbindetasche der COX-2, die durch einen Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum (Isoleucin 523 zu Valin) zustande kommt (130). Die selektive COX-2-Hemmung durch Coxibe kann das Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen gegenüber anderen NSAR reduzieren (151,152). Allerdings zeigte die randomisierte klinische APPROVe-Studie (Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx®) zur Untersuchung des Einflusses von Rofecoxib (Vioxx®, außer Vertrieb) auf das Wiederauftreten neoplastischer Polypen des Dickdarms 2004 eine Verdoppelung des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse bei Einnahme von Rofecoxib (153), was kurz darauf zur weltweiten Marktrücknahme von Rofecoxib geführt hat (154). Mechanistisch betrachtet könnte dies auf eine verminderte PGI<sub>2</sub>-Produktion und damit reduzierte Thrombozytenhemmung zurückzuführen sein (155). Mittlerweile ist klar, dass es sich bei der kardiovaskulären Toxizität nicht um einen reinen Klasseneffekt der Coxibe handelt. Auch vermeintlich „harmlose“ NSAR wie Ibuprofen oder Diclofenac, die in der Selbstmedikation angewendet werden und damit keiner Verschreibungspflicht unterliegen, können das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen (156). Dabei hat die CLASS-Studie (Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study) gezeigt, dass Ibuprofen und Diclofenac in verschreibungspflichtigen Dosen gegenüber Celecoxib ein vergleichbares Risiko für thromboembolische Ereignisse aufweisen (157). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass unselektive COX-Inhibitoren genau wie Coxibe potente COX-2-Inhibitoren darstellen und diese Hemmung neben der COX-1-Hemmung dadurch insbesondere bei höheren Dosen zum Tragen kommt (156).

**Glucocorticoide** Glucocorticoide gehören zu der Klasse der Steroidhormone und weisen eine stark antiphlogistische und immunsupprimierende Wirkung auf (158). Die Produktion des endogenen Glucocorticoids Hydrocortison erfolgt in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde und wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse reguliert (159). Es dient als Stresshormon und steigert den Blutzuckerspiegel, indem es die Gluconeogenese in der Leber und in der Folge auch die Glykogensynthese stimuliert (160). Glucocorticoide verfügen wie alle Steroidhormone über eine hohe Lipophilie und damit verbundene gute Membrangängigkeit. Nach Bindung an intrazelluläre Glucocorticoid-Rezeptoren kommt es zur Dissoziation des Chaperons Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) und Translokation in den Zellkern, wo der Substrat-Rezeptor-Komplex in Form eines Homodimers als Transkriptionsfaktor fungieren kann (161). Dadurch kann die Expression von Genen, die für Entzündungsmediatoren wie z. B. NF-κB (Nuclear factor 'kappa-light-chain-

enhancer' of activated B-cells) oder Cytokinen wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) kodieren gehemmt oder die Expression antiinflammatorischer und immunsuppressiver Proteine induziert werden (162). So führt die vermehrte Expression von Annexin A1 (synonym: Lipocortin 1) zu einer Hemmung der cPLA $_2\alpha$ , die für die Freisetzung von Arachidonsäure, dem Vorläufer von Prostanoiden, Leukotrienen und EETs, aus Phospholipidmembranen verantwortlich ist (163,164). Daraus ergibt sich eine Vielzahl von Indikationen für die Anwendung von Glucocorticoiden. Diese umfassen insbesondere chronisch-entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn oder Multiple Sklerose, bei denen systemisch wirksame Glucocorticoide wie Prednisolon oder Dexamethason eingesetzt werden (162). Neben Antihistaminika und Adrenalin werden Glucocorticoide auch initial zur Therapie akuter Angioödeme eingesetzt, da in der Mehrzahl der Fälle die Attacke allergischen Ursprungs ist (52). Eine Wirksamkeit bei nicht-allergischen, Bradykinin-vermittelten Angioödemem ist jedoch nicht belegt. Im Gegensatz dazu ist die langzeitige Therapie mit hochdosierten Glucocorticoiden mit starken Nebenwirkungen verbunden. Dazu zählen Osteoporose, Dyslipidämie, Glucosetoleranzstörungen, Hypertonie, Wundheilungsstörungen und Stammfettsucht, die im Rahmen eines iatrogenen Cushing-Syndroms auftreten können (165). Diese unerwünschten Wirkungen können durch topisch applizierte Glucocorticoide, die über eine geringe Bioverfügbarkeit verfügen, deutlich reduziert werden. Beispiele hierfür sind Beclometason oder Budesonid zur inhalativen Therapie bei Asthma bronchiale (166).

## 1.5 Zielsetzung

Das nicht-allergische Angioödem äußert sich in Form von subkutanen und submukösen Schwellungen verschiedener Organe, die durch eine erhöhte Endothelpermeabilität charakterisiert sind und meist durch Bradykinin und die Überaktivierung des B2-Rezeptors vermittelt werden. Sie können potenziell lebensbedrohlich sein, wenn der Kopf- und Halsbereich, insbesondere Larynx oder Pharynx, betroffen sind und die Atmung beeinträchtigt ist. Dieser Zustand erfordert oft eine notfallmedizinische Behandlung und einen mehrtägigen Krankenhausaufenthalt (167). Die häufigste Ursache eines nicht-allergischen Angioödems scheint die Behandlung mit ACEi zu sein (167). Die immer weiterwachsende Lebenserwartung der Bevölkerung bedeutet, dass auch immer mehr ältere und chronisch kranke Patienten mit kardiovaskulären Medikamenten behandelt werden müssen, sodass von einer steigenden Zahl potenziell lebensbedrohlicher Angioödeme ausgegangen werden muss (168). Zwar gibt es mit den neuen Plasmakallikrein-Inhibitoren Lanadelumab (169) oder Berotralstat (58) neue Optionen zur Vorbeugung akuter Anfälle beim HAE, doch wird das nicht-allergische Angioödem häufig übersehen oder falsch diagnostiziert, was zu einer auf den ersten Blick nicht-kausalen Behandlung mit Antihistaminika und Glucocorticoiden führt (8,11). Ein besseres Verständnis der B2-vermittelten Signalwege könnte daher zu neuen therapeutischen Optionen führen.

Es gibt zahlreiche Hinweise auf einen Einfluss der COX-Aktivität auf die B2-vermittelte akute dermale Extravasation bei Mäusen und Menschen, während ein Beitrag der NO-Produktion durch eNOS in der Maus vernachlässigbar zu sein scheint (99,170). Daher waren die Ziele dieser experimentellen Arbeit mit folgenden Fragen assoziiert:

- Welche ist die entscheidende COX-Isoform, die zur Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation beiträgt?
- Welche PGs gehen in Abhängigkeit dazu hervor, die als Reaktion auf die B2-Aktivierung die endotheliale Permeabilität und dermale Extravasation erhöhen?
- Tragen weitere Arachidonsäure-Metaboliten wie CysLTs oder EETs ebenfalls zur B2-vermittelten Extravasation bei?
- Können Glucocorticoide auf Basis der nachgewiesenen Hemmwirkung auf die Arachidonsäure-Biosynthese auch einen kausalen Ansatz zur Therapie nicht-allergischer Bradykinin-vermittelter Angioödeme bilden?

# Material und Methoden

## 2.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) bzw. der Tochtergesellschaft Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) bezogen. Primer wurden bei Thermo Fisher Scientific (Meerbusch) erworben. Sofern die Chemikalien anderweitig bezogen wurden oder die Bezugsquelle für die Nachvollziehbarkeit relevant ist, dann wird diese explizit genannt.

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind im Folgenden aufgeführt. Für die Herstellung wurde, sofern nicht anders beschrieben, frisch destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O) verwendet. Zur Bestimmung des pH-Werts wurde ein pH-Meter (HI 2210 pH Meter, Hanna Instruments, Vöhringen) benutzt. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte mithilfe von wässriger Salzsäure (HCl) bzw. Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung (jeweils 1 M).

### Blocking-Puffer

Casein	1% (m/V)
in PBST	

### Coomassie-Färbelösung

**pH 8,5**

Coomassie Brilliantblau R-250	0,01% (m/V)
Methanol	40% (V/V)
Eisessig	10% (V/V)

### Krebs-Hepes-Puffer

**pH 7,4**

NaCl	98,9	mM
KCl	4,7	mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,9	mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,2	mM
NaHCO <sub>3</sub>	25	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	mM
Na-HEPES	20	mM
D-Glucose · H <sub>2</sub> O	11,1	mM



**Laemmli-Probenpuffer (2x)****pH 6,8**

Tris-HCl	62,5	mM
SDS	2%	(m/V)
Glycerol	25%	(m/V)
2-Mercaptoethanol	5%	(V/V)
Bromphenolblau	qs	

**Lysispuffer (Gewebe)****pH 7,6**

NaCl	150	mM
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	5	mM
Triton X-100	1%	(V/V)
Na-Desoxycholat	1%	(V/V)
SDS	0,1%	(m/V)
Tris-HCl	62,5	mM
PIC Set III (Merck, Darmstadt)	4%	(V/V)

**Lysispuffer (Biopsien)****pH 8,0**

Tris-HCl	40	mM
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	100	mM
NaCl	100	mM
SDS	0,1%	(m/V)

**Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)****pH 7,4**

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	8,1	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	mM

**PBS mit Tween (PBST)****pH 7,4**

Tween® 20	0,1%	(V/V)
in PBS		

**Sammelgelpuffer (4x)****pH 6,8**

Tris-HCl	0,5	M
SDS	0,4%	(m/V)

**SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)**

Tris-HCl	250	mM
Glycin	1,9	M
SDS	1%	(m/V)

**pH 8,6****TAE-Puffer (50x)**

Tris	2	M
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	50	mM
Eisessig	1	M

**pH 8,3****Transferpuffer**

Tris-HCl	25	mM
Glycin	190	mM
Methanol	20%	(V/V)

**Trenngelpuffer (4x)**

Tris-HCl	1,5	M
SDS	0,4%	(m/V)

**pH 8,8****Vehikel-Lösung**

Methylcellulose 15 cP	0,5%	(m/V)
Tween® 80	0,2%	(V/V)
in PBS		

## 2.2 Labortiere

### 2.2.1 Mauslinien und Tierhaltung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 TierSchG in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (zuletzt geändert durch Artikel 280 der Verordnung vom 19. Juni 2020) in Verbindung mit § 31 TierSchVersV vom 1. August 2013 (zuletzt geändert durch Artikel 394 der Verordnung vom 31. August 2015) beantragt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW, Recklinghausen) genehmigt (Aktenzeichen 81.02.04.2019.A283). Die Durchführung der Experimente erfolgte unter strenger Einhaltung der Vorschriften des TierSchG.

Als Modellorganismus diente die kommerziell erwerbliche Inzucht-Mauslinie C57BL/6J (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Um den Einfluss der COX-1 auf die Entstehung Bradykinin-induzierter Ödeme zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zudem eine transgene COX-1-defiziente Mauslinie (COX-1<sup>-/-</sup>) mit C57BL/6J-Hintergrund verwendet, die durch einen vektorvermittelten Knockout des PTGS1-Gens auf Chromosom 2 generiert wurde. Basierend darauf, dass COX-1 durch Acetylsalicylsäure mittels Acetylierung an Serin-530 irreversibel gehemmt werden kann, wurde das zugehörige Gen in Exon 11 vor dem verantwortlichen Codon für diese Aminosäure unterbrochen. Durch homologe Rekombination mit einem hierfür entworfenen Targeting-Vektor wurden ca. 1000 Basenpaare (bp) des Intron 10 und die ersten 44 bp des Exon 11 mitsamt der Spleißregion durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt (171). Die homozygote Mauslinie wurde durch Rolf Nüsing und Gerd Geisslinger vom Institut für klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums der Goethe-Universität Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die weitere Zucht erfolgte in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der medizinischen Fakultät der HHU Düsseldorf.

Die Haltung und Zucht der Mäuse erfolgte unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) und standardisierten Bedingungen (zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus durch Kunstlicht, Raumtemperatur 20 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%). Der Zugang zu Standardfutter (Ratte/Maus-Haltung, 10 mm, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und entkeimtem Trinkwasser (pH 3) war immer gewährleistet. Die Versuchstiere standen durchgehend unter tierärztlicher Kontrolle und wurden in regelmäßigen Abständen auf Infektionen und andere Erkrankungen getestet. Für die Durchführung der Versuche wurden nur männliche Mäuse im Alter von mind. 10 bis max. 14 Wochen verwendet, die über einen einwandfreien Allgemeinzustand verfügten (Körpergewicht 20-30 g, Fell glatt/glänzend, Körperöffnungen sauber, Augen klar/glänzend, keine Verletzungen).

### 2.2.2 Genotypisierung transgener Mauslinien

**DNA-Isolierung** Zur Feststellung des Genotyps der transgenen Mäuse wurde die genomische DNA aus dem murinen Gewebe isoliert. Um eine zusätzliche Belastung der Mäuse zu vermeiden, wurden Ohrausstanzungen verwendet, die bei der Markierung der Mäuse im Alter von ca. 3 Wochen anfallen. Diese wurden jeweils mit 750  $\mu\text{L}$  Lysispuffer (Biopsien) und 17,5  $\mu\text{L}$  Proteinase K (0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , Qiagen, Hilden) versetzt und über Nacht bei 56  $^{\circ}\text{C}$  und 750 rpm (Rounds per minute) im Thermoschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  gesättigter NaCl-Lösung wurden die Proben weitere 5 min bei 56  $^{\circ}\text{C}$  und 750 rpm inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (4  $^{\circ}\text{C}$ , 13000 rpm, 15 min, Biofuge 13, Heraeus, Hanau) und 700  $\mu\text{L}$  des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  eiskaltem Ethanol (absolut) wurde die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für mind. 30 min gefällt. Im Anschluss wurde erneut zentrifugiert (30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 13000 rpm) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500  $\mu\text{L}$  Ethanol 70% gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 13000 rpm) verworfen. Anschließend wurde die DNA für 1 h bei Raumtemperatur (RT) im offenen Reaktionsgefäß getrocknet und das Pellet daraufhin in 80  $\mu\text{L}$  ultrafiltriertem  $\text{H}_2\text{O}$  (Merck Milli-Q® Biocel) gelöst. Abschließend wurde die Lösung über Nacht bei RT inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ , Biophotometer®, Eppendorf) bestimmt. Die Reinheit der DNA galt als ausreichend, sofern der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm im Bereich von ca. 1,8 lag. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 8  $^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese** Die Genotypisierung der transgenen Mäuse erfolgte mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Die PCR dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente und wurde das erste Mal 1988 von Saiki *et al.* beschrieben (172). Dazu durchläuft die PCR drei temperaturabhängige Schritte. Im ersten Schritt kommt es zur Denaturierung des DNA-Doppelstrangs (Denaturation). Daraufhin lagern sich im zweiten Schritt sequenzspezifische Primer an die nun einzelsträngig vorliegende, komplementäre DNA-Sequenz an (Annealing). Abschließend wird im dritten Schritt der entsprechende DNA-Abschnitt durch eine thermostabile DNA-Polymerase repliziert (Elongation). Dieser Zyklus wird 30 bis 35 Mal durchlaufen, sodass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments kommt.

Der Reaktionsansatz bestand aus 200-400 ng der zuvor aufgereinigten, genomischen DNA, 0,2  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Primerpaares sowie einem Mastermix (Taq DNA-Polymerase 2x Mastermix, VWR, Darmstadt) der neben einer  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen, thermostabilen DNA-Polymerase über die vier Nukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP verfügt. Die

PCR erfolgte in einem Thermocycler (Mastercycler pro S vapo.protect, Eppendorf, Hamburg) gemäß einem definierten Temperaturprofil (Tab. 3). Die erfolgreiche Amplifikation der entsprechenden DNA-Sequenz wurde anschließend per Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurde die vervielfältigte DNA im Verhältnis 1:1 mit DNA-Marker gemischt und in einem 2%-igen Agarosegel (inkl.  $0,4 \mu\text{L mL}^{-1}$  des DNA-interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffs GelRed® Nucleic Acid Stain, Biotium, Hayward) aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (45 min bei 90 V). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde zusätzlich eine DNA-Leiter (100 bp, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte im UV-Transilluminator (Molecular Imager® Gel Doc™ XR, Bio-Rad, Feldkirchen) bei 254 nm Wellenlänge.

Zur Genotypisierung der COX-1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde neben eines Primers innerhalb (sense-/forward-Primer, F-Primer) und außerhalb der Kodiersequenz (Coding Sequence, CDS) des *PTGS1*-Gens (Antisense-/Reverse-Primer, R-Primer) ein zusätzlicher Primer verwendet, der innerhalb der Neomycin-Kassette liegt (N-Primer) (Tab. 3). Da die Neomycin-Kassette nur bei Mäusen vorliegt, die über den COX-1-Knockout verfügen, konnte hier bei Kombination von N- und R-Primer eine Bande (600 bp) detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Bande bei der Kombination aus F- und R-Primer detektiert werden (400 bp, Wildtyp).

## 2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Air-Flow-Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert und inkubiert. Kryokonservierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (Human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC) aus der jugendlichen Penisvorhaut wurden über PromoCell (Heidelberg) bezogen und in Zellkulturflaschen (Polystyrol, T-75, Sarstedt, Nümbrecht) innerhalb von 5 bis 7 Tagen bis zur Konfluenz kultiviert, ehe diese passagiert wurden. Die Bestimmung der Zellzahl konfluenter Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fläche:  $0,0225 \text{ mm}^2$ , Tiefe:  $0,1 \text{ mm}$ ) unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Das Medium (Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell, Heidelberg) wurde in Form der fertigen Zusatzmischung (SupplementMix, PromoCell, Heidelberg) mit fetalem Rinderserum (5%, V/V), epidermalem Wachstumsfaktor ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , human, rekombinant), Heparin ( $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) und Hydrocortison ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) supplementiert und alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

**Tab. 3:** Auflistung der zur Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion verwendeten Primerpaare, Ansätze und Temperaturprofile.

		<b>COX-1<sup>-/-</sup></b>	
<b>Primerpaare</b>	Sense (Forward)	5'-AGG AGA TGG CTG CTG AGT TGG-3' (F)	
	Antisense (Reverse)	5'-AAT CTG ACT TTC TGA GTT GCC-3' (R)	
	Sense (Forward)	5'-GCA GCC TCT GTT CCA CAT ACA C-3' (N)	
	Antisense (Reverse)	5'-AAT CTG ACT TTC TGA GTT GCC-3' (R)	
<b>Ansatz</b>	Taq-Polymerase 2x Mastermix (VWR, Darmstadt)	12,5 µL	
	Q-Solution (Qiagen, Hilden)	6,2 µL	
	Primer (Forward, 50 µM)	0,1 µL	
	Primer (Reverse, 50 µM)	0,1 µL	
	DNA (100-200 ng µL <sup>-1</sup> )	2,0 µL	
	H <sub>2</sub> O (ultrafiltriert)	4,0 µL	
	gesamt	25,0 µL	
<b>Temperaturprofil</b>	94 °C	5 min	
	94 °C (Denaturation)	30 s	} 35x
	53 °C (Annealing)	30 s	
	72 °C (Elongation)	30 s	
	72 °C	5 min	
	4 °C	Stopp	

COX-1<sup>-/-</sup> = Cyclooxygenase-1-defiziente Mauslinie, A = Adenin, G = Guanin, T = Thymin, C = Cytosin

## 2.4 Proteinaufreinigung und -analyse

Zur näheren Charakterisierung wurde aus dem Gewebe (dorsales Subkutangewebe, Nierengewebe) transgener und nicht transgener Mäuse die Proteinfraktion isoliert, die anschließend mittels Western Blot (Kapitel 2.4.4) untersucht wurde.

### 2.4.1 Isolierung der Proteinfraktion

Zur Isolierung der Proteinfraktion wurden die verschiedenen Gewebe nach Entnahme in eiskaltem Krebs-Hepes-Puffer gewaschen, gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde in einen zuvor ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallmörser überführt und pulverisiert. Das Gewebepulver wurde in eiskaltem Lysispuffer (Gewebe) dispergiert ( $2,5 \mu\text{L mg}^{-1}$ ) und daraufhin mithilfe eines Rotor-Stator-Homogenisators (Ultra-Turrax® T8, IKA Labortechnik, Staufen) für 30 s auf höchster Stufe auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (15 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 13000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (Kapitel 2.4.2) quantifiziert.

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradford-Assay stellt eine schnelle und sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen dar und wurde das erste Mal im Jahr 1976 von seiner Namensgeberin Marion Bradford beschrieben (173). Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillantblau R-250 interagiert in saurer Lösung über koordinative Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen und geht in einem stöchiometrischen Verhältnis Komplexe ein. Dabei wird der ursprünglich rot-braune Farbstoff in seine blaue, unprotonierte, anionische Sulfonatform überführt und stabilisiert. Dadurch kommt es bei steigender Proteinkonzentration zu einer proportional zunehmenden, bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm und der Möglichkeit der quantitativen, photometrischen Bestimmung.

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde eine Verdünnungsreihe des Standardproteins Rinderalbumin (Bovine serum albumin) mit zehn Konzentrationen von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  bis  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) sowie reines PBS als Blindprobe (Blank) verwendet.  $100 \mu\text{L}$  der jeweiligen Rinderalbumin-Verdünnung/Blindprobe bzw. der zu vermessenden Proteinprobe wurden mit  $400 \mu\text{L}$  des Coomassie-Brillantblau G-250-haltigen Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, München) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Vermessung erfolgte in Einmal-Halbmikroküvetten (Polystyrol, Sarstedt, Nümbrecht) bei

595 nm mittels UV/Vis-Spektrophotometer (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld).

### **2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde das erste Mal 1970 von Ulrich Karl Laemmli beschrieben und dient der Auftrennung von Proteinen innerhalb eines elektrischen Feldes (174). Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS) überdeckt die Eigenladung des Proteins und bindet in einem konstanten Verhältnis zur Molekülmasse. Die Gelelektrophorese erfolgt in einem denaturierenden, diskontinuierlichen Polyacrylamidgel, wobei Proteine mit geringerer Masse schneller und weiter durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Kathode wandern. Mithilfe eines parallel verlaufenden Größenstandards können so nach entsprechender Färbung Proteine anhand ihrer Masse identifiziert oder nach anschließendem Western Blot immunchemisch analysiert werden.

Vor der Durchführung wurden die entsprechenden Proteinproben (Proteinmenge  $\sim 30 \mu\text{g}$ ) mit dem gleichen Volumen Laemmli-Probenpuffer (2x) versetzt und für 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert. Die Gelmatrix bestand aus einem weitporigen Sammelgel (4% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (m/m)) und einem engporigen Trenngel (7,5-12% Acrylamid/Bisacrylamid, 37,5:1 (m/m)). Die Polymerisierung durch Quervernetzung erfolgte im Rahmen einer radikalischen Kettenreaktion durch Zugabe des Radikalstarters APS (Ammoniumperoxodisulfat 10%,  $10 \mu\text{l mL}^{-1}$ ) und des Katalysators TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin,  $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ ). Das Gel wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer (Bio-Rad, München) eingespannt und die Kammer mit SDS-PAGE-Laufpuffer (1x) befüllt. Die Proben wurden parallel zu einem farbmarkierten Protein-Größenstandard auf das Gel aufgetragen ( $1,8 \mu\text{L}$ , PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa, Thermo Fisher Scientific, Merbusch). Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 90 min bei einer konstanten Spannung von 150 V und RT. Das Gel wurde anschließend im Western Blot (Kapitel 2.4.4) weiterverwendet oder für mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend über Nacht in  $\text{dH}_2\text{O}$  entfärbt.

### **2.4.4 Western Blot**

Die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran wird als Western Blot bezeichnet und wurde als solcher das erste Mal 1981 von Walter Neal Burnette beschrieben (175). Der Western Blot erfolgte im Anschluss an die Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE



(Kapitel 2.4.3) und bietet daraufhin eine sehr sensitive und selektive Methode des Protein-nachweises. Dabei erfolgt der Transfer der Proteine meist innerhalb eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zu dem auf der Trägermembran aufgelegten Gel angelegt wird, sodass die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Kathode auf die Membran übertragen werden. Anschließend können die Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen werden.

**Wet/Tank-Methode** Der Vorteil der Wet/Tank-Methode ist eine auch bei großen Proteinen (~250 kDa) sehr gute Transfereffizienz, allerdings muss aufgrund der erhöhten Wärmeentwicklung bei deutlich längerer Transferdauer auf eine ausreichende Kühlung geachtet werden. Im Anschluss an die SDS-PAGE (Kapitel 2.4.3) wurden das Gel, die Trägermembran (Nitrocellulose, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Schwalbach) sowie jeweils zwei Filterpapiere und Schaumstoffkissen in Transferpuffer gesättigt. Anschließend wurden unter Vermeidung von Lufteinschlüssen der Reihe nach ein Schaumstoffkissen, ein Filterpapier, das Gel, die Trägermembran und erneut Filterpapier und Schaumstoffkissen übereinander geschichtet und in der vorgesehenen Kassette und Elektrodenhalterung einer Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, München) eingespannt, sodass die Trägermembran zur positiv geladenen Kathode zeigte. Der Transfer der Proteine erfolgte über 90 min unter schwachem Rühren in eisgekühltem Transferpuffer bei einer konstanten Spannung von 90 V und 4 °C.

**Semi-Dry-Methode** Diese Methode des Western Blots ist deutlich schneller und aufgrund geringer benötigter Puffermengen besonders ressourcenschonend. Zudem kann der Transfer bei RT durchgeführt werden. Allerdings zeigt sich insbesondere bei größeren Proteinen eine im Vergleich zur Wet/Tank-Methode geringere Transfereffizienz.

Nach der SDS-PAGE (Kapitel 2.4.3) wurden das Gel, die Trägermembran (Nitrocellulose, 0,45 µm Porengröße, Millipore, Schwalbach) sowie zwei Filterpapiere in Transferpuffer gesättigt. Danach wurden Filterpapier, Transfermembran, Gel und erneut Filterpapier der Reihe nach in einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München) unter Vermeidung von Lufteinschlüssen aufgeschichtet. Der Proteintransfer erfolgte über 30 min bei einer konstanten Spannung von 12 V und RT.

**Immundetektion** Die Detektion der Proteine erfolgte immunchemisch mithilfe Fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zu diesem Zweck wurde im Anschluss an den Membrantransfer mittels Western Blot zunächst die Membran für 2 h bei RT in 3 mL Blocking-Puffer auf einem Wippschüttler (12 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (Tab. 4) hinzugegeben und die Membran über Nacht bei 4 °C weiter inkubiert (12 rpm). Danach wurde die Membran dreimal 5 min mit PBST gewaschen. Nach der Zugabe des Fluoreszenz-mar-

kierten Sekundärantikörpers (Tab. 4, in 3 mL Blocking-Puffer) wurde für 1 h unter Lichtausschluss und bei RT inkubiert (12 rpm). Zuletzt wurde die Membran jeweils zweimal 5 min mit PBST und anschließend mit PBS gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mithilfe eines Infrarot-Fluoreszenzscanners (Odyssey® Infrared Imaging System, LI-COR Biosciences, Bad Homburg). Für die Auswertung wurde die Software Image Studio Lite (Version 5.2, LI-COR Biosciences, Bad Homburg) verwendet.

**Tab. 4:** Primär- und Sekundärantikörper zur Immundetektion nach Western Blot mit Angabe der Bezeichnung, Herkunft, Art, Verdünnung und des Herstellers.

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herkunft, Art</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>	Anti-COX-1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-COX-1	Maus, monoklonal	1:200	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
	Anti-Annexin A1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
	Anti- $\beta$ -Actin	Kaninchen, polyklonal	1:20000	Sigma-Aldrich, München
	Anti-Vinculin	Kaninchen, monoklonal	1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
<b>Sekundärantikörper</b>	Anti-Mouse IR Dye® 800 CW	Ziege, polyklonal	1:10000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
	Anti-Rabbit IR Dye® 680 LT	Ziege, polyklonal	1:15000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

COX = Cyclooxygenase

## 2.5 Miles Assay

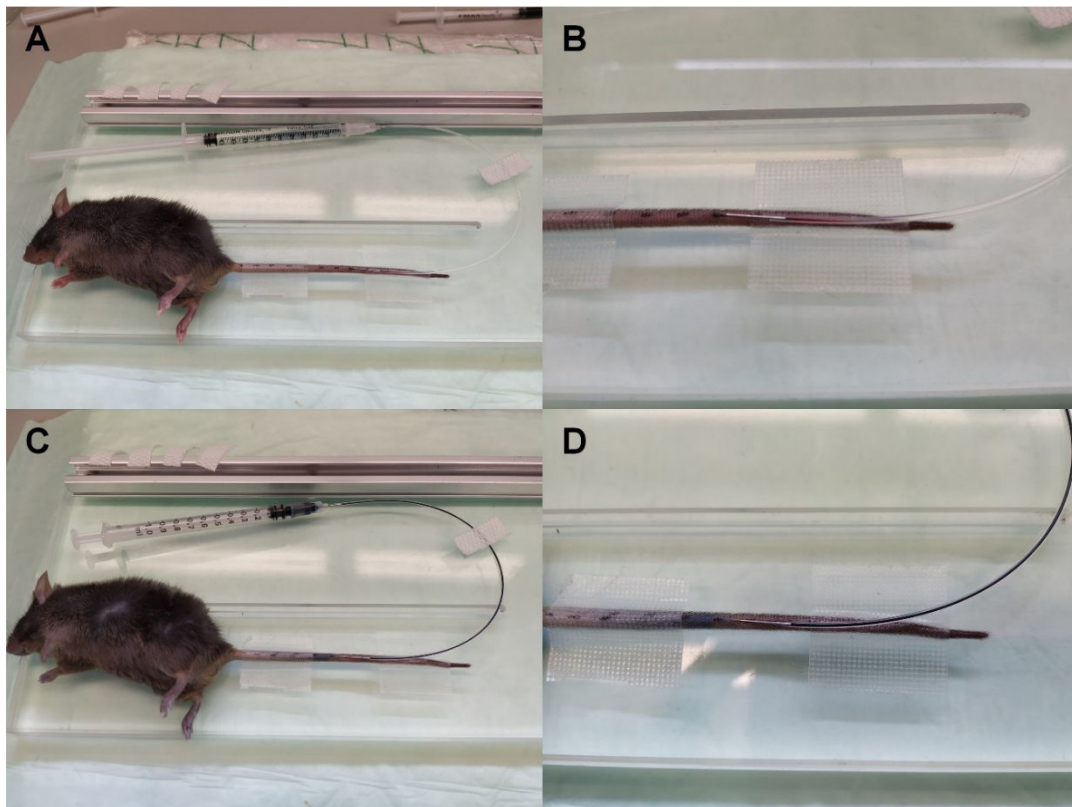
### 2.5.1 Theoretische Grundlagen

Der Miles Assay ist eine tierexperimentelle Methode zur Quantifizierung der endothelialen Permeabilität und wurde das erste Mal 1952 von Miles und Miles beschrieben (176). Die dabei verwendete Substanz Evans Blue ist ein Farbstoff, der eine hohe Affinität zu Albumin aufweist. Nach systemischer Applikation bindet er an zirkulierendes Serumalbumin, welches unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage ist, das intakte Gefäßendothel zu passieren, was entscheidend für die Aufrechterhaltung von Organfunktionen und der Homöostase ist. Entzündungsmediatoren wie Bradykinin und Histamin können die Gefäßpermeabilität erhöhen, sodass das Endothel durchlässig für Plasmaproteine wie Albumin wird. Dadurch ist das Albumin-gebundene Evans Blue in der Lage, das Gefäßlumen zu verlassen und in das umliegende Gewebe überzugehen (Extravasation). Der große Vorteil bei der Verwendung von Evans Blue als Indikator besteht darin, dass er anders als Fluoreszenzfarbstoffe makroskopisch identifiziert werden kann und so seine Verteilung direkt zu erkennen ist. Daraufhin können die Extravasate isoliert und der Farbstoff daraus extrahiert werden, ehe mittels analytischer Verfahren wie der Spektrophotometrie die Menge an Farbstoff und damit die Extravasation indirekt quantifiziert werden kann (177,178). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der dermalen Extravasation in der dorsalen Haut von Mäusen wurde die Erhöhung der Gefäßpermeabilität nach intravenöser (i. v.) Applikation von Evans Blue bewusst induziert und der Einfluss zuvor applizierter Wirkstoffe im Vergleich zu einer Kontrolllösung untersucht. Zur Induktion der dermalen Extravasation wurden Bradykinin, der proteolytisch stabilere B2-Agonist Labradimil (synonym: RMP-7, Cereport®) (179,180) und Histamin sowie PBS als Kontrolle intradermal (i. d.) appliziert. Der Farbstoff in den gebildeten Extravasaten in der Haut konnte daraufhin quantifiziert und so der Einfluss des Wirkstoffs auf die B2-induzierte dermale Extravasation untersucht werden.

### 2.5.2 Durchführung

Die Untersuchung der dermalen Extravasation mithilfe des Miles Assay wurde an C57BL/6 und COX-1<sup>-/-</sup> (männlich, 10 bis 14 Wochen alt) vorgenommen. Da die Vorbehandlung der Mäuse mit den jeweiligen Wirkstoffen auf verschiedenen Wegen (i. v., intraperitoneal [i. p.] oder dermal) stattgefunden hat, ergaben sich unterschiedliche Versuchsabläufe, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

**Intravenöse/intraperitoneale Vorbehandlung** Die Maus wurde zu Beginn des Versuchs durch i. p. Verabreichung einer Mischung aus Ketamin ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht [KG], Ketavet®, Zoetis, Berlin) und Xylazin ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  KG, Rompun®, Bayer, Leverkusen) in  $100 \mu\text{L}$  PBS betäubt. Für die Injektion der Evans Blue-Lösung ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$  KG in  $100 \mu\text{L}$  PBS) in die Schwanzvene, wurde sie daraufhin rechtslateral auf einer beheizten Plexiglasplatte fixiert. Da eine Aspiration zur Überprüfung der Kanülenlage mit der farbigen Evans Blue-Lösung nicht möglich war, wurde die Vene zunächst mit einem selbstgefertigten Katheter (Polyethylen, 17 cm, 0,38 mm Innendurchmesser, A. Hartenstein Laborversand, Würzburg), der mit einer handelsüblichen Kanüle (0,40 x 25 mm, Sterican® B. Braun, Melsungen) versehen wurde, und Natriumchlorid-Lösung 0,9% (B. Braun, Melsungen) in einer 1 mL-Spritze (Omnifix®-F, B. Braun, Melsungen) punktiert (Abb. 7A). Der Erfolg der Venenpunktion konnte so durch Aspiration und Rückfluss des Blutes kontrolliert werden (Abb. 7B). Danach wurde die vorbereitete Spritze mit der Evans Blue-Lösung unter Verdrängung von Luft angeschlossen und die Lösung appliziert (Abb. 7C, D).



**Abb. 7:** Applikation von Evans Blue durch die Schwanzvene einer Maus im Rahmen des Miles Assay. (A) Da der Erfolg der Punktion mit der farbigen Evans Blue-Lösung nicht mittels Aspiration kontrolliert werden konnte, wurde zunächst mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung und einem selbstgefertigten Katheter punktiert. (B) Daraufhin konnte durch Aspiration und Rückfluss des Blutes die Lage der Kanüle im Gefäßlumen überprüft werden. (C) Nach Anschluss der Spritze mit der vorbereiteten Evans Blue-Lösung wurde die Lösung injiziert. (D) Dabei konnte direkt die Ausbildung einer bläulichen Färbung entlang der Schwanzvene festgestellt werden.

**Tab. 5:** Auflistung der zur Vorbehandlung im Miles Assay intraperitoneal applizierten Wirkstoffe inkl. ihrer Wirkungsweise und der verabreichten Dosis (in mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht [KG]).

	<b>Wirkstoff</b>	<b>Wirkungsweise</b>	<b>Dosis [mg kg<sup>-1</sup> KG]</b>
<b>intraperitoneal</b>	Ibuprofen	unselektiver COX-1/-2-Inhibitor	12
	Diclofenac	unselektiver COX-1/-2-Inhibitor	5
	Rofecoxib	selektiver COX-2-Inhibitor	10
	Etoricoxib	selektiver COX-2-Inhibitor	20
	Zileuton	5-LOX-Inhibitor	20
	Sulfaphenazol	CYP2C8/9-Inhibitor	20
	Ketoconazol	unselektiver CYP-Inhibitor	50
	Cimetidin	unselektiver CYP-Inhibitor	120
	Laropiprant (MedChem Express, Monmouth Junction, USA)	DP1-Antagonist	20
	PF-04418948 (MedChem Express, Monmouth Junction, USA)	EP2-Antagonist	50
	Grapiprant (MedChem Express, Monmouth Junction, USA)	EP4-Antagonist	20
	RO1138452 (MedChem Express, Monmouth Junction, USA)	IP-Antagonist	50
	Dexamethason	Glucocorticoid	100

5-LOX = 5-Lipoxygenase, COX = Cyclooxygenase, CYP = Cytochrom P450, EP = Prostaglandin E2-Rezeptor, DP = Prostaglandin D2-Rezeptor, IP = Prostacyclin-Rezeptor

Um den Einfluss von Wirkstoffen auf die B2-vermittelte dermale Extravasation zu untersuchen, wurden bestimmte Versuchsgruppen entsprechend vorbehandelt. Der B2-Antagonist Icatibant (Firazyr®, Takeda, Berlin) wurde als einzige Substanz gemeinsam mit der Evans Blue-Lösung i. v. appliziert (2 nmol in 100 µL Evans Blue-Lösung, 20 min Einwirkzeit). Darüber hinaus wurden insbesondere hydrophilere bzw. in wässriger Phase besser lösliche Substanzen anhand des Körpergewichts der Maus in 100 µL Vehikel dosiert und im Vorfeld unmittelbar nach der i. v. Evans Blue-Injektion i. p. appliziert. Dabei handelte es sich um die in Tab. 5 aufgeführten Wirkstoffe.

Die Einwirkzeit betrug jeweils 20 min, ehe die dermale Extravasation induziert wurde. Das Glucocorticoid Dexamethason bildet eine Ausnahme, da die Wirkung nicht nur nach 20 min, sondern auch nach 90 und 180 min Einwirkzeit untersucht wurde.

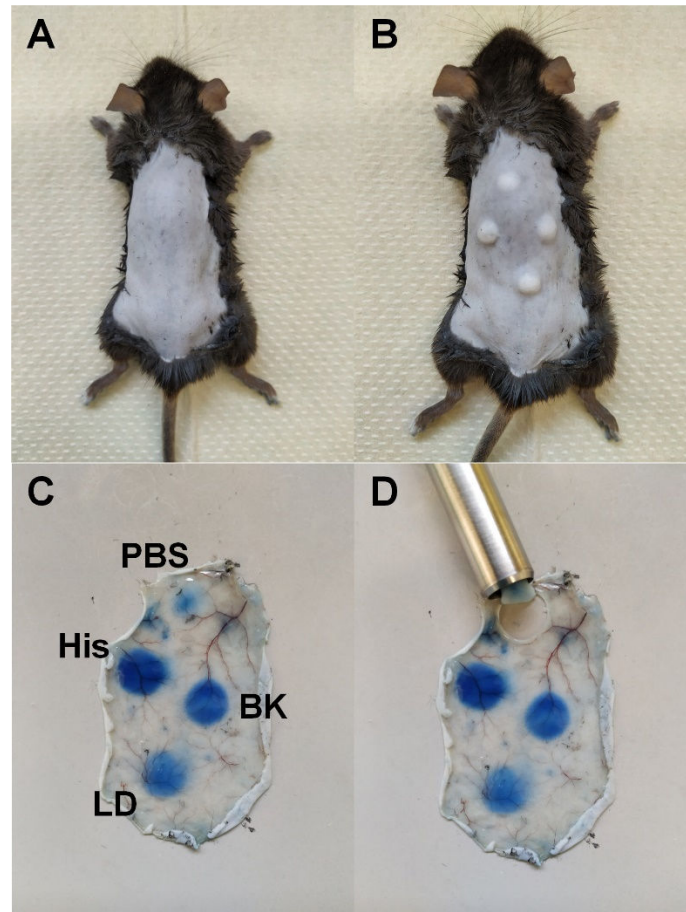
Während Farb- und Wirkstoff einwirken konnten, wurde die Maus dorsal rasiert und verbliebene Haare wurden mit einer Enthaarungscreme (ISANA sensitiv, Rossmann, Düsseldorf) entfernt, wobei eine deutliche, blaue Färbung der Haut sichtbar wurde (Abb. 8A). Nach 20 min wurde die dermale Extravasation mittels i. d. Applikation der in Tab. 6 aufgeführten Substanzen (in 30 µL PBS) induziert (Abb. 8B).

**Tab. 6:** Auflistung der intradermal applizierten Wirkstoffe zur Induktion der dermalen Extravasation mit Angabe des adressierten Signalwegs und der verwendeten Dosis.

	<b>Substanz</b>	<b>Signalweg</b>	<b>Dosis [nmol]</b>
<b>intradermal</b>	Bradykinin	Bradykinin-B2-Rezeptor	2
	Labradimil (Bachem, Bubendorf, Schweiz)	Bradykinin-B2-Rezeptor	2
	Histamin	Histamin-H1-Rezeptor	2
	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Kontrolle)	-	-

30 min nach i. d. Behandlung wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Die Rückenhaut wurde präpariert (Abb. 8C) und die deutlich erkennbaren, blauen Extravasate mit einer speziellen Stanze ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt (Abb. 8D). Nach Bestimmung des Feuchtgewichts mithilfe einer Feinwaage wurde zu jedem

Extravasat 1 mL N,N-Dimethylformamid (DMF) hinzugegeben und der Farbstoff für 24 h bei 56 °C im Thermoschüttler (750 rpm) extrahiert. Die Quantifizierung des Farbstoffs erfolgte spektrophotometrisch (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) in Quarzküvetten bei 620 nm mithilfe einer zuvor ermittelten Standardkurve (Kapitel 2.5.3)

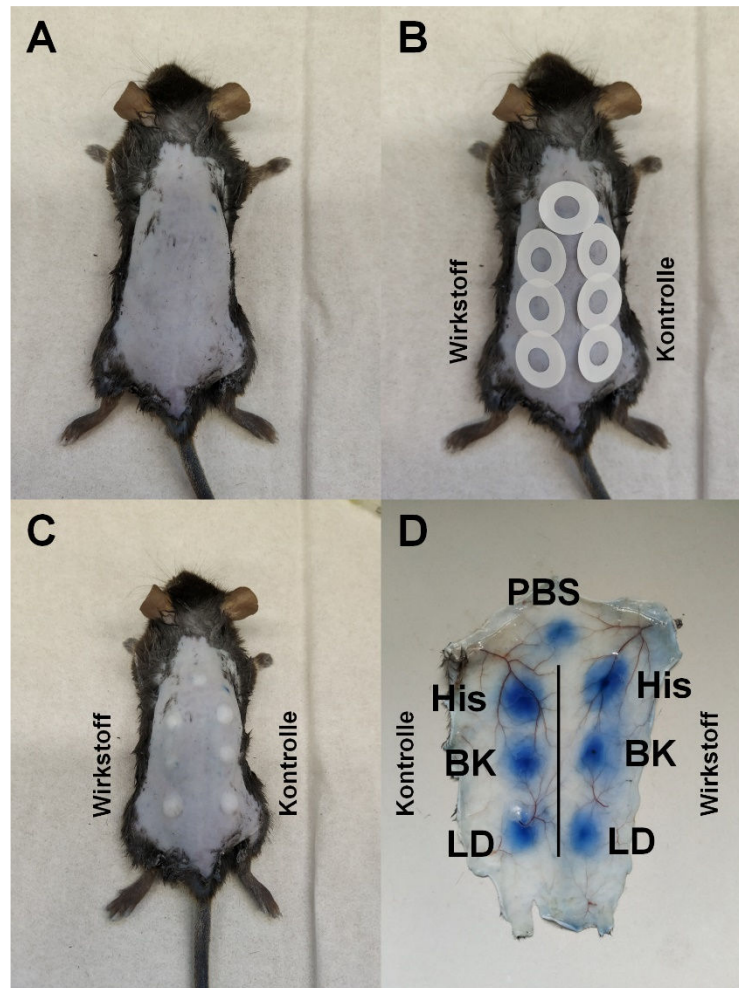


**Abb. 8:** Miles Assay in C57BL/6 mit intradermaler, dorsaler Applikation der gefäßpermeabilitätssteigernden Substanzen Bradykinin, Labradimil und Histamin sowie resultierende Extravasate in der Haut. (A) Nach systemischer Applikation von Evans Blue wurde die dorsale Haut rasiert und enthaart, woraufhin eine deutliche Blaufärbung sichtbar wurde. (B) Bei der darauffolgenden intradermalen Applikation waren nach der Anwendung an den Applikationsstellen deutliche Quaddeln zu sehen. (C) Die dermale Extravasation wurde mittels intradermaler Injektion von jeweils 2 nmol Bradykinin (BK), Labradimil (LD) und Histamin (His) induziert, woraufhin die Extravasate auf der Innenseite der präparierten Haut nach 30 min als intensive, blaue Punkte zu erkennen waren. Bei der Kontrollinjektion mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) war die blaue Färbung des Extravasats kaum vorhanden. (D) Um den Farbstoff und damit die dermale Extravasation zu quantifizieren, wurden die Extravasate mithilfe einer speziellen Stanze ausgeschnitten, ehe der Farbstoff extrahiert und spektrophotometrisch analysiert wurde.

**Dermale Vorbehandlung** Der cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -Inhibitor 3-(5-Carboxypentanoyl)-1-[3-(4-octylphenoxy)-2-oxopropyl]indol-5-carbonsäure (SB296) wurde von Matthias Lehr (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) zur Verfügung gestellt und zuvor bereits von Bovens *et al.* beschrieben (181). Aufgrund der hohen Lipophilie und geringen Bioverfügbarkeit von SB296 (182) wurde es in mittelkettigen Triglyceriden (Medium-chain Triglycerides, MCT, Miglyol® 812, Caesar & Loretz, Hilden) gelöst und lokal auf die vorgesehenen i. d. Applikationsstellen (5  $\mu$ L) aufgetragen. Die zuvor getesteten Substanzen Aceton und Dimethylsulfoxid (DMSO) haben sich als nicht geeignetes Vehikel erwiesen, da entweder die Löslichkeit nicht ausreichend war (Aceton) oder die Substanz selbst einen Einfluss auf die dermale Extravasation ausgeübt hat (DMSO). Für SB296 wurde sowohl eine Zeit-Wirkungs- (0,5 mg lokale Dosis, 10/30/60 min Einwirkzeit) als auch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung (0,02/0,1/0,5 mg lokale Dosis, 30 min Einwirkzeit) untersucht. Neben SB296 wurde auch der IP-Antagonist RO1138452 in dermalen Form angewendet (0,1 mg lokale Dosis, 30 min Einwirkzeit).

Die betäubten Mäuse wurden für die dermale Vorbehandlung direkt rasiert und enthaart, ehe das Evans Blue i. v. appliziert wurde (Abb. 9A). Um die lokale Wirkstoffapplikation auf der Haut zu erleichtern, wurden an den vorgesehen Applikationsstellen selbstklebende Plastikringe angebracht, die ein Abfließen des Vehikels verhindern sollten (Abb. 9B). Durch die lokal beschränkte Anwendung konnte in jeder Maus der Einfluss des Wirkstoffs direkt gegen eine Kontrolle mit Vehikel untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Applikationsstellen auf einer Seite mit Wirkstoff und auf der anderen Seite mit Vehikel vorbehandelt. Nach einer bestimmten Einwirkzeit wurden die Plastikringe entfernt und die i. d. Injektionen (Tab. 6) vorgenommen, wobei jede Substanz (mit Ausnahme von PBS) sowohl an einer mit Wirkstoff behandelten als auch einer kontrollbehandelten Stelle appliziert wurde (Abb. 9C). Nach 30 min wurde die Maus euthanasiert und die dorsale Haut präpariert. Die gebildeten Extravasate (Abb. 9D) wurden wie bereits in diesem Kapitel beschrieben isoliert und der Farbstoff nach Extraktion spektrophotometrisch quantifiziert.





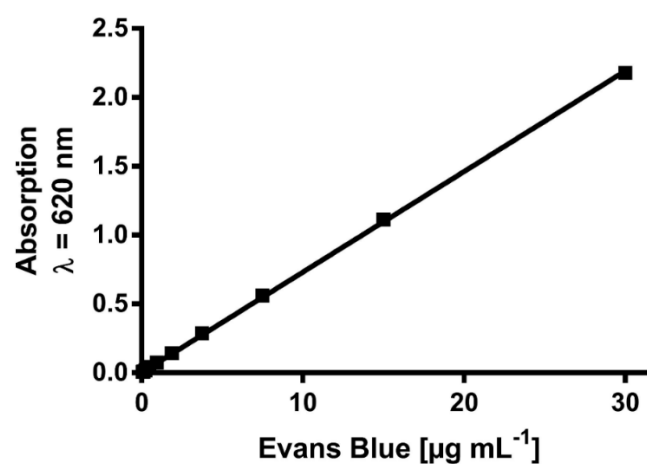
**Abb. 9:** Darstellung der lokalen, dermalen Applikation bestimmter Wirkstoffe im Rahmen des Miles Assay mit Hilfe von speziellen Plastikringen und darauffolgende intradermale Injektionen. (A) Für die dermale Applikation wurde die betäubte Maus zunächst enthaart, bevor der Farbstoff Evans Blue durch die Schwanzvene appliziert wurde. (B) Durch Anbringung spezieller Plastikringe konnte ein Abfließen des Vehikels an den geplanten intradermalen Applikationsstellen verhindert werden. (C) Die intradermalen Injektionen von Bradykinin (BK), Labradimil (LD) und Histamin (His) erfolgten jeweils an mit Wirkstoff behandelter und an kontrollbehandelter Stelle. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) wurde als Kontrolle in die unbehandelte Haut injiziert. (D) Die sich deutlich gebildeten, blauen Extravasate konnten nach Präparation der Haut isoliert und der Farbstoff extrahiert und spektrophotometrisch quantifiziert werden.

### 2.5.3 Standardkurve und Berechnung der Farbstoffkonzentration

Zur Bestimmung der Menge an extrahiertem Evans Blue aus den Extravasaten des Miles Assay wurde zunächst eine Standardkurve mit definierten Mengen des Farbstoffs gebildet. Daraufhin konnten die Werte der spektrophotometrischen Analyse der Proben interpoliert und so der Farbstoff quantifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurde ausgehend von einer konzentrierten Evans Blue-Stammlösung ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) eine 1:1000-Verdünnung in DMF ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) hergestellt. Beginnend mit dieser Verdünnung wurden durch kontinuierliche 1:2-Verdünnung in DMF Lösungen mit Evans

Blue-Konzentrationen von  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $3,75 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1,875 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,938 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,469 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,234 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,117 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $0,059 \mu\text{g mL}^{-1}$  erhalten. Die Proben wurden gegen DMF als Blindprobe (Blank) in Quarzküvetten mithilfe eines UV/Vis-Spektrophotometers (DU 640 Spektrophotometer; Beckman, Krefeld) bei 620 nm vermessen. Die Standardkurve wurde daraufhin mittels GraphPad Prism 6 (San Diego, USA) gebildet (Abb. 10). Durch Interpolation konnten die Konzentrationen an Evans Blue für die einzelnen Proben (in  $\mu\text{g mL}^{-1}$  DMF) berechnet werden. Da bei der Probennahme das Feuchtgewicht der Extravasate bestimmt wurde, konnte nachfolgend die Konzentration an Evans Blue pro Masse dermalen Gewebes (in  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) ermittelt werden.



**Abb. 10:** Beispiel einer ermittelten Standardkurve nach Vermessung einer Evans Blue-Verdünnungsreihe zur Quantifizierung von Proben aus dem Miles Assay. Aufgetragen ist die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 620 nm gegen die Konzentration an Evans Blue (in  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

## 2.6 Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie

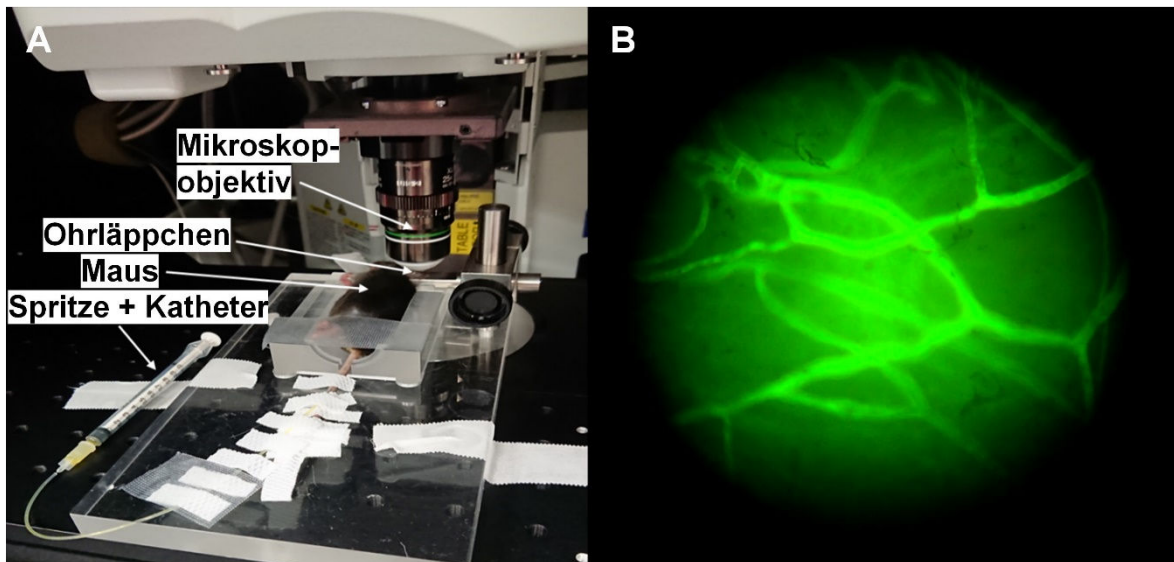
Die Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie (Two-Photon Excitation Microscopy, TPEM) wurde gemeinsam mit Ehsan Fahimi und in Kooperation mit Michael Vogt und Marc van Zandvoort (beide Universitätsklinikum RWTH Aachen) im interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) des Universitätsklinikums RWTH Aachen durchgeführt.

### 2.6.1 Theoretische Grundlagen

Die TPEM ist ein bildgebendes Verfahren, das die Visualisierung von Gewebe *in vivo* durch Anregung fluoreszierender Farbstoffe ermöglicht. Der praktische Einsatz der TPEM wurde erstmals 1994 von Denk *et al.* beschrieben (183). Die TPEM ermöglicht im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie die Visualisierung tiefer Gewebeschichten (bis zu 200  $\mu\text{m}$  Tiefe) bei relativ hohem Signal-Rausch-Verhältnis und geringer Phototoxizität. Dabei wird sich das optische Phänomen der Frequenzverdoppelung (Second harmonic generation) zunutze gemacht: Ein Femtosekundenlaser emittiert nacheinander zwei Photonen mit der halben Energie, die zur Anregung eines bestimmten Fluorophors benötigt wird, in ein nichtlineares Übertragungsmedium, z. B. subkutanes Gewebe. Diese Photonen treffen sich schließlich und gleichen ihre Phasen an, um ein neues Photon mit der für die Anregung des Zielfluorophors erforderlichen Energie zu erzeugen. Durch diesen Effekt wird eine geringere Energie für die Anregung der Fluorophore benötigt, wodurch das Gewebe weniger geschädigt und die Lichtstreuung reduziert wird.

### 2.6.2 Durchführung

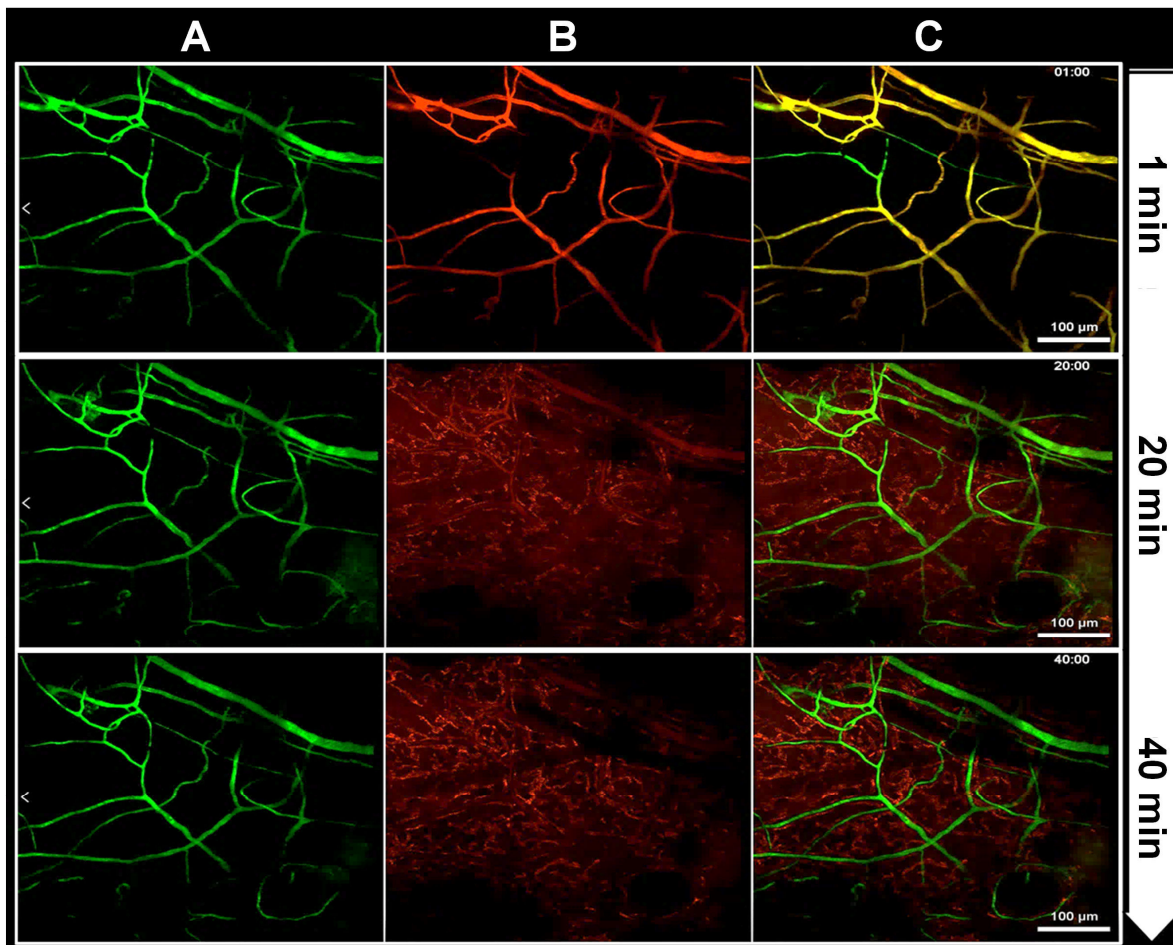
Für die TPEM wurde ein Olympus FV1000MPE Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskop mit einem 25x NA1.05-Wasserimmersionsobjektiv (Tokio, Japan) und einem MaiTai<sup>®</sup> Deep-Sea<sup>™</sup> Ti:Sapphire-Kurzimpuls laser (Spectra Physics, Mountain View, USA) verwendet. Damit konnten die mikrovaskulären Gefäße in den Ohrläppchen von C57BL/6 sichtbar gemacht und die Extravasation beobachtet werden. Die Maus (männlich, 10 bis 12 Wochen alt) wurde zuvor i. p. betäubt (100 mg kg<sup>-1</sup> KG Ketamin, Ketavet<sup>®</sup>, Zoetis, Berlin und Xylazin 5 mg kg<sup>-1</sup> KG Xylazin, Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen), unter dem Objektiv des Mikroskops positioniert und erhielt über einen Schwanzvenenkatheter Injektionen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Abb. 11A). Der erste Farbstoff war ein 250 kDa Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran, anionische Ladung, Sigma-Aldrich, München, 20 mg mL<sup>-1</sup>, 50  $\mu\text{L}$ ), das aufgrund seiner molekularen Größe nicht in der Lage ist, das Gefäßlumen zu verlassen und zur Einstellung und Fokussierung des Mikroskops verwendet wurde (Abb. 11B).



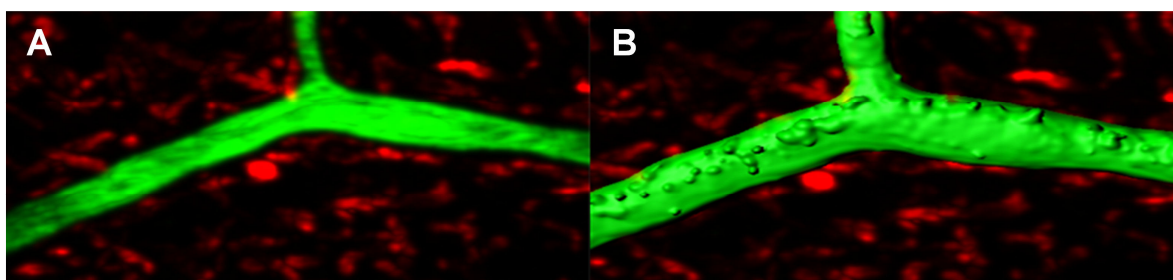
**Abb. 11:** Fixierung der Maus und Bildfokussierung bei der Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie. (A) Das Ohrläppchen der betäubten Maus wurde unter dem Objektiv des Mikroskops fixiert, ehe der 250 kDa-Fluoreszenzfarbstoff mithilfe eines Katheters durch die Schwanzvene injiziert werden konnte. (B) Der Fluoreszenzfarbstoff (grün) ist aufgrund seiner molekularen Größe nicht in der Lage, das Gefäßlumen zu verlassen und konnte dadurch zur Einstellung und Fokussierung des Mikroskops verwendet werden. Zu erkennen sind mikrovaskuläre Gefäße in einer Gewebetiefe von 200  $\mu\text{m}$  des Ohrläppchens bei gleichzeitiger Anregung des Fluorophors mittels Zwei-Photonen-Technik (Aufnahme durch das Okular). Abbildung modifiziert nach (184).

Nachdem ein geeigneter Aufnahmebereich festgelegt worden war, wurde der zweite Farbstoff (Alexa Fluor® 594, anionische Ladung, 10 kDa, Thermo Fisher Scientific, Meerbusch, 5 mg mL<sup>-1</sup>, 50  $\mu\text{L}$ ) durch den Katheter injiziert. Dieser Farbstoff war aufgrund seiner geringeren molekularen Größe in der Lage, das Gefäßlumen mit der Zeit zu verlassen. Zur besseren Unterscheidung wurde der 250 kDa-Farbstoff grün und der 10 kDa-Farbstoff rot dargestellt, sodass die Farbstoffverteilung in Abhängigkeit zur Zeit nach 1 min (Abb. 12A), 20 min (Abb. 12B) und 40 min (Abb. 12C) beobachtet werden konnte.

Jede Aufnahme dauerte etwa 45 min, wobei jede Minute zwei Bilder erzeugt wurden. Jedes Bild bestand aus acht Teilen, die aus nacheinander gescannten 3  $\mu\text{m}$  dicken Gewebeschnitten in verschiedenen Tiefen aufgenommen wurden. Am Ende wurde für jedes Bild ein dreidimensionales, kubisches Bild rekonstruiert und mit der Software Imaris x64 9.2 (Bitplane, Zürich, Schweiz) analysiert. Die Software war in der Lage, den Gefäßraum anhand des Signals des 250 kDa-Farbstoffs zu identifizieren, der während der gesamten Aufnahme im Gefäßlumen verblieb (Abb. 13). Daraus konnten dann Berechnungen für den 10 kDa-Farbstoff durchgeführt werden, der im Gegensatz zum 250 kDa-Farbstoff im gleichen definierten Gefäßlumen allmählich an Intensität verlor.



**Abb. 12:** Fluoreszenzaufnahmen der mikrovaskulären Gefäße im Ohrläppchen einer Maus in 200 µm Gewebetiefe nach systemischer Applikation und Zwei-Photonen-Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichem molekularem Gewicht. Dargestellt ist die Farbstoffverteilung in Abhängigkeit zur Zeit (1 min, 20 min und 40 min), wobei (A) nur der 250 kDa-Farbstoff (grün), (B) nur der 10 kDa-Farbstoff (rot) und (C) beide Farbstoffe parallel und überlappend (gelb) visualisiert wurden. Während der 250 kDa-Farbstoff über die gesamte Aufnahmezeit von 40 min das Gefäßlumen kaum verlässt, ist der 10 kDa-Farbstoff bereits nach 20 min fast vollständig aus dem Gefäß ins Interstitium extravasiert. Abbildung modifiziert nach (184).



**Abb. 13:** Software-unterstützte, räumliche Darstellung von Gefäßen durch Rekonstruktion von Zwei-Photonen-Fluoreszenzaufnahmen des 250 kDa-Farbstoffs (grün) in verschiedenen Gewebeschichten. (A) Natives Bild eines Gefäßes in 200 µm Gewebetiefe. (B) Darstellung des Gefäßraums mithilfe mehrschichtiger Fluoreszenzaufnahmen und dominierendem 250 kDa-Fluoreszenzfarbstoff. Abbildung modifiziert nach (184).

Ziel des Experiments war die Weiterentwicklung der bereits in Bisha *et al.* publizierten Methodik zur Visualisierung der mikrovaskulären Extravasation (170). Durch vorherige systemische Verabreichung des proteolytisch stabileren Bradykinin-Analogons und B2-Agonisten Labradimil ( $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  KG, Bachem, Bubendorf, Schweiz) sollte die Endothelpermeabilität gesteigert und damit die mikrovaskuläre Extravasation induziert werden. Daraufhin sollte der Einfluss von zuvor applizierten Wirkstoffen auf die Extravasation untersucht werden. Die praktische Umsetzung des Experiments war nicht erfolgreich, da sich unmittelbar nach der Applikation von Labradimil Probleme bei der bildlichen Darstellung ergeben haben, da Einstellung und Fokussierung des Mikroskops nicht mehr möglich waren.

## 2.7 **Aufreinigung und Analyse des Prostacyclin-Metaboliten 6-Keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$**

6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  ist ein stabilerer Metabolit des PGI $_2$ , welches nur über eine kurze Halbwertszeit verfügt (185). Er kann daher zur indirekten Quantifizierung von PGI $_2$  herangezogen werden (132). Die Isolierung und Aufreinigung von 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  erfolgte aus subkutanem Gewebe von C57BL/6 und aus Medien von HDMEC. Mäuse und Zellen wurden dabei zuvor mit Bradykinin behandelt und außerdem der Einfluss bestimmter Wirkstoffe auf die resultierenden 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -Konzentrationen untersucht. Die Quantifizierung und Identifizierung erfolgte mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS).

### 2.7.1 **Probenvorbereitung**

**Subkutangewebe aus C57BL/6** C57BL/6 (männlich, 10 bis 14 Wochen alt) wurden i. p. mit einer Mischung aus Ketamin ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  KG, Ketavet<sup>®</sup>, Zoetis, Berlin) und Xylazin ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  KG, Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen) in  $100 \mu\text{L}$  PBS betäubt. Bestimmte Versuchsgruppen erhielten zeitgleich per i. p. Injektion den unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$  KG in  $100 \mu\text{L}$  Vehikel) oder Vehikel als Kontrolle. Während einer Einwirkzeit von 20 min wurde die Maus dorsal rasiert und verbliebene Haare wurden mit einer Enthaarungscreme (ISANA sensitiv, Rossmann, Düsseldorf) entfernt. Daraufhin wurde Bradykinin ( $2 \text{ nmol}$  in  $30 \mu\text{L}$  PBS) i. d. verabreicht. Nach weiteren 30 min wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation euthanasiert und die Rückenhaut präpariert. Das Subkutangewebe wurde mit einem sterilen Skalpell an den i. d. Applikationsstellen abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Feuchtgewicht wurde auf einer Feinwaage bestimmt und das Gewebe anschließend direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Das gefrorene Gewebe

wurde in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert und das entstandene Gewebepulver in eiskaltem Methanol 15% ( $10 \mu\text{L mg}^{-1}$  Gewebe) mithilfe eines Rotor-Stator-Homogenisators (Ultra-Turrax® T8, IKA Labortechnik, Staufen) auf höchster Stufe für 30 s auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde das Gewebelysate zentrifugiert ( $10000 \text{ g}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ min}$ ), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

**HDMEC** HDMEC wurden wie in Kapitel 2.3 beschrieben kultiviert. Für alle Inkubationsexperimente wurden konfluente HDMEC der Passagen 6 bis 8 verwendet (T-75,  $\sim 3,0 \cdot 10^6$  Zellen). Dazu wurde das Medium durch frisches Medium ohne Zusatzmischung ersetzt. Nach Zugabe von Bradykinin, Bradykinin/Icatibant, Bradykinin/Diclofenac (jeweils  $10 \mu\text{M}$ ) bzw. PBS als Kontrolle wurden die Zellen für 10 min unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Daraufhin wurde das Medium in eiskalte Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur Aufreinigung von 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.7.2 Aufreinigung von 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub>

Sowohl die Überstände aus den Gewebelysaten der C57BL/6 als auch die isolierten Medien der HDMEC wurden aufgetaut und durch Zugabe einer wässrigen HCl-Lösung ( $1 \text{ M}$ ) auf pH 3 eingestellt. Nach 15 min Inkubation bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die Proben mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Die Einweg-Trennsäulen (Polyethylen) waren beladen mit einer Umkehrphasen-Matrix aus Octadecyl (C-18)-endmodifiziertem Kieselgel ( $200 \text{ mg}$ ,  $6 \text{ mL}$ , Discovery® DSC-18, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Im weiteren Vorgehen wurde mithilfe einer Spritze ( $3 \text{ mL}$ , Inject®, B. Braun, Melsungen) inkl. eines Kartuschenadapters (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) durch Druckausübung eine durchgängige Fließrate von etwa  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  angestrebt (Abb. 14). Die Säulenmatrix wurde zunächst mit jeweils  $10 \text{ mL}$  Ethanol (absolut) und  $\text{dH}_2\text{O}$  (pH 3) equilibriert. Daraufhin wurden die Proben aufgetragen und nach Bindung an der Matrix nacheinander mit jeweils  $10 \text{ mL}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , Ethanol 15% und Hexan gewaschen. Die abschließende Elution erfolgte mit  $10 \text{ mL}$  Ethylacetat. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Unmittelbar vor den Analysen wurde das Lösungsmittel unter leicht strömendem Stickstoff evaporiert.

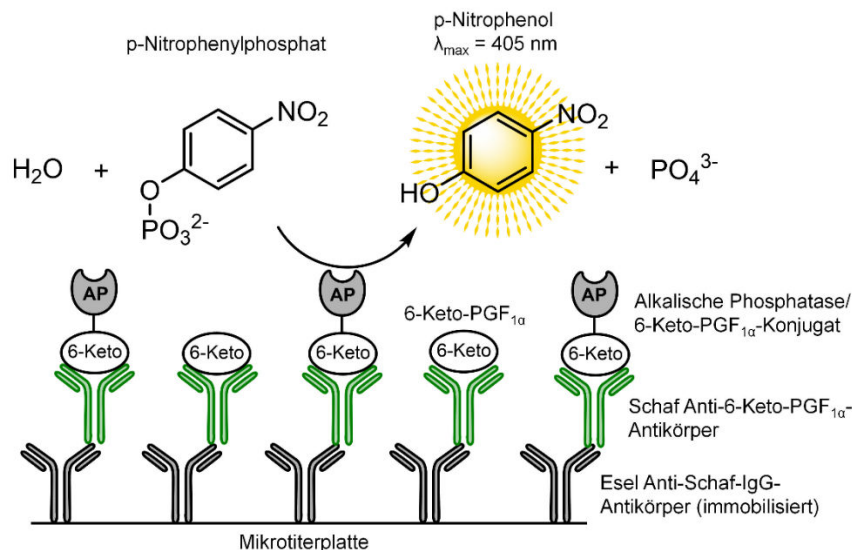


**Abb. 14:** Darstellung der Festphasenextraktion zur Aufreinigung von 6-Keto-Prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ ). Die Trennsäulen wurden in einer selbst angefertigten Apparatur eingespannt. Mithilfe spezieller Spritzenadapter (rot) konnte durch Druckausübung durch die Spritze eine nahezu konstante Fließgeschwindigkeit erreicht werden.

### 2.7.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

**Theoretische Grundlagen** Der ELISA ist ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren zur Detektion und Quantifizierung bestimmter Antigene. Bei dem in dieser Arbeit genutzten 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -ELISA-Kit (ADI-900-004, Enzo Life Sciences, Lörrach) handelt es sich um einen kompetitiven Immunassay bei dem durch eine enzymatische Farbreaktion das 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  indirekt detektiert und quantifiziert werden kann. Dabei wird ein polyklonaler Antikörper gegen 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  verwendet, an den kompetitiv freies 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  in Standard- bzw. Probelösungen oder Konjugate aus 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  und kovalent gebundener Alkalischer Phosphatase binden (Abb. 15). Das daraufhin zugegebene farblose Substrat p-Nitrophenylphosphat wird in Abhängigkeit vom gebundenen Konjugat durch die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert und bildet als Produkt gelbes p-Nitrophenol mit einem Absorptionsmaximum bei 405 nm. Nach einer kurzen Inkubationszeit wird die Enzymreaktion gestoppt und die entstandene gelbe Farbe auf einem Mikrotiterplattenlesegerät spektrophotometrisch bei 405 nm detektiert. Die Intensität der gelben Farbe ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration an 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  in den Standard- und Probelösungen.



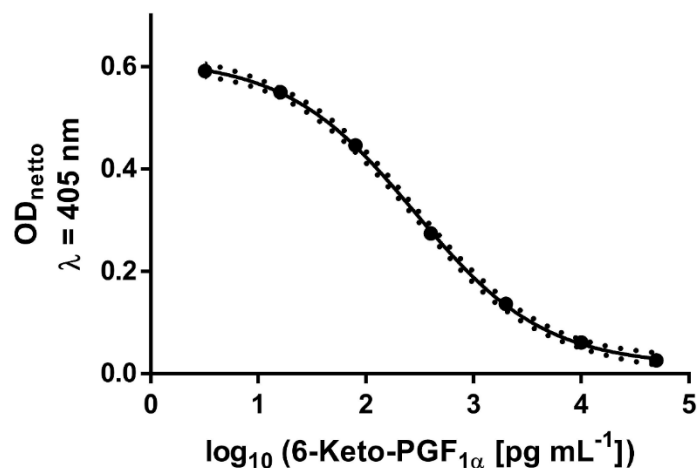


**Abb. 15:** Mechanismus des indirekten, kompetitiven Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Detektion und Quantifizierung von 6-Keto-Prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ ). Die Mikrotiterplatte ist mit immobilisierten Antikörpern gegen Schaf-Immunglobulin G (IgG) ausgekleidet. Ein Schaf-IgG Anti-6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -Antikörper wird hinzugegeben und bindet so an die Mikrotiterplatte. Freies 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  (6-Keto) und ein zugegebenes Konjugat aus 6-Keto und Alkalischer Phosphatase (AP) können nun kompetitiv an den Antikörper binden. Das zugegebene Substrat p-Nitrophenylphosphat wird durch AP zum gelben p-Nitrophenol dephosphoryliert und kann bei einem Absorptionsmaximum ( $\lambda_{\max}$ ) von 405 nm spektrophotometrisch detektiert werden. Die Intensität der gelben Farbe ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration an 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$  in den Standard- und Probenlösungen. Abbildung entsprechend der Herstelleranleitung des verwendeten 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -ELISA-Kit (ADI-900-004, Enzo Life Sciences, Lörrach) modifiziert nach (186).

**Durchführung** Der 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -ELISA (ADI-900-004, Enzo Life Sciences, Lörrach) wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte dabei immer in Doppelbestimmung. Die zuvor evaporierten Proben wurden in 250  $\mu\text{L}$  Assay-Puffer rekonstituiert und 10 s gevortext. Nach Inkubation über 5 min bei RT wurde erneut für 10 s gevortext und über 5 min RT inkubiert. Der Schritt wurde noch ein drittes Mal wiederholt. Mithilfe einer mitgelieferten 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -Standardlösung (500000  $\text{pg mL}^{-1}$ ) wurde eine Verdünnungsreihe zur anschließenden Bestimmung einer Standardkurve hergestellt. Dazu wurde die Standardlösung zunächst 1:10 in Assay-Puffer verdünnt (50000  $\text{pg mL}^{-1}$ ). Jede weitere Verdünnung erfolgte mit der vorherigen Verdünnung in einem 1:5-Verhältnis mit Assay-Puffer, sodass Konzentrationen von 10000  $\text{pg mL}^{-1}$ , 2000  $\text{pg mL}^{-1}$ , 400  $\text{pg mL}^{-1}$ , 80  $\text{pg mL}^{-1}$ , 16  $\text{pg mL}^{-1}$  und 3,2  $\text{pg mL}^{-1}$  erhalten wurden. Proben und Standards wurden nun entsprechend der Herstelleranleitung in Doppelbestimmung auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Dabei wurden 100  $\mu\text{L}$  der Probe/des Standards mit 50  $\mu\text{L}$  des Alkalische Phosphatase/6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -Konjugats und 50  $\mu\text{L}$  des Schaf Anti-6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -Antikörpers vermengt. Eine Referenzprobe mit alternativ 150  $\mu\text{L}$  Assay-Puffer, 50  $\mu\text{L}$  Konjugat und ohne Antikörperzugabe diente zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (non-specific binding, NSB) des Konjugats. Die Platte wurde daraufhin für 2 h bei RT inkubiert (500 rpm).

Danach wurden die Wells gelehrt und insgesamt dreimal mit 400  $\mu\text{L}$  Waschpuffer gespült. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  p-Nitrophenylphosphat wurde die Platte für 45 min bei RT inkubiert und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Stopplösung beendet. Die direkte Vermessung der Platte erfolgte spektrophotometrisch in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Synergy™ Mx Microplate Reader, BioTek, Bad Friedrichshall). Der Blindwert wurde anhand einer parallel zur Enzymreaktion gelaufenen Referenz aus 200  $\mu\text{L}$  p-Nitrophenylphosphat und anschließend zugegebener Stopplösung (50  $\mu\text{L}$ ) erhoben.

**Standardkurve und Quantifizierung von 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>**  Zur Quantifizierung von 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  wurde anhand der vermessenen Standards eine Standardkurve gebildet, mit deren Hilfe die Konzentrationen in den Proben interpoliert werden konnten. Dazu mussten zunächst der Blindwert und der Wert der ermittelten unspezifischen Bindung von den Standard- und Probenwerten subtrahiert werden, um die Netto-Absorptionen (optische Dichte, OD<sub>netto</sub>) bei 405 nm zu erhalten. Zusätzlich wurden die Mittelwerte aus den Replikaten der Doppelbestimmung gebildet. Die korrigierten Standardwerte wurden dann bei GraphPad Prism 6 (San Diego, USA) gegen die logarithmierten Werte der zugehörigen Konzentrationen aufgetragen und die Standardkurve inklusive der logarithmierten Konzentrationen der Proben interpoliert (Abb. 16). Nach Auflösung des Logarithmus der interpolierten Konzentrationen konnte die Gesamtmenge an 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  je Probe bestimmt und in Bezug zur extrahierten Gewebemenge (in pg mg<sup>-1</sup>) oder zum extrahierten Volumen an Zellkulturmedium (in pg mL<sup>-1</sup>) dargestellt werden.



**Abb. 16:** Beispiel einer ermittelten Standardkurve nach Durchführung des kompetitiven Enzyme-linked Immunosorbent Assay zur Bestimmung von 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub>  (6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ). Die gemessenen Netto-Absorptionen (OD<sub>netto</sub>) der Standards bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 405 nm wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen der Standards aufgetragen. Durch Interpolation konnte die Standardkurve gebildet und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben berechnet werden. Die gestrichelten Kurven Stellen das Konfidenzintervall (95%) der Standardkurve dar.

#### 2.7.4 LC-MS/MS

Die LC-MS/MS diente der Validierung der ELISA-Ergebnisse, da mit dieser Methodik 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> nicht nur quantifiziert, sondern auch eindeutig anhand der molekularen Masse identifiziert werden konnte. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Irina Steiner und Maximilian Dröge am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

**Theoretische Grundlagen** Die LC-MS/MS ist ein instrumentell-analytisches Verfahren zur Auftrennung, Quantifizierung und Identifizierung von Substanzen. Dabei dient die LC der Auftrennung des Substanzgemisches. Als mobile Phase (Fließmittel) wird eine Flüssigkeit genutzt, in der das Substanzgemisch durch eine stationäre Phase (Trennsäule) geleitet wird. Die Auftrennung des Substanzgemisches basiert auf unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen der Substanz und der stationären Phase, der Substanz und der mobilen Phase aber auch zwischen mobiler und stationärer Phase. Diese sind abhängig von der Polarität der einzelnen Komponenten und führen zu einer Verzögerung der Elution einer Substanz (Retention). Die Zeit, die ein Analyt unter definierten Bedingungen braucht, um die Trennsäule zu durchqueren, wird als Retentionszeit bezeichnet und ist stoffspezifisch. Zu definierende Bedingungen sind hierbei unter anderem die Beschaffenheit der Säulenmatrix (Material, Länge, Durchmesser, Partikelgröße) und des Fließmittels (Zusammensetzung/Gradient, pH) aber auch Temperatur und Fließgeschwindigkeit bzw. Druck. Die Detektion des Analyten erfolgt zumeist spektrophotometrisch mithilfe eines UV/Vis-Detektors (z. B. Photodiodenarray-Detektor). Durch Ermittlung einer Standardkurve können Analyten auf diesem Wege auch quantifiziert werden. Dafür werden zuvor Standardproben mit definierten Konzentrationen vermessen und daraufhin durch Interpolation eine Standardkurve gebildet, anhand derer die Signalstärke bzw. Absorption der Substanz einer Konzentration zugeordnet wird.

Da es sich bei der Retentionszeit um eine Stoffkonstante handelt, kann diese verwendet werden, um eine Substanz zu identifizieren. Sofern diese jedoch nicht bekannt ist bzw. neue Methoden validiert werden, eignet sich die direkte Kopplung einer massenspektrometrischen Analyse (MS) an die LC, um die aufgetrennten Analyten anhand ihrer Masse zu identifizieren. Dabei werden geladene Teilchen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m z^{-1}$ ) getrennt. Dazu muss der Analyt ionisiert werden. Eine geeignete und sanfte Methode stellt dafür die Elektrospray-Ionisation (ESI) dar, bei der die Analytlösung an einer Metallkapillare (Ionenquelle) geladen, in Form eines Kegels versprüht und durch eine angelegte Spannung in Richtung einer Elektrode geleitet wird. Das Lösungsmittel wird durch ein Inertgas verdampft und die geladenen Teilchen im Massenanalysator (z. B. Quadrupol)

entsprechend der Masse/Ladungs-Verhältnisse selektiert. Im Falle der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) werden die selektierten Teilchen daraufhin in einer Kollisionskammer fragmentiert. Die aus der „Muttersubstanz“ generierten Fragmentationen („Tochterfragmente“) sind für diese spezifisch und werden daraufhin in einem weiteren Massenanalysator selektiert und letztendlich detektiert.

**Vorbereitung der Proben- und Standardlösungen** Die Vorbehandlung und Probenahme aus subkutanem Gewebe von C57BL/6 und HDMEC wurden wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben durchgeführt. Bei der Aufreinigung von 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (Kapitel 2.7.2) wurden den Überständen der Gewebelysate bzw. den isolierten Medien jedoch vor pH-Einstellung definierte Mengen eines internen Standards (1000 pg 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> -d<sub>4</sub>, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) hinzugefügt. Durch die vierfache Deuterierung (d<sub>4</sub>) des 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  lässt sich der interne Standard ( $M = 374,5 \text{ g mol}^{-1}$ ) trotz gleichen physikochemischen Verhaltens massenspektrometrisch eindeutig vom Analyten ( $M = 370,5 \text{ g mol}^{-1}$ ) unterscheiden. Durch Zugabe einer definierten Menge lassen sich im Nachhinein mögliche Verluste bei der Aufreinigung kalkulieren bzw. der Erfolg der Detektion nachweisen. Die weitere Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben. Die evaporierten Proben wurden in 50  $\mu\text{L}$  Methanol 30% (LC-MS Grade) rekonstituiert und in LC-MS-Glasvials (1 mL, 12 x 32 mm, Snap Neck Total Recovery Vial inkl. Snap Neck Cap mit PTFE/Silikon-Septum, Waters, Eschborn) überführt.

Für die Kalibrierung wurden Standardlösungen mit definierten Mengen an kommerziell erwerblichem 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) und dem internen Standard 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> -d<sub>4</sub> hergestellt und vermessen. Es wurden Lösungen mit 50 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 25 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 12,5 pg  $\mu\text{L}^{-1}$ , 6,25 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  und 3,125 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  und jeweils 20 pg  $\mu\text{L}^{-1}$  6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> -d<sub>4</sub> in 50  $\mu\text{L}$  Methanol 30% (LC-MS grade) verwendet.

**Durchführung** Die Messungen erfolgten an der in Abb. 17 dargestellten Acquity UPLC<sup>®</sup> I-Class mit LG 500 nm Photodiodenarray-Detektor und Tripel-Quadrupol (TQD)-MS (Waters, Eschborn). Als Trennsäule wurde eine Acquity UPLC<sup>®</sup> HSS C18-Säule (1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 150 mm) mit einer vorgeschalteten Acquity UPLC<sup>®</sup> HSS C18 VanGuard-Vorsäule (1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1 x 5 mm; beide Waters, Eschborn) verwendet. Die angelegte Säulentemperatur betrug 50 °C. Fließmittel A bestand aus 5 mM Ammoniumformiat und 0,1% Ameisensäure in Wasser und Fließmittel B aus 0,1% Ameisensäure in Acetonitril (alle LC-MS Grade). Es wurde der negative Modus der ESI (ES<sup>-</sup>) gewählt, bei dem durch Anlegung einer negativen Spannung an der Metallkapillare negativ geladene Analytionen gebildet werden. Die Proben wurden in einen Autosampler eingefügt und jeweils ein Injektionsvolumen von 10  $\mu\text{L}$  über eine Zeit von 10 min vermessen. Die Fließmittelzusammensetzung über die Messdauer entsprach dem in Tab. 7 dargestellten mehrstufigen Gradienten.



**Abb. 17:** Fotografie der verwendeten LC-MS/MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry)-Anlage. Die Acquity UPLC® I-Class mit LG 500 nm Photodiodenarray-Detektor und Tripel-Quadrupol- (TQD-) MS (Waters, Eschborn) wurde durch das Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

**Tab. 7:** Gradient der Fließmittelzusammensetzung und Flussrate über die Dauer der erfolgten Flüssigkeitschromatographie (LC).

Zeit [min]	Flussrate [mL min <sup>-1</sup> ]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
initial	0,45	87,0	13,0
0,50	0,45	87,0	13,0
5,00	0,45	50,0	50,0
5,75	0,45	5,0	95,0
7,25	0,45	5,0	95,0
7,50	0,45	87,0	13,0
10,00	0,45	87,0	87,0

Die spektrophotometrische Detektion der Analyten erfolgte im Wellenlängenbereich von 190 bis 430 nm. Die anschließende MS/MS wurde unter den in Tab. 8 zusammengefassten Bedingungen durchgeführt.

**Tab. 8:** Zusammenfassung der Bedingungen bei der erfolgten Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).

<b>Ionenquellen-Temperatur [°C]</b>	150
<b>Angelegte (Kegel-) Spannung [V]</b>	36,0
<b>Sprühfluss [L h<sup>-1</sup>]</b>	20
<b>Inertgas-Temperatur [°C]</b>	400
<b>Inertgas-Fluss (Verdampfung) [L h<sup>-1</sup>]</b>	800
<b>Inertgas-Fluss (Kollisionskammer) [mL min<sup>-1</sup>]</b>	0,10

Für die Standards ergaben sich bei der LC-MS/MS die in Tab. 9 dargestellten Retentionszeiten und Fragment- bzw. Tochterionen, mit deren Hilfe der Analyt in den Proben gezielt zugeordnet werden konnte.

**Tab. 9:** Ermittelte Retentionszeiten und Tochterionen der analysierten Standardsubstanzen 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-Keto-PGF<sub>1α</sub>) und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-d4 (vierfach deuteriert). m z<sup>-1</sup> = Masse-Ladungsverhältnis

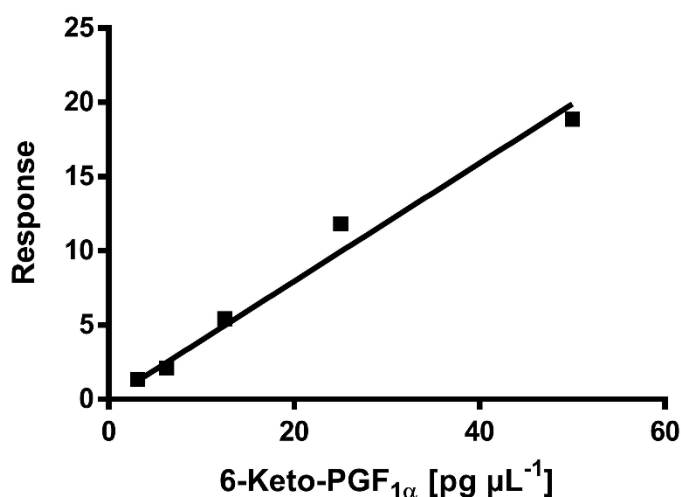
<b>Analyt (molekulare Masse)</b>	<b>Retentions- zeit [min]</b>	<b>Mutterion [M-H]<sup>-</sup> [m z<sup>-1</sup>]</b>	<b>Tochterionen [m z<sup>-1</sup>]</b>	<b>Kollisions- energie [eV]</b>	<b>Verweilzeit [s]</b>
6-Keto-PGF <sub>1α</sub> (370,5 g mol <sup>-1</sup> )	4,32	369,2	163,0	22,0	0,050
			207,0	20,0	0,050
			245,0	24,0	0,050
6-Keto-PGF <sub>1α</sub> -d4 (374,5 g mol <sup>-1</sup> )	4,31	373,2	167,0	22,0	0,050
			211,0	20,0	0,050
			249,0	24,0	0,050

Die Datenerhebung erfolgte mithilfe der Software MassLynx 4.1. Die Datenauswertung wurde mit TargetLynx durchgeführt (beide Waters, Eschborn).

**Kalibrierung und Standardkurve** Um die bei der LC erhaltenen Signalgrößen (Peakfläche bzw. Area under the Curve, AUC) in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten beschreiben und damit 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> quantifizieren zu können, war eine Kalibrierung notwendig. Dazu wurden den Standardlösungen definierte Mengen des Analyts 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> und des internen Standards 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-d4 zugefügt. Für jede Standardlösung wurde die ermittelte AUC des Analyts (AUC<sub>A</sub>) ins Verhältnis zur Konzentration (c<sub>IS</sub>) und der AUC des internen Standards (AUC<sub>IS</sub>) gesetzt (Response):

$$\frac{AUC_A \times c_{IS}}{AUC_{IS}}$$

Die Response-Werte der Standardlösungen wurden daraufhin gegen ihre Konzentrationen aufgetragen und die Standardkurve interpoliert (Abb. 18).



**Abb. 18:** Ermittelte Standardkurve zur Quantifizierung von 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-Keto-PGF<sub>1α</sub>) mittels LC-MS/MS (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry). Aufgetragen ist die kalibrierte Signalgröße (Response) gegen die 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration (in pg μL<sup>-1</sup>).

Nach Vermessung der Probenlösungen konnte auf die gleiche Art und Weise für jede Probe ein Response-Wert berechnet und die unbekannte Konzentration mithilfe der Standardkurve interpoliert werden. Daraufhin konnte die Gesamtmenge an 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> je Probe bestimmt und bezogen auf die Ausgangsmenge an Zellmedium (in pg mL<sup>-1</sup>) dargestellt wer-

den. Die Detektion von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> aus subkutanem Gewebe war hingegen nicht erfolgreich, da Matrixeffekte des Gewebes die Extraktion des Analyten möglicherweise beeinträchtigt haben.

## **2.8 Präparation und Analyse von RNA (Genexpressionsanalyse)**

Zur Untersuchung der Genexpression wurde dorsales Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason isoliert und die Ribonukleinsäure (RNA) aufgereinigt. Anschließend wurde die Messenger-RNA (mRNA)-Expression mithilfe der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Microarray-Technologie analysiert.

### **2.8.1 Isolierung und Aufreinigung der RNA**

C57BL/6 (männlich, 10 bis 12 Wochen alt) wurden mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> KG) oder Vehikel i. p. behandelt. Nach 160 min wurden die Mäuse mit Ketamin (100 mg kg<sup>-1</sup> KG) und Xylazin (5 mg kg<sup>-1</sup> KG) i. p. betäubt und daraufhin rasiert und enthaart. Die Mäuse wurden nach insgesamt 180 min mittels zervikaler Dislokation euthanasiert und die dorsale Haut präpariert. Daraufhin wurde mit einem sterilen Skalpell das Subkutangewebe abgekratzt und zur Stabilisierung der RNA in RNAprotect®-Reagenz (Qiagen, Hilden) überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde das Reagenz verworfen und das Gewebe bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die Homogenisierung des Subkutangewebes erfolgte mithilfe eines ausschließlich für die RNA-Isolierung eingesetzten Rotor-Stator-Homogenisators (Ultra-Turrax® T8, IKA Labor-technik, Staufen). Für die RNA-Aufreinigung wurde anschließend das RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die im Folgenden erwähnten Reagenzien (mit Ausnahme der Proteinase K und der DNase I) sind Bestandteile des RNeasy® Mini Kits und wurden daher nicht zusätzlich aufgeführt. Unmittelbar vor Beginn der Aufreinigung wurde der RLT-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (10 µL mL<sup>-1</sup>) und das RPE-Puffer-Konzentrat mit Ethanol (absolut) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Zudem wurde für den DNase-Verdau lyophilisierte DNase I (RNase-Free DNase Set, 1500 Kunitz-Einheiten. Qiagen, Hilden) in 550 µL RNase-freiem Wasser rekonstituiert und unmittelbar vor Gebrauch mit RDD-Puffer verdünnt (DNase-Mix, 1:8).

Jeweils 20 mg der nach Stabilisierung mit RNAprotect® tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mit 600 µL kaltem, denaturierendem RLT-Lysispuffer versetzt und mittels Rotor-Stator-Homogenisator auf höchster Stufe für 30 s auf Eis lysiert. Der Homogenisator wurde dabei



nach jeder Probe mit 0,1% NaOH-Lösung und nukleasefreiem Wasser gespült. Anschließend wurden die Homogenate auf QiaShredder®-Säulen (Qiagen, Hilden) überführt und für 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde daraufhin mit 590 µL nukleasefreiem Wasser und 10 µL Proteinase K (0,5 mg mL<sup>-1</sup>, Qiagen, Hilden) versetzt und für 10 min bei 55 °C inkubiert (750 rpm). Die Proben wurden zentrifugiert (3 min, 10000 g) und die Überstände (900 µL) in neue Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe des 0,5-fachen Volumens Ethanol (absolut) (450 µL) wurde der gesamte Ansatz auf eine RNeasy®-Säule überführt und zentrifugiert (15 s, 10000 g). Hierbei wurde die RNA an die Säulenmatrix gebunden, sodass der Durchfluss (sowie alle folgenden Waschfraktionen) verworfen werden konnten. Die Säule wurde mit 350 µL RW1-Puffer gewaschen (15 s, 10000 g) und anschließend zum Abbau enthaltener DNA mit 80 µL des DNase-Mix versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut mit 350 µL RW1-Puffer (15 s, 10000 g) und zuletzt zweimal mit 500 µL des ethanolhaltigen RPE-Puffers gewaschen (15 s, 10000 g). Zuletzt wurde die RNA in 30 µL nukleasefreiem Wasser eluiert (1 min, 10000 g).

### 2.8.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

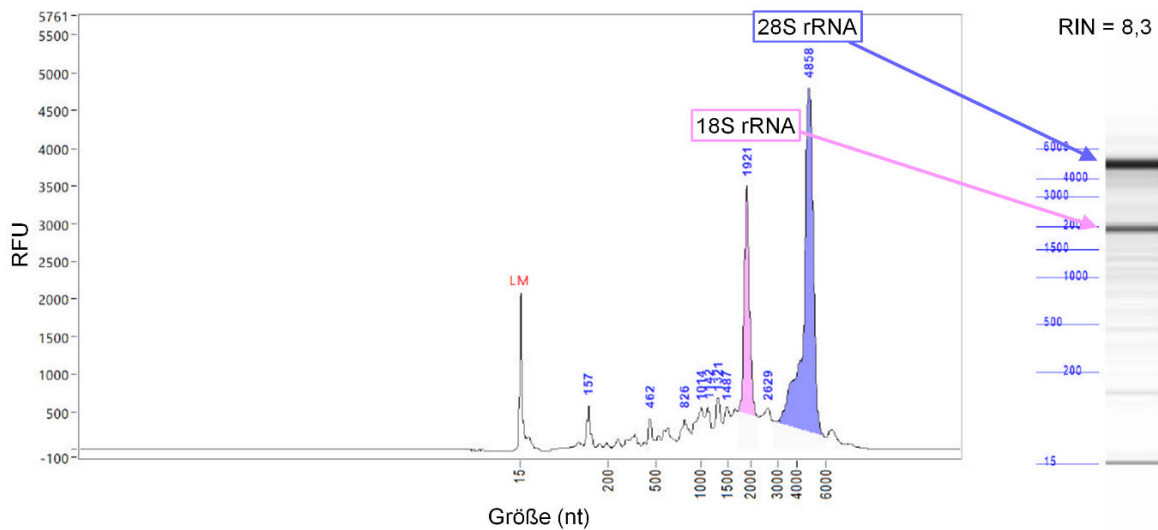
Die Konzentration der eluierten RNA wurde bei 260 nm und 280 nm spektrophotometrisch bestimmt (NanoDrop® ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Meerbusch). Die Proben wurden nur verwendet, wenn der Quotient der optischen Dichten bei 260 nm/280 nm zwischen 1,8 und 2 lag.

### 2.8.3 DNA-Microarray-Analyse

Die Genexpressionsanalyse mittels Microarray wurde in Zusammenarbeit mit dem Genomics & Transcriptomics Laboratory (GTL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die aufgereinigten RNA-Proben wurden auf eine Konzentration von 100 ng µL<sup>-1</sup> eingestellt und dann dem GTL übergeben.

**Bestimmung der RNA-Integrität** Im Rahmen der durch das GTL durchgeführten Qualitätskontrolle wurde die Qualität der RNA in Form der RNA Integrity Number (RIN) festgestellt. Hierbei wurde für jede Probe nach kapillargelelektrophoretischer Auftrennung der RNA eine Fragmentanalyse vorgenommen (5200 Fragment Analyzer + DNF-471 RNA Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Als Indikator für die Integrität der RNA dient insbesondere die Ausprägung der Banden der 28S (Svedberg) ribosomalen RNA (rRNA) und 18S rRNA (Abb. 19). Die Berechnung der RIN erfolgt daraufhin computerbasiert anhand eines Algorithmus und wurde das erste Mal 2006 von Schroeder *et al.* beschrieben (187).

Für die daraufhin folgende DNA-Microarray-Analyse wurden nur RNA-Proben mit einer RIN von mindestens 7 eingesetzt.



**Abb. 19:** Darstellung eines Elektropherogramms (links) und des zugehörigen Gels (rechts) nach Durchführung einer Ribonukleinsäure (RNA)-Fragmentanalyse mittels Kapillargelelektrophorese (5200 Fragment Analyzer + DNF-471 RNA Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) am Beispiel einer RNA-Probe mit einer RNA Integrity Number (RIN) von 8,3. Die entsprechend ihrer Größe nach der Anzahl der Nucleotide (nt) aufgetrennte RNA kann hierbei durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff visualisiert und anhand der Intensität quantifiziert werden (RFU = Relative Fluorescence Units). Insbesondere die Ausprägung der Banden der 18S (Svedberg) ribosomalen RNA (rRNA, 1921 nt, rosa) und der 28S rRNA (4858 nt, lila) dient als Indikator für die Integrität der RNA-Probe. LM = Lower Marker.

**Theoretische Grundlagen** Die DNA-Microarray-Analyse ist eine Methode zur parallelen Quantifizierung der Expression einer Vielzahl einzelner Gene mithilfe geringer Mengen nukleinsäurebasierter Probenmengen. Dabei werden einzelsträngige DNA-Sequenzen definierter Gene (Probes) auf einer Membran (Chip) immobilisiert. Zu untersuchende, markierte Nukleinsäuresequenzen (Targets) können mit komplementären Gensequenzen hybridisieren und anhand der Intensität des Signals quantifiziert werden (188).

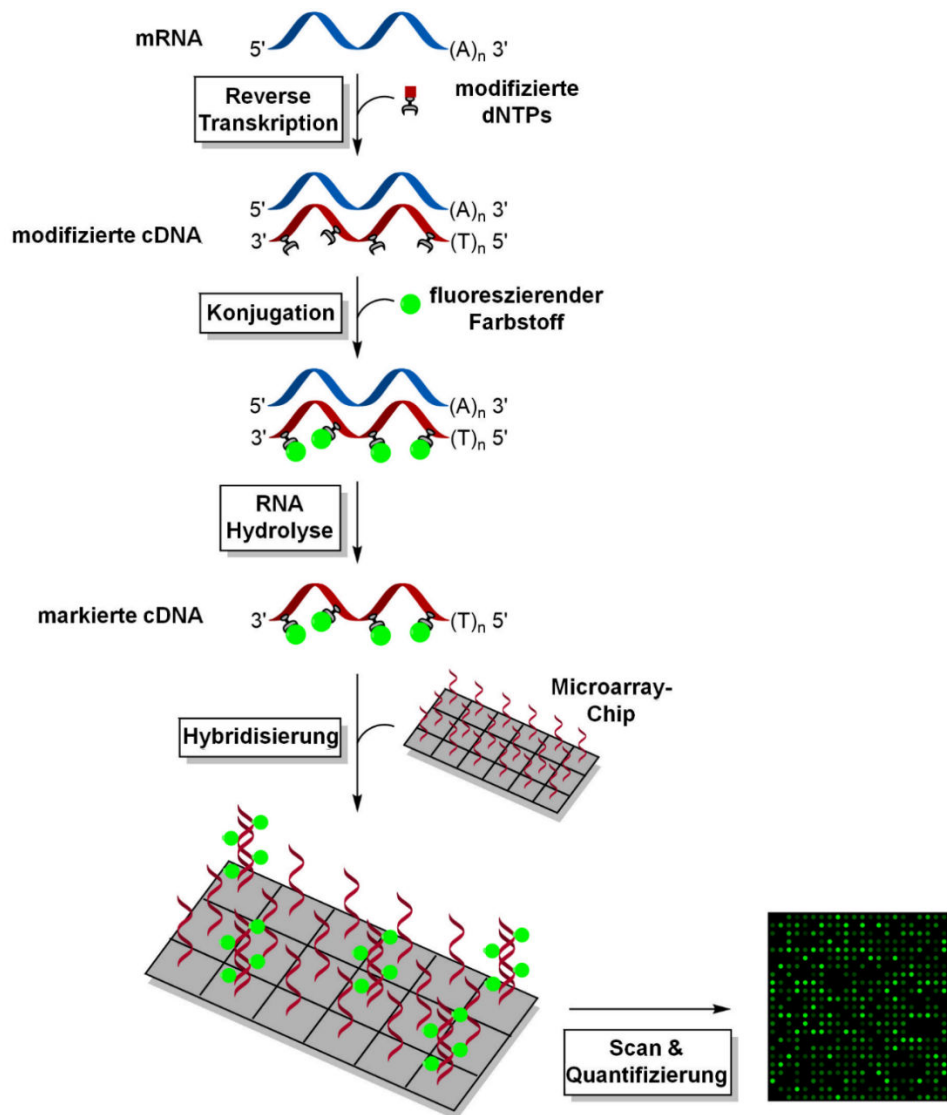
Das Grundprinzip beruht auf der bereits 1953 durch Watson und Crick entdeckten Eigenschaft komplementärer DNA-Stränge, durch Hybridisierung eine reversible, doppelsträngige Helix auszubilden (189). Dabei ist die Abfolge der vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin in den zwei DNA-Strängen entscheidend, wobei Adenin (Purinbase) mit Thymin (Pyrimidinbase) zwei und Guanin (Purinbase) mit Cytosin (Pyrimidinbase) drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet (190).

Bei der Genexpression wird im Zellkern eukaryotischer Zellen zunächst der codogene bzw. Antisense-DNA-Strang in eine komplementäre, vorläufige prä-mRNA umgeschrieben (Transkription). Dabei wird im Gegensatz zur DNA die Pyrimidinbase Uracil an Stelle von

Thymin als komplementäre Base zu Adenin verwendet. Ansonsten ist die Basenabfolge der prä-mRNA und des nicht-codogenen bzw. Sense-DNA-Strangs identisch. Daraufhin werden posttranskriptionale Modifikationen an der prä-mRNA vorgenommen, wie das Ausschneiden (Splicing) nicht kodierender Abschnitte (Introns) oder das Anhängen eines Poly(Adenin)-Schwanzes an das 3'-Kohlenstoff-Ende der mRNA (Prozessierung). Die nun reife mRNA verlässt den Zellkern und ist bereit für die Proteinexpression an den Ribosomen im Cytosol (Translation) (191).

Bei der DNA-Microarray-Analyse wird die Genexpression auf Transkriptomebene, das heißt anhand der in mRNA-Form vorliegenden Gene, untersucht. Die mRNA wird zunächst durch Reverse Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (Abb. 20). Dabei werden dem Reaktionsansatz modifizierte dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) zugesetzt, die in der Lage sind, einen entsprechenden fluoreszierenden Farbstoff zu binden (192). Die daraufhin markierte cDNA kann nun mittels DNA-Microarray untersucht werden. Die immobilisierten DNA-Sequenzen auf dem Chip sind komplementär zu der gebildeten cDNA bekannter Gene und in einer großen Zahl in Form eines Rasters angeordnet. Somit entspricht jeder Punkt eines DNA-Microarray-Chips einem definierten Gen. Liegen in der untersuchten Probe komplementäre cDNA-Sequenzen vor, kommt es zu einer Hybridisierung im entsprechenden Feld und einer Steigerung der Fluoreszenzintensität für das jeweilige Gen. Die Signale können daraufhin quantifiziert werden und geben Informationen darüber, in welcher Stärke ein Gen exprimiert wurde (193).

**Durchführung und Auswertung** Die DNA-Microarray-Analyse wurde durch das GTL als Core Facility vorgenommen. Analysiert wurde die zuvor aufgereinigte Gesamt-RNA (jeweils ~1 µg) aus dorsalem Subkutangewebe von C57BL/6 nach i. p. Vorbehandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> KG) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit. Nach Bestimmung der RNA-Integrität im Rahmen der Standard-Qualitätskontrolle per Fragmentanalyse (5200 Fragment Analyzer + DNF-471 RNA Kit, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurden nur Proben mit einer RIN von mindestens 7 verwendet. Die RNA wurde mittels GeneChip 3' IVT Pico Kit (Thermo Fisher Scientific, Meerbusch) den Herstellerangaben entsprechend behandelt. Als DNA-Microarray-Chip wurde der Clariom™ S Pico (Thermo Fisher Scientific, Meerbusch) verwendet. Die Auswertung der durch das GTL zur Verfügung gestellten Daten erfolgte in Eigenarbeit mithilfe einer durch Thermo Fisher Scientific kostenfrei zur Verfügung gestellten Software (Transcriptome Analysis Console 4.0.2). Die grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism 6.04 (San Diego, USA). Die Signale der Gene wurden als binärer Logarithmus ( $\log_2$ ) der quantifizierten Signalstärke angegeben.



**Abb. 20:** Vereinfachte Darstellung des Ablaufs eines DNA-Microarray-Experiments zur Genexpressionsanalyse. Die aufgereinigte Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) wird durch eine Reverse Transkriptase und Zugabe modifizierter Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) in eine modifizierte, komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Die in die cDNA eingebauten, modifizierten Nucleotide sind in der Lage, einen entsprechenden fluoreszierenden Farbstoff zu binden (Konjugation), wodurch die cDNA markiert werden kann. Nach Hydrolyse der Matrizen-mRNA wird die cDNA auf einen Microarray-Chip aufgetragen und kann dort mit komplementären, immobilisierten DNA-Strängen, die Sequenzen definierter Gene entsprechen, hybridisieren. Das Fluoreszenzsignal an den Punkten bzw. der einzelnen Gene steigt dabei proportional zur Menge an hybridisierter cDNA und kann quantifiziert werden. 5' = 5'-Kohlenstoff-Ende, A = Adenin, (A)<sub>n</sub> = Poly(Adenin)-Schwanz, 3' = 3'-Kohlenstoff-Ende, T = Thymin, (T)<sub>n</sub> = Poly(Thymin)-Ende

## 2.9 Statistische Datenauswertung

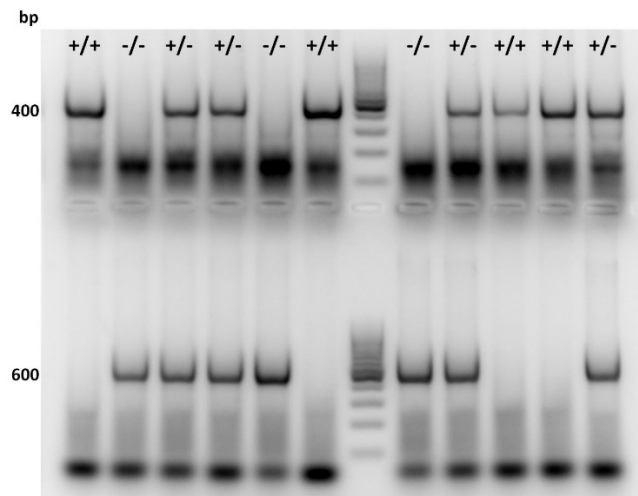
Alle Daten (mit Ausnahme von Teilen der Microarray-Analyse) wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 6.04 (San Diego, USA) analysiert. Die Ergebnisse von Versuchsreihen sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (MW  $\pm$  SEM) angegeben, wobei n die Anzahl der Einzelversuche darstellt. Bei Versuchen, die mit einer Doppelbestimmung einhergingen, wurde der Mittelwert der Replikate gebildet, sodass sich ein  $n = 1$  ergibt. Mögliche Ausreißer wurden mithilfe des Ausreißertests nach Grubbs erkannt. Statistische Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgten entweder mittels ungepaartem t-Test oder Tukeys *post hoc*-Test nach einfacher ANOVA (bei mehr als zwei Gruppen). *Post hoc*-Tests wurden nur durchgeführt, wenn F einen P-Wert kleiner als 0,05 ( $P < 0,05$ ) erreichte und keine signifikante Inhomogenität der Varianz vorlag.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## Ergebnisse

### 3.1 Nachweis des Cyclooxygenase-1-Knockouts in COX-1<sup>-/-</sup>

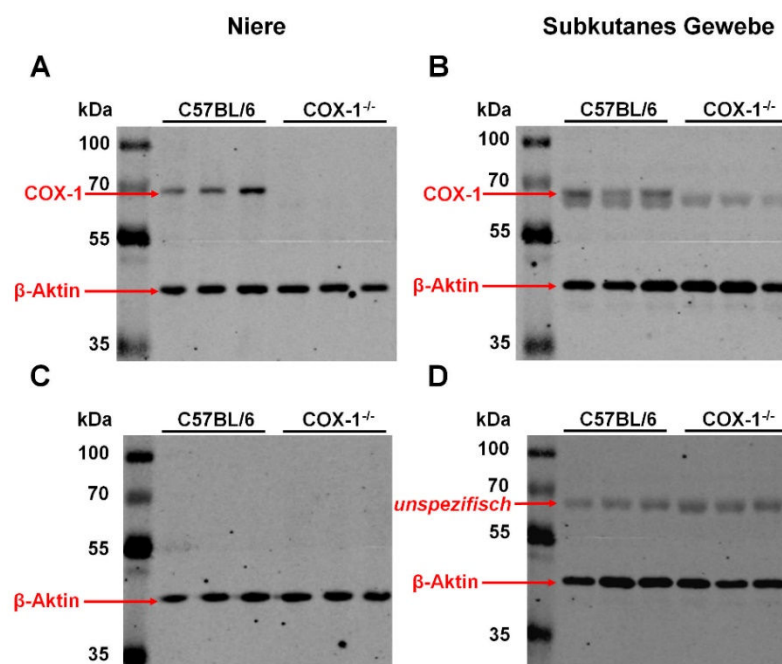
Um den Einfluss der COX-1 auf die B2-vermittelte dermale Extravasation zu untersuchen, wurde eine transgene COX-1-defiziente Mauslinie (COX-1<sup>-/-</sup>) mit C57BL/6-Hintergrund verwendet. Der vollständige Knockout der COX-1 in COX-1<sup>-/-</sup> wurde zunächst durch Genotypisierung mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese festgestellt. Daraufhin konnte nach Western Blot der aufgereinigten Proteinfraction und anschließender Immundetektion von COX-1 der Knockout nachgewiesen werden.

Die DNA aus den Biopsien der Zuchtlinie wurde wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben aufgearbeitet und die Sequenzen, die das Vorliegen des intakten (+/+) bzw. defekten *PTGS1*-Gens (-/-) anzeigen, mithilfe der jeweiligen Primer vervielfältigt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA im Agarosegel konnten anhand der unter UV-Licht detektierbaren Fluoreszenzbanden die Mäuse genotypisiert werden (Abb. 21).



**Abb. 21:** Fluoreszenzaufnahme eines Agarosegels nach Gelelektrophorese zur Genotypisierung der Cyclooxygenase (COX)-1-defizienten Mauslinie (COX-1<sup>-/-</sup>). Nach Vervielfältigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen zum Nachweis des intakten bzw. defekten *PTGS1*-Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend unter ultraviolettem Licht detektiert. Mithilfe eines kommerziell erwerblichen DNA-Markers konnten die DNA-Fragmente einer Größe (in Basenpaaren, bp) zugeordnet werden. Eine Fluoreszenzbande bei 600 bp zeigt das Vorliegen des defekten (-/-) *PTGS1*-Gens bzw. den vollständigen COX-1-Knockout an, wohingegen eine Bande bei 400 bp das intakte Gen bzw. den Wildtyp nachweist (+/+). Sofern beide Banden detektiert werden konnten, handelte es sich um einen heterozygoten Genotyp (+/-). Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

Zur weiteren Verifizierung des COX-1<sup>-/-</sup>-Knockouts wurden den Mäusen Nieren und dorsales Subkutangewebe entnommen und die Proteinfractionen wie in Kapitel 2.4 beschrieben aufgereinigt und quantifiziert. Die Proteine wurden daraufhin denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Kapitel 2.4.3). Nach Fixierung der Proteine mithilfe von Western Blots (Kapitel 2.4.4) konnte COX-1 (69 kDa) in C57BL/6 sowohl in Homogenaten der Niere (Abb. 22A) als auch des subkutanen Gewebes (Abb. 22B) detektiert werden, wohingegen in entsprechenden Gewebekomogenaten aus COX-1<sup>-/-</sup> kein Signal detektiert werden konnte. Die Spezifität des verwendeten Anti-COX-1-Antikörpers (Tab. 4) wurde überprüft, indem mit denselben Proben weitere Western Blots durchgeführt wurden, wobei die anschließende Immundetektion ohne Zugabe des Anti-COX-1-Primärantikörpers erfolgte. Daraufhin konnte auch in den Homogenaten aus der Niere (Abb. 22C) und des subkutanen Gewebes (Abb. 22D) von C57BL/6 kein COX-1-Signal mehr detektiert werden. Bei allen Blots wurde parallel zu COX-1 das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Aktin (42 kDa) detektiert, welches als Ladekontrolle verwendet wurde. Die Ergebnisse bestätigen die Abwesenheit von detektierbarem COX-1 in den untersuchten Geweben aus COX-1<sup>-/-</sup>.



**Abb. 22:** Fluoreszenzaufnahmen der Immundetektion von Cyclooxygenase (COX)-1 nach Western Blot in Niere und Subkutangewebe von C57BL/6 und COX-1-defizienten Mäusen (COX-1<sup>-/-</sup>). In C57BL/6 konnte in Homogenaten der (A) Niere und (B) des dorsalen Subkutangewebes COX-1 (69 kDa) detektiert werden, wohingegen dies in entsprechenden Homogenaten aus COX-1<sup>-/-</sup> nicht möglich war. (C) Zur Kontrolle der Spezifität des Anti-COX-1-Antikörpers und der detektierten Signale wurden die gleichen Blots ohne Zugabe dieses Antikörpers durchgeführt, woraufhin keine COX-1-Signale detektiert werden und (D) für COX-1 unspezifische Banden eindeutig als solche nachgewiesen werden konnten. Für alle Blots wurde  $\beta$ -Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle verwendet. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

## 3.2 Untersuchungen der Bradykinin-vermittelten dermalen Extravasation

### 3.2.1 Aktivierung des Bradykinin-B2-Rezeptors

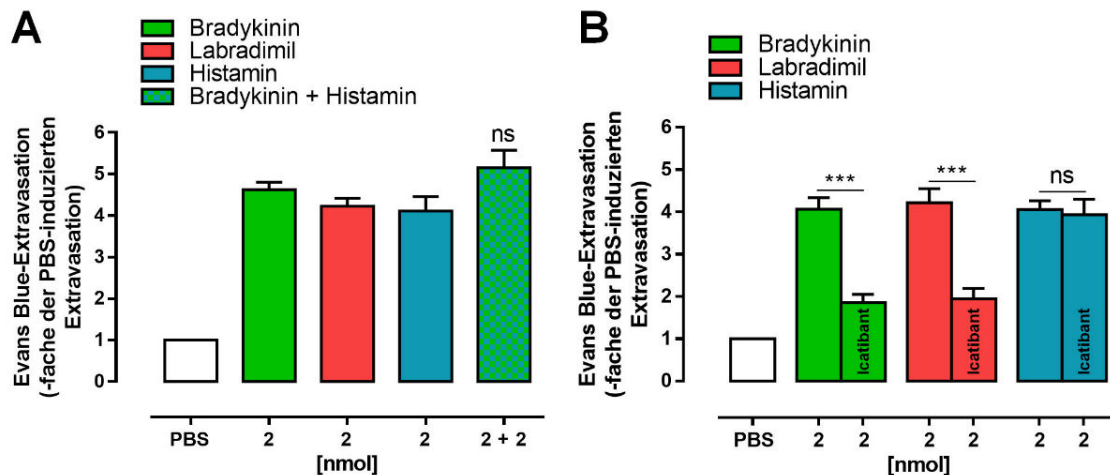
Um den Einfluss von Bradykinin auf die dermale Extravasation zu untersuchen, wurde der Miles Assay verwendet (Kapitel 2.5). In C57BL/6 wurden 20 min nach i. v. Evans Blue-Applikation jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin sowie eine Kombination aus 2 nmol Bradykinin und 2 nmol Histamin (alle jeweils in 30  $\mu$ L PBS) i. d. in die Rückenhaut injiziert. Als Kontrolle diente eine i. d. Injektion mit PBS. Nach 30 min wurde die Maus euthanasiert und nach Isolation der Extravasate der Farbstoff extrahiert und quantifiziert. Bradykinin ( $n = 6$ ,  $4,63 \pm 0,18$ -fach), Labradimil ( $n = 6$ ,  $4,22 \pm 0,19$ -fach) und Histamin ( $n = 6$ ,  $4,11 \pm 0,35$ -fach) induzierten die dermale Extravasation in Relation zu PBS in einem vergleichbaren Ausmaß (Abb. 23A). Die Kombination aus Bradykinin und Histamin führte im Vergleich zur Applikation der einzelnen Substanzen nur zu einer tendenziell erhöhten jedoch nicht signifikant (ns) verstärkten dermalen Extravasation ( $n = 6$ ,  $5,15 \pm 0,42$ -fach PBS).

Durch Hemmung des B2-Rezeptors mithilfe des B2-Antagonisten Icatibant sollte der Einfluss der B2-Aktivierung näher untersucht werden. Hierzu wurde Icatibant (2 nmol) gemeinsam mit der Evans Blue-Lösung i. v. appliziert, ehe nach 20 min die dermale Extravasation durch i. d. Gabe von Bradykinin; Labradimil und Histamin (jeweils 2 nmol in 30  $\mu$ L PBS) induziert wurde. Icatibant reduzierte sowohl die Bradykinin- (jeweils  $n = 6$ , von  $4,07 \pm 0,27$ - auf  $1,86 \pm 0,20$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) als auch die Labradimil-induzierte dermale Extravasation (jeweils  $n = 6$ , von  $4,22 \pm 0,33$ - auf  $1,95 \pm 0,24$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) im Vergleich zur Behandlung mit Vehikel (Abb. 23B). Die Histamin-induzierte dermale Extravasation wurde nicht signifikant beeinflusst (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). Die Daten zeigen, dass die Bradykinin- und Labradimil-induzierte Extravasation in jungen und gesunden C57BL/6 in erster Linie durch B2-Aktivierung vermittelt wird.

### 3.2.2 Hemmung der Cyclooxygenase

COX ist das Schlüsselenzym bei der Synthese bioaktiver PGs und TX. Sie setzen Arachidonsäure über die instabile Zwischenstufe PGG<sub>2</sub> zu PGH<sub>2</sub> um, ehe dieses durch entsprechende Synthesen zu den biologisch wirksamen PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub> bzw. TXA<sub>2</sub> synthetisiert wird (131). Zur Untersuchung der Beteiligung der COX an der B2-vermittelten dermalen Extravasation, wurden im Miles Assay die unselektiven COX-1/COX-2-Inhibitoren Ibuprofen (12 mg kg<sup>-1</sup> KG) und Diclofenac (5 mg kg<sup>-1</sup> KG) verwendet. In C57BL/6 führte

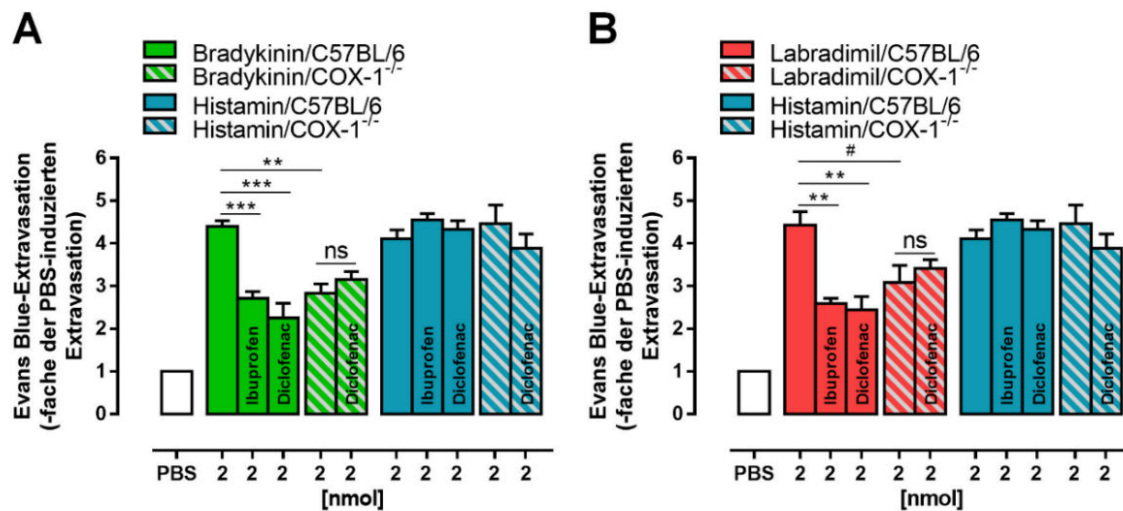




**Abb. 23:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 zur Untersuchung des Einflusses der Bradykinin-B2-Rezeptor-Aktivierung auf die dermale Extravasation. (A) Dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin ( $n = 6$ ,  $4,63 \pm 0,18$ -fach), Labradimil ( $n = 6$ ,  $4,22 \pm 0,19$ -fach) und Histamin ( $n = 6$ ,  $4,11 \pm 0,35$ -fach) führten zu einer untereinander vergleichbaren Induktion der dermalen Extravasation in Relation zu einer Kontrollinjektion mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Eine Kombination aus jeweils 2 nmol Bradykinin und Histamin führte zu keinem signifikant verstärkten Effekt ( $n = 6$ ,  $5,15 \pm 0,42$ -fach PBS). (B) Eine Vorbehandlung mit dem B2-Antagonisten Icatibant (2 nmol intravenös) führte zu einer Reduktion der sowohl Bradykinin- ( $n = 6$ , von  $4,07 \pm 0,27$ - auf  $1,86 \pm 0,20$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) als auch Labradimil-induzierten dermalen Extravasation (jeweils  $n = 6$ , von  $4,22 \pm 0,33$ - auf  $1,95 \pm 0,24$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ), wohingegen die Histamin-induzierte dermale Extravasation nicht signifikant beeinflusst wurde (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

sowohl die Vorbehandlung mit Ibuprofen (jeweils  $n = 5$ , von  $4,40 \pm 0,13$ - auf  $2,72 \pm 0,15$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) als auch mit Diclofenac ( $n = 5$ , auf  $2,25 \pm 0,34$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) zu einer signifikanten Reduktion der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation im Vergleich zur Vorbehandlung mit Vehikel (Abb. 24A). In COX-1<sup>-/-</sup> zeigte Diclofenac keinen Effekt (jeweils  $n = 5$ , ns vs. Vehikel). Zudem zeigten COX-1<sup>-/-</sup> nach Behandlung mit reinem Vehikel im Vergleich zu C57BL/6 generell eine signifikant verringerte Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation (jeweils  $n = 5$ ,  $2,83 \pm 0,22$ - vs.  $4,40 \pm 0,13$ -fach PBS,  $**P < 0,001$ ). Ähnliche Effekte konnten bei der Extravasation nach i. d. Injektion von Labradimil festgestellt werden (Abb. 24B). Die Labradimil-vermittelte Extravasation in der Haut von C57BL/6 konnte durch beide Substanzen im Vergleich zu Vehikel signifikant vermindert werden (Ibuprofen: jeweils  $n = 5$ , von  $4,43 \pm 0,31$ - auf  $2,59 \pm 0,13$ -fach PBS,  $**P < 0,001$ ; Diclofenac:  $n = 5$ , auf  $2,45 \pm 0,31$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ). Dahingegen konnte kein Effekt von Diclofenac in COX-1<sup>-/-</sup> festgestellt werden (jeweils  $n = 5$ , ns vs. Vehikel). Erneut wiesen COX-1<sup>-/-</sup> nach Vehikelbehandlung im Vergleich zu C57BL/6 eine reduzierte B2- bzw. Labradimil-vermittelte dermale Extravasation auf (jeweils  $n = 5$ ,  $3,09 \pm 0,40$ - vs.  $4,43 \pm 0,31$ -fach PBS,  $#P < 0,05$ ). Weder in C57BL/6 noch in COX-1<sup>-/-</sup> konnte ein Einfluss der unselektiven COX-1/COX-2-Inhibition auf die Histamin-induzierte

dermale Extravasation festgestellt werden (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Die Daten deuten auf einen starken Einfluss von COX-1 auf die B2-vermittelte Extravasation in der Haut von Mäusen hin.

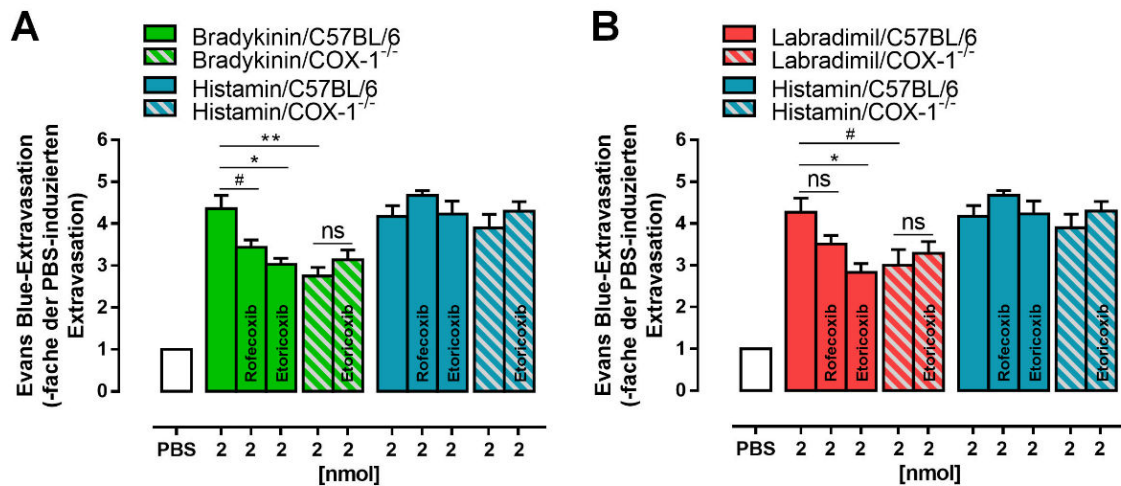


**Abb. 24:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 und Cyclooxygenase (COX)-1-defizienten Mäusen (COX-1<sup>-/-</sup>) nach Vorbehandlung mit den unselektiven COX-1/COX-2-Inhibitoren Ibuprofen oder Diclofenac. Zur Untersuchung des Einflusses der COX auf die Bradykinin-B2-Rezeptor-vermittelte dermale Extravasation wurde nach intraperitonealer Verabreichung von Ibuprofen (12 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Diclofenac (5 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation konnte in C57BL/6 nach Vorbehandlung mit sowohl Ibuprofen (jeweils n = 5, von 4,40 ± 0,13- auf 2,72 ± 0,15-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) als auch Diclofenac (n = 5, auf 2,25 ± 0,34-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) im Vergleich zu Vehikel signifikant reduziert werden, wohingegen Diclofenac in COX-1<sup>-/-</sup> keinen Effekt zeigte (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Zudem war die dermale Extravasation nach intradermaler Injektion von Bradykinin in COX-1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu C57BL/6 reduziert (jeweils n = 5, 2,83 ± 0,22- vs. 4,40 ± 0,13-fach PBS, \*\*P < 0,001). (B) Ähnliche Effekte konnten bei der Labradimil-vermittelten Extravasation festgestellt werden, bei der ebenfalls Ibuprofen (jeweils n = 5, von 4,43 ± 0,31- auf 2,59 ± 0,13-fach PBS, \*\*P < 0,001) und Diclofenac (n = 5, auf 2,45 ± 0,31-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) im Vergleich zu Vehikel die dermale Extravasation verminderten, jedoch kein nachweisbarer Effekt von Diclofenac in COX-1<sup>-/-</sup> detektiert werden konnte (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Auch hier konnte in COX-1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu C57BL/6 eine reduzierte Labradimil-vermittelte Extravasation beobachtet werden (jeweils n = 5, 3,09 ± 0,40- vs. 4,43 ± 0,31-fach PBS, #P < 0,05). Ein Einfluss der unselektiven COX-Inhibition auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation konnte weder in C57BL/6 noch in COX-1<sup>-/-</sup> festgestellt werden (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

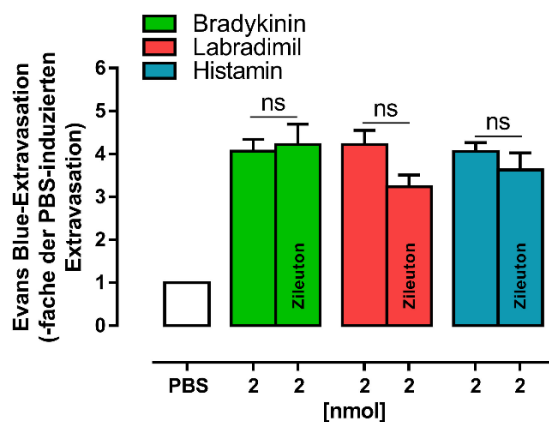
Da sowohl Ibuprofen als auch Diclofenac unselektive COX-Inhibitoren darstellen, wurden zudem die Effekte der COX-2-selektiveren Inhibitoren Rofecoxib (10 mg kg<sup>-1</sup> KG) und Etoricoxib (20 mg kg<sup>-1</sup> KG) untersucht. Die Bradykinin-vermittelte Extravasation in der Haut von C57BL/6 konnte sowohl mit Rofecoxib (jeweils n = 5, von 4,36 ± 0,32- auf 3,44 ± 0,18-fach PBS, #P < 0,05) als auch mit Etoricoxib (n = 5, auf 3,03 ± 0,14-fach PBS, \*P < 0,01) im Vergleich zu Vehikel signifikant vermindert werden (Abb. 25A). In COX-1<sup>-/-</sup> zeigte Etoricoxib keinen nachweisbaren Effekt mehr (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Ähnlich wie bei den in Abb. 24 dargestellten Ergebnissen, war die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation in COX-1<sup>-/-</sup>, die mit Vehikel vorbehandelt wurden, im Vergleich zu C57BL/6 reduziert (jeweils n = 5, 2,75 ± 0,21- vs. 4,36 ± 0,32-fach PBS, \*\*P < 0,001). In weiteren Experimenten (Abb. 25B) konnte die Labradimil-induzierte dermale Extravasation in C57BL/6 zwar nicht durch Rofecoxib (n = 5, ns) jedoch durch Etoricoxib im Vergleich zu Vehikel signifikant verringert werden (jeweils n = 5, von 4,27 ± 0,34- auf 2,83 ± 0,21-fach PBS, \*P < 0,01), während in COX-1<sup>-/-</sup> durch Etoricoxib kein Effekt beobachtet werden konnte (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Erneut zeigte sich zudem eine im Vergleich zu C57BL/6 verringerte Labradimil-induzierte dermale Extravasation in mit Vehikel behandelten COX-1<sup>-/-</sup> (jeweils n = 5, 3,00 ± 0,38- vs. 4,27 ± 0,34-fach PBS, #P < 0,05). Weder in C57BL/6 noch in COX-1<sup>-/-</sup> konnte ein Einfluss der selektiveren COX-2-Inhibition auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation festgestellt werden (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Die Resultate deuten darauf hin, dass die Effekte von Etoricoxib auf die B2-vermittelte dermale Extravasation in Mäusen in Verbindung zu einer Restaffinität zu COX-1 stehen könnten.

### 3.2.3 Inhibition der 5-Lipoxygenase

Leukotriene sind Entzündungsmediatoren, die unter anderem an der Chemotaxis von Immunzellen und der Erhöhung der Endothelpermeabilität beteiligt sein können. Sie gehen aus Arachidonsäure hervor, wobei das Enzym 5-LOX für die Biosynthese verantwortlich ist (194). Durch Hemmung der 5-LOX mithilfe des 5-LOX-Inhibitors Zileuton sollte die Produktion von Leukotrienen unterbunden und so ein möglicher Einfluss auf die B2-vermittelte dermale Extravasation untersucht werden. Im Miles Assay hatte die Vorbehandlung mit Zileuton (20 mg kg<sup>-1</sup> KG) jedoch verglichen mit der Vehikelbehandlung keine signifikante Wirkung auf die Bradykinin-, Labradimil- oder Histamin-induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 6, ns; Abb. 26), was darauf hindeutet, dass der 5-LOX-Signalweg keine entscheidende Rolle bei der B2-vermittelten dermalen Extravasation spielt.



**Abb. 25:** Resultate des Miles Assay in C57BL/6 und Cyclooxygenase (COX)-1-defizienten Mäusen (COX-1<sup>-/-</sup>) nach Vorbehandlung mit den selektiveren COX-2-Inhibitoren Rofecoxib oder Etoricoxib. Zur Untersuchung des Einflusses der COX auf die Bradykinin-B2-Rezeptor-vermittelte dermale Extravasation wurde nach intraperitonealer Applikation von Rofecoxib (10 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Etoricoxib (20 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) In C57BL/6 konnte die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation nach Vorbehandlung mit sowohl Rofecoxib (jeweils n = 5, von 4,36 ± 0,32- auf 3,44 ± 0,18-fach PBS, #P < 0,05) als auch mit Etoricoxib (n = 5, auf 3,03 ± 0,14-fach PBS, \*P < 0,01) im Vergleich zu Vehikel signifikant reduziert werden, wohingegen in COX-1<sup>-/-</sup> kein signifikanter Effekt durch Etoricoxib detektiert werden konnte (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Außerdem war die durch intradermale Injektion von Bradykinin ausgelöste dermale Extravasation in COX-1<sup>-/-</sup> verglichen mit C57BL/6 reduziert (jeweils n = 5, 2,75 ± 0,21- vs. 4,36 ± 0,32-fach PBS, \*\*P < 0,001). (B) Die Labradimil-vermittelte dermale Extravasation konnte im Vergleich zu Vehikel zwar nicht durch Rofecoxib (n = 5, ns) jedoch durch Etoricoxib verringert werden (jeweils n = 5, von 4,27 ± 0,34- auf 2,83 ± 0,21-fach PBS, \*P < 0,01). Dahingegen zeigte sich kein Effekt von Etoricoxib in COX-1<sup>-/-</sup> (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Verglichen mit C57BL/6 konnte auch hier in COX-1<sup>-/-</sup> eine reduzierte Labradimil-vermittelte Extravasation beobachtet werden (jeweils n = 5, 3,00 ± 0,38- vs. 4,27 ± 0,34-fach PBS, #P < 0,05). In keiner der beiden Mauslinien zeigten die COX-2-Inhibitoren einen Effekt auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).



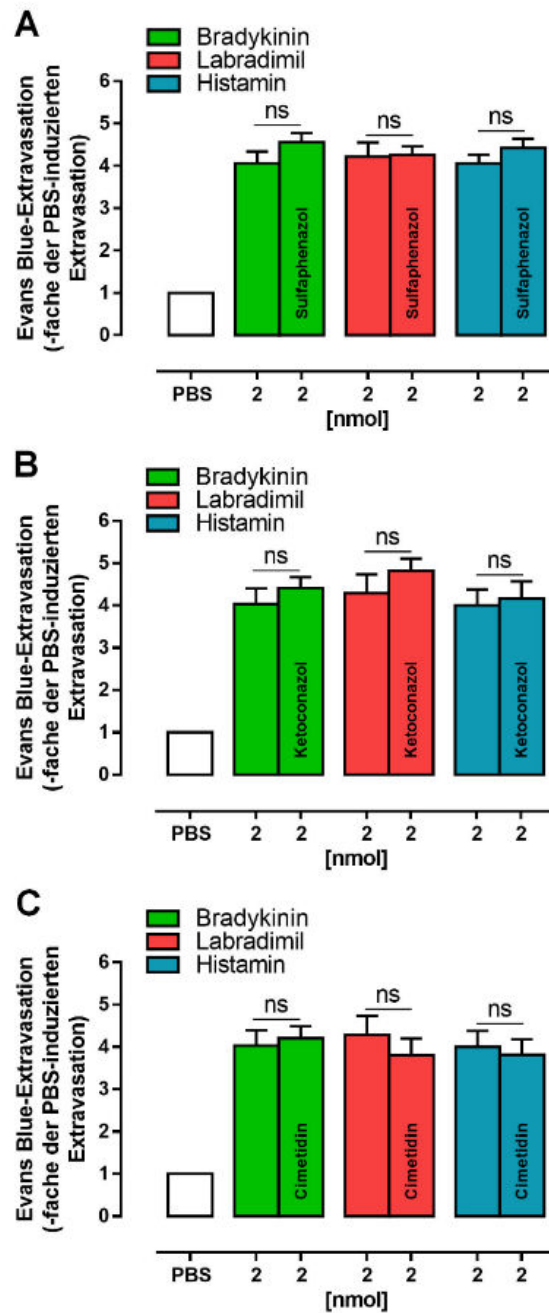
**Abb. 26:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 nach Vorbehandlung mit dem 5-Lipoxygenase (5-LOX)-Inhibitor Zileuton. Zur Untersuchung der Effekte einer 5-LOX-Hemmung auf die Bradykinin-B2-Rezeptor-vermittelte dermale Extravasation wurde nach intraperitonealer Applikation von Zileuton (20 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. Die Substanz zeigte keinen Effekt auf die Bradykinin-, Labradimil oder Histamin-induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

### 3.2.4 Hemmung von Cytochrom P450-Isoenzymen

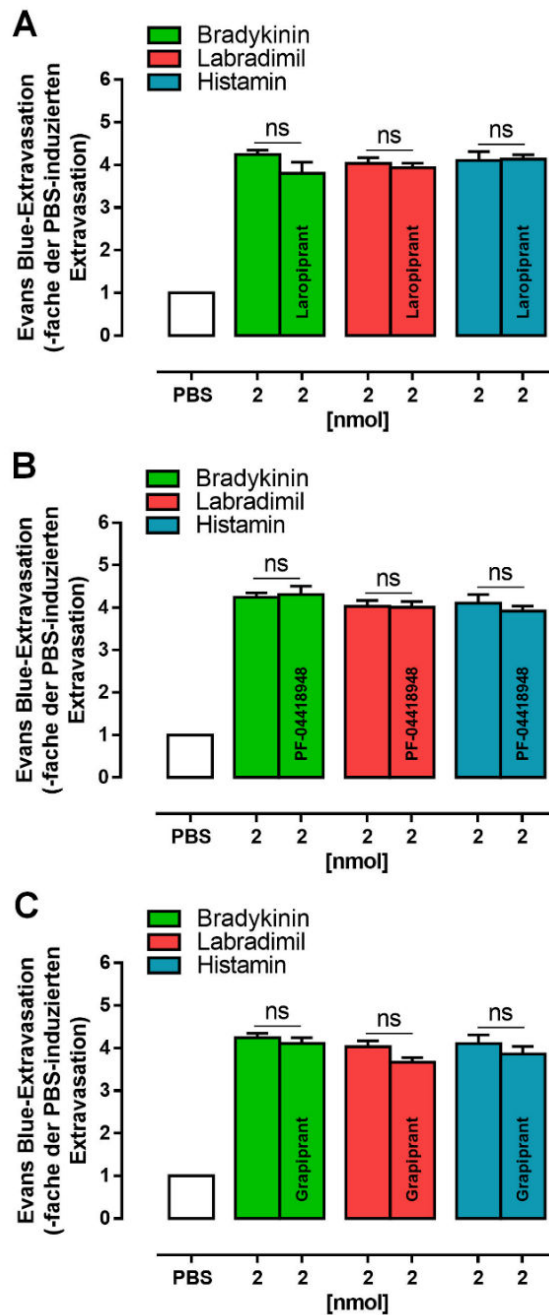
EETs sind Metaboliten der Arachidonsäure und werden durch CYP-Enzyme gebildet. Sie weisen hyperpolarisierende Eigenschaften auf und tragen zur Regulierung der Gefäßfunktion bei, weshalb sie zu den Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs) gezählt werden (195). Der CYP2C8/9-Inhibitor Sulfaphenazol und die unselektiven CYP-Inhibitoren Ketoconazol und Cimetidin sind in der Lage, CYP-Enzyme, die an der Biosynthese von EETs beteiligt sind, zu hemmen (196). Mit ihrer Hilfe sollte ein möglicher Einfluss der EETs auf die B2-vermittelte dermale Extravasation untersucht werden. Vorbehandlungen von C57BL/6 mit Sulfaphenazol (20 mg kg<sup>-1</sup> KG; Abb. 27A), Ketoconazol (50 mg kg<sup>-1</sup> KG; Abb. 27B) oder Cimetidin (120 mg kg<sup>-1</sup> KG; Abb. 27C) zeigten jedoch im Miles Assay im Vergleich zu Vehikel keinen signifikanten Effekt auf die Bradykinin-, Labradimil- oder Histamin-induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 6, ns). Dies lässt die Vermutung zu, dass der CYP-Weg bzw. EETs ebenfalls eine untergeordnete Rolle bei der B2-vermittelten Extravasation spielen.

### 3.2.5 Hemmung vasodilatierend wirksamer Prostaglandin-Rezeptoren

PGs und TX sind überwiegend biologisch aktive Verbindungen mit einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen. Als Substrat für ihre Biosynthese dient Arachidonsäure, welche durch COX und über ein instabiles Zwischenprodukt (PGG<sub>2</sub>) zu PGH<sub>2</sub> umgesetzt wird. Daraufhin setzen entsprechende Synthasen PGH<sub>2</sub> zu den biologisch wirksamen PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> bzw. TXA<sub>2</sub> um (131). Diese können über eine Vielzahl von Rezeptoren ihre Wirksamkeit entfalten, wobei der PGD<sub>2</sub>-Rezeptor DP1, die PGE<sub>2</sub>-Rezeptoren EP2 und EP4 sowie der PGI<sub>2</sub>- bzw. Prostacyclin-Rezeptor IP über vasodilatatorische Eigenschaften verfügen (131), die im Zusammenhang mit der B2-vermittelten dermalen Extravasation stehen könnten. Zum Zweck dieser Untersuchung wurden der DP1-Antagonist Laropiprant, der EP2-Antagonist PF-04418948, der EP4-Antagonist Grapiprant und der IP-Antagonist RO1138452 im Miles Assay verwendet. Die Vorbehandlung von C57BL/6 mit Laropiprant (20 mg kg<sup>-1</sup> KG, Abb. 28A), PF-04418948 (50 mg kg<sup>-1</sup> KG, Abb. 28B) oder Grapiprant (20 mg kg<sup>-1</sup> KG, Abb. 28C) zeigte jedoch verglichen mit der Vorbehandlung mit Vehikel keine signifikante Wirkung auf die dermale Extravasation, die durch Bradykinin, Labradimil bzw. Histamin induziert wurde (jeweils n = 6, ns).



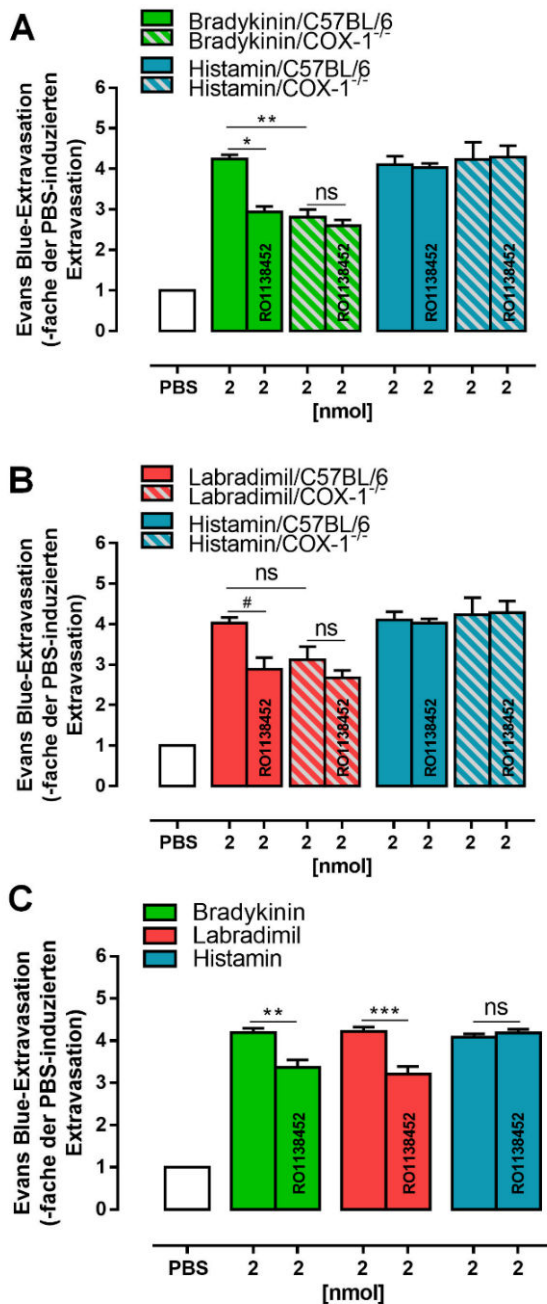
**Abb. 27:** Resultate des Miles Assay in C57BL/6 nach Vorbehandlung mit dem Cytochrom P450 (CYP)2C8/9-Inhibitor Sulfaphenazol oder den unselektiven CYP-Inhibitoren Ketoconazol oder Cimetidin. Zur Untersuchung des Einflusses der Hemmung der Biosynthese von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) auf die Bradykinin-B2-Rezeptor-vermittelte dermale Extravasation wurde nach intraperitonealer Applikation von (A) Sulfaphenazol ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht), (B) Ketoconazol ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder (C) Cimetidin ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. Keiner der CYP-Inhibitoren zeigte einen signifikanten Effekt auf die Bradykinin-, Labradimil oder Histamin-induzierte dermale Extravasation (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).



**Abb. 28:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 nach Vorbehandlung mit dem Prostaglandin D<sub>2</sub>-Rezeptor 1 (DP1)-Antagonisten Laropiprant, dem Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptor 2 (EP2)-Antagonisten PF-04418948 oder dem Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptor 2 (EP4)-Antagonisten Grapiprant. Zur Untersuchung der Wirkung der Hemmung vasodilatatorischer Prostaglandin-Rezeptoren auf die durch Bradykinin-B2-Rezeptor-Aktivierung hervorgerufene dermale Extravasation wurde nach intraperitonealer Applikation von (A) Laropiprant (20 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht), (B) PF-04418948 (50 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder (C) Grapiprant (20 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. Keiner der Prostaglandin-Rezeptorantagonisten zeigte einen signifikanten Effekt auf die Bradykinin-, Labradimil oder Histamin-induzierte dermale Extravasation im Vergleich zu Vehikel (jeweils n = 6, ns). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit RO1138452 (50 mg kg<sup>-1</sup> KG) in C57BL/6 zu einer signifikanten Reduktion der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation im Vergleich zur Vorbehandlung mit Vehikel (jeweils n = 6, von 4,24 ± 0,10- auf 2,94 ± 0,13-fach PBS, \*P < 0,01; Abb. 29A). In COX-1<sup>-/-</sup> zeigte RO1138452 jedoch keinen Effekt (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Zudem konnte in COX-1<sup>-/-</sup> nach Behandlung mit Vehikel im Vergleich zu C57BL/6 wie schon in vorherigen Experimenten (Abb. 24A und Abb. 25A) eine signifikant verringerte Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation nachgewiesen werden (jeweils n = 6, 2,81 ± 0,18- vs. 4,24 ± 0,10-fach PBS, \*\*P < 0,001). Ähnliche Effekte konnten bei der Extravasation nach i. d. Injektion von Labradimil festgestellt werden (Abb. 29B). Die Labradimil-vermittelte Extravasation in der Haut von C57BL/6 konnte durch RO1138452 verglichen mit Vehikel signifikant vermindert werden (jeweils n = 6, von 4,03 ± 0,14- auf 2,89 ± 0,29-fach PBS, #P < 0,05). Dagegen zeigte sich kein signifikanter Effekt von RO1138452 in COX-1<sup>-/-</sup> (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Es konnte zudem nach Vehikelbehandlung keine im Vergleich zu C57BL/6 vermindert dermale Extravasation in COX-1<sup>-/-</sup> festgestellt werden (jeweils n = 6, ns). Die stark lipophile Verbindung RO1138452 zeigte darüber hinaus auch bei dermalen Anwendung in C57BL/6 Wirkung (Abb. 29C). RO1138452 reduzierte sowohl die Bradykinin- (jeweils n = 6, von 4,19 ± 0,10- auf 3,37 ± 0,18-fach PBS, \*\*P < 0,001) als auch die Labradimil-induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 6, von 4,22 ± 0,10- auf 3,21 ± 0,18-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001). Bei keinem der beiden Applikationswege und weder in C57BL/6 (jeweils n = 6, ns) noch in COX-1<sup>-/-</sup> (i. p.: jeweils n = 5, ns, dermal: jeweils n = 6, ns) konnte verglichen mit Vehikel ein Einfluss des IP-Antagonismus auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation festgestellt werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass in Mäusen PGI<sub>2</sub>, das überwiegend durch COX-1 gebildet wird, wesentlich zur B2-vermittelten dermalen Extravasation beiträgt.





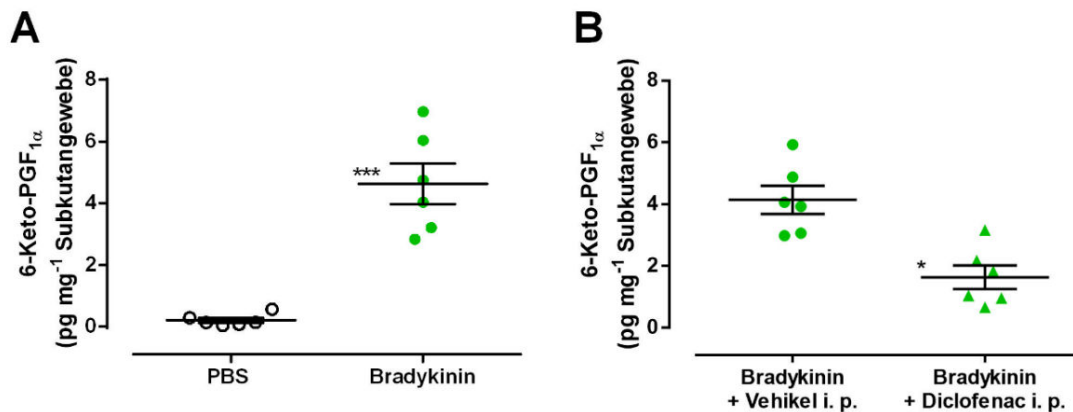
**Abb. 29:** Resultate des Miles Assay in C57BL/6 und Cyclooxygenase (COX)-1-defizienten Mäusen (COX-1<sup>-/-</sup>) nach Vorbehandlung mit dem Prostacyclin-Rezeptor (IP)-Antagonisten RO1138452. Es wurde der Effekt der Hemmung des vasodilatatorisch wirksamen IP-Rezeptors auf die durch den Bradykinin-B2-Rezeptor hervorgerufene dermale Extravasation untersucht. Nach intraperitonealer Applikation (50 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder dermalen Applikation (0,1 mg pro Applikationsstelle) von RO1138452 wurde die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation konnte in C57BL/6 nach Vorbehandlung mit RO1138452 (jeweils n = 6, von 4,24 ± 0,10- auf 2,94 ± 0,13-fach PBS, \*P < 0,01) im Vergleich zu Vehikel signifikant reduziert werden, wohingegen der IP-Antagonist in COX-1<sup>-/-</sup> keinen Effekt zeigte (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Außerdem war die dermale Extravasation nach intradermaler Injektion von Bradykinin in COX-1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu C57BL/6 erniedrigt (jeweils n = 6, 2,81 ± 0,18- vs. 4,24 ± 0,10-fach PBS, \*\*P < 0,001). (B) Ähnliche Effekte konnten bei der Labradimil-induzierten Extravasation festgestellt werden, wo RO1138452 im Vergleich zu Vehikel ebenfalls die dermale Extravasation verminderte (jeweils n = 6, von 4,03 ± 0,14- auf 2,89 ± 0,29-fach PBS, #P < 0,05), jedoch keinen nachweisbaren Effekt in COX-1<sup>-/-</sup> zeigte (jeweils n = 5, ns vs. Vehikel). Dahingegen konnte in COX-1<sup>-/-</sup> verglichen mit C57BL/6 nach Behandlung mit Vehikel keine reduzierte Labradimil-vermittelte Extravasation beobachtet werden (jeweils n = 6, ns). (C) Der Effekt der stark lipophilen Verbindung RO1138452 konnte zusätzlich durch dermale Anwendung in C57BL/6 bestätigt werden, bei der RO1138452 sowohl die Bradykinin- (jeweils n = 6, von 4,19 ± 0,10- auf 3,37 ± 0,18-fach PBS, \*\*P < 0,001) als auch die Labradimil-induzierte dermale Extravasation (jeweils n = 6, von 4,22 ± 0,10- auf 3,21 ± 0,18-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) verminderte. Für keinen der beiden Applikationswege und weder in C57BL/6 (jeweils n = 6,

ns) noch in COX-1<sup>-/-</sup> (intraperitoneal: jeweils n = 5, ns, dermal: jeweils n = 6, ns) konnte verglichen mit Vehikel ein Einfluss des IP-Antagonismus auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

### 3.2.6 Nachweis und Quantifizierung des Prostacyclin-Metaboliten 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub>

PGI<sub>2</sub> ist ein Hauptprodukt des Arachidonsäure-Metabolismus des vaskulären Endothels und wirkt stark thrombozytenaggregationshemmend und vasodilatatorisch (197). Die Ergebnisse des Miles Assay aus Abb. 29 haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen COX-1-generiertem PGI<sub>2</sub> und der B2-vermittelten dermalen Extravasation bestehen könnte. Um diese Hypothese weiter zu bekräftigen, sollte nachgewiesen werden, ob die B2-Aktivierung zu einer anschließenden vermehrten PGI<sub>2</sub>-Produktion führt. Da PGI<sub>2</sub> allerdings nur über eine sehr kurze Halbwertszeit verfügt, war ein direkter Nachweis nicht möglich (185). Alternativ eignet sich der Nachweis von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>, einem stabileren aber inaktiven Hydrolyseprodukt des PGI<sub>2</sub>, als Methode, um PGI<sub>2</sub>-Konzentrationen indirekt zu bestimmen (132). Die Detektion und Quantifizierung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> erfolgte in dorsalem Subkutangewebe von C57BL/6 nach i. d. Vorbehandlung mit Bradykinin sowie in Medien von HDMEC, die zuvor mit Bradykinin inkubiert wurden.

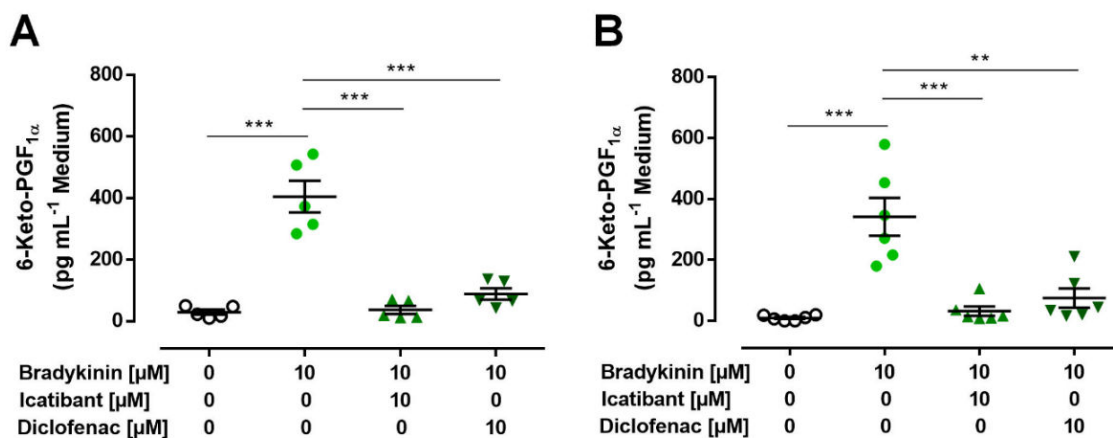
In subkutanem Gewebe von C57BL/6 erfolgte die Detektion und Quantifizierung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> mittels ELISA. Hierzu wurden Versuchsgruppen entweder mit dorsalen i. d. Injektionen von Bradykinin (2 nmol) oder PBS als Kontrolle vorbehandelt. Weitere Versuchsgruppen erhielten 20 min vor i. d. Behandlung mit Bradykinin i. p. Vorbehandlungen mit entweder dem unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac (5 mg kg<sup>-1</sup> KG) oder Vehikellösung als Kontrolle. Nach 30 min wurden die Mäuse euthanasiert und das Subkutangewebe wie beschrieben isoliert und aufgearbeitet. Anschließend wurde 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> aus den Proben extrahiert und mittels ELISA (Kapitel 2.7.3) analysiert. Die i. d. Behandlung mit Bradykinin führte im Vergleich zu PBS zu einer signifikanten Erhöhung der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration im dorsalen Subkutangewebe von C57BL/6 (jeweils n = 6, von 0,21 ± 0,08 auf 4,64 ± 0,66 pg mg<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001; Abb. 30A). Zusätzlich konnte dieser Effekt durch vorherige i. p. Behandlung mit Diclofenac signifikant reduziert werden (jeweils n = 6, von 4,14 ± 0,46 auf 1,64 ± 0,38 pg mg<sup>-1</sup>, \*P < 0,01; Abb. 30B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die B2-Aktivierung durch Bradykinin zu einer COX-abhängigen Bildung von PGI<sub>2</sub> in der Haut von C57BL/6 führt.



**Abb. 30:** Ergebnisse der Quantifizierung von 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-Keto-PGF<sub>1α</sub>) in dorsalem Subkutangewebe von C57BL/6 nach vorhergehender intradermaler Behandlung mit Bradykinin mittels kompetitivem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). (A) Behandlungen mit intradermalen Injektionen von Bradykinin (2 nmol) führten verglichen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) zu einer signifikanten Steigerung der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration in dorsalem Subkutangewebe (jeweils n = 6, von 0,21 ± 0,08 auf 4,64 ± 0,66 pg mg<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). (B) Durch intraperitoneale (i. p.) Vorbehandlung mit dem unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac (5 mg kg<sup>-1</sup> KG) konnte der Effekt von intradermalelem Bradykinin (2 nmol) und damit die Konzentration von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> signifikant reduziert werden (jeweils n = 6, von 4,14 ± 0,46 auf 1,64 ± 0,38 pg mg<sup>-1</sup>, \*P < 0,01). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

Die Detektion und Quantifizierung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in Zellmedien von HDMEC erfolgte sowohl mittels ELISA als auch LC-MS/MS. Durch Letzteres konnte 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> anhand seiner Masse (M = 370,5 g mol<sup>-1</sup>) eindeutig identifiziert werden. Konfluente Zellen wurden wie in Kapitel 2.3 beschrieben entweder mit Bradykinin (10 μM), Bradykinin und dem B2-Antagonisten Icatibant (jeweils 10 μM), Bradykinin und dem unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac (jeweils 10 μM) oder zur Kontrolle mit PBS inkubiert (10 min, 37 °C). Nach Isolierung und Aufarbeitung der Medien konnte 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> extrahiert und der Gehalt mithilfe von ELISA (Kapitel 2.7.3) oder LC-MS/MS (Kapitel 2.7.4) analysiert werden. Die Inkubation von HDMEC mit Bradykinin steigerte die mittels ELISA im Medium messbare Konzentration von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> im Vergleich zur PBS-Kontrolle signifikant (jeweils n = 5, von 29,45 ± 8,12 auf 404,34 ± 51,55 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001; Abb. 31A). Dahingegen führte die gleichzeitige Inkubation mit Bradykinin und Icatibant zu einer nahezu vollständigen Hemmung dieses Effekts (jeweils n = 5, von 404,34 ± 51,55 auf 36,32 ± 13,32 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). Die unselektive COX-Inhibition durch Diclofenac konnte die 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration ebenfalls deutlich reduzieren (jeweils n = 5, von 404,34 ± 51,55 auf 88,53 ± 18,72 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). Diese Ergebnisse konnten bei der LC-MS/MS-Analyse bestätigt werden (Abb. 31B). Inkubation mit Bradykinin allein führte verglichen mit PBS zu einer deutlichen Erhöhung der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration (jeweils n = 6, von 9,73 ± 3,66 auf 341,61 ± 62,16 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). Der Effekt wurde auch hier durch

Icatibant (jeweils n = 6, von 341,61 ± 62,16 auf 32,13 ± 15,46 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001) bzw. Diclofenac (n = 6, auf 75,30 ± 31,55 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*P < 0,001) nahezu komplett inhibiert. Die Daten implizieren, dass die B2-Aktivierung sowohl in der Haut von C57BL/6 als auch in Primärkulturen humaner, dermaler, mikrovaskulärer Endothelzellen eine COX-abhängige PGI<sub>2</sub>-Produktion auslöst.



**Abb. 31:** Ergebnisse der Quantifizierung von 6-Keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-Keto-PGF<sub>1α</sub>) mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)- bzw. Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) in Medien von humanen, dermalen, mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC). Die Zellen wurden zuvor entweder mit Bradykinin, Bradykinin und dem B2-Antagonisten Icatibant, Bradykinin in Kombination mit dem unselektiven COX-Inhibitor Diclofenac oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Kontrolle vorbehandelt. (A) Im ELISA steigerte Bradykinin (10 μM) die im HDMEC-Medium messbare Konzentration von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> im Vergleich zur PBS-Kontrolle signifikant (jeweils n = 5, von 29,45 ± 8,12 auf 404,34 ± 51,55 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Bradykinin und Icatibant (jeweils 10 μM) führte hingegen zu einer nahezu vollständigen Hemmung dieses Effekts (jeweils n = 5, von 404,34 ± 51,55 auf 36,32 ± 13,32 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). Gleichzeitig konnte Diclofenac (10 μM) die 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration ebenfalls deutlich reduzieren (jeweils n = 5, von 404,34 ± 51,55 auf 88,53 ± 18,72 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). (B) Die Quantifizierung mittels LC-MS/MS zeigte nach Inkubation von HDMEC mit Bradykinin (10 μM) allein im Vergleich zu PBS ebenfalls einen deutlichen Anstieg der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration (jeweils n = 6, von 9,73 ± 3,66 auf 341,61 ± 62,16 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001). Der Effekt konnte auch hier durch gleichzeitige Inkubation mit Icatibant (10 μM, jeweils n = 6, von 341,61 ± 62,16 auf 32,13 ± 15,46 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*\*P < 0,0001) oder Diclofenac (10 μM, n = 6, auf 75,30 ± 31,55 pg mL<sup>-1</sup>, \*\*P < 0,001) fast vollständig gehemmt werden. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung 31B bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

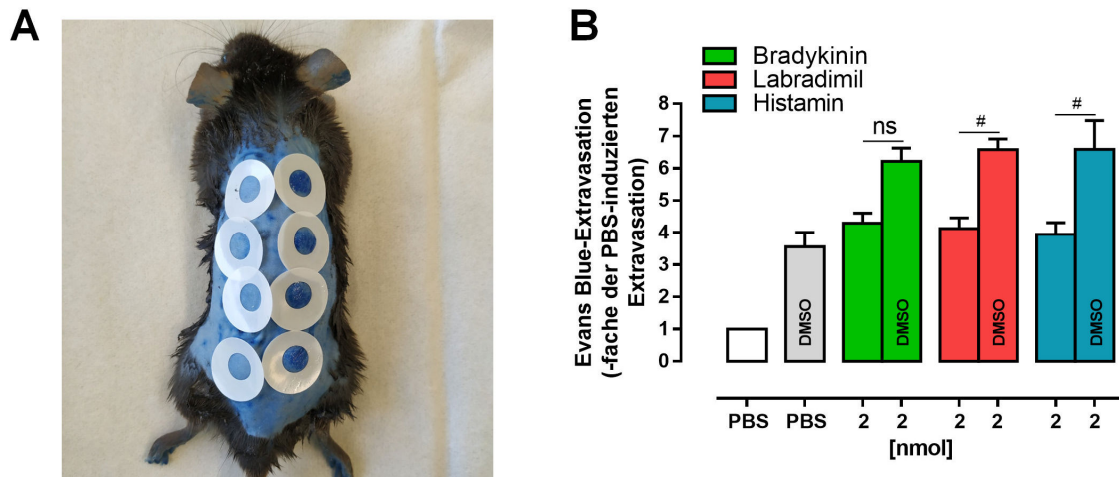
### 3.2.7 Inhibition der cytosolischen Phospholipase A<sub>2α</sub>

Arachidonsäure ist der Precursor für die Biosynthese von CysLTs, EETs und PGs. Das Enzym cPLA<sub>2α</sub> katalysiert die Hydrolyse von Arachidonsäure aus Phospholipidmembranen und stellt diese damit für die weitere Umsetzung durch 5-LOX, COX oder CYP-Enzyme bereit (198). Selektive cPLA<sub>2α</sub>-Inhibitoren wie SB296 (181) können das Enzym hemmen und einen Mangel an Arachidonsäure bzw. den resultierenden Produkten hervorrufen.

Gleichermaßen können Glucocorticoide, neben diverser anderer Mechanismen, die Expression des antiinflammatorischen Proteins Annexin A1 induzieren, welches als physiologischer cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor fungiert (133). Durch Verwendung von SB296 und des Glucocorticoids Dexamethason sollte im Miles Assay der Einfluss der cPLA<sub>2</sub>α-Inhibition bzw. eines dadurch hervorgerufenen Mangels an Arachidonsäure und ihrer Metabolite auf die B2-vermittelte dermale Extravasation untersucht werden.

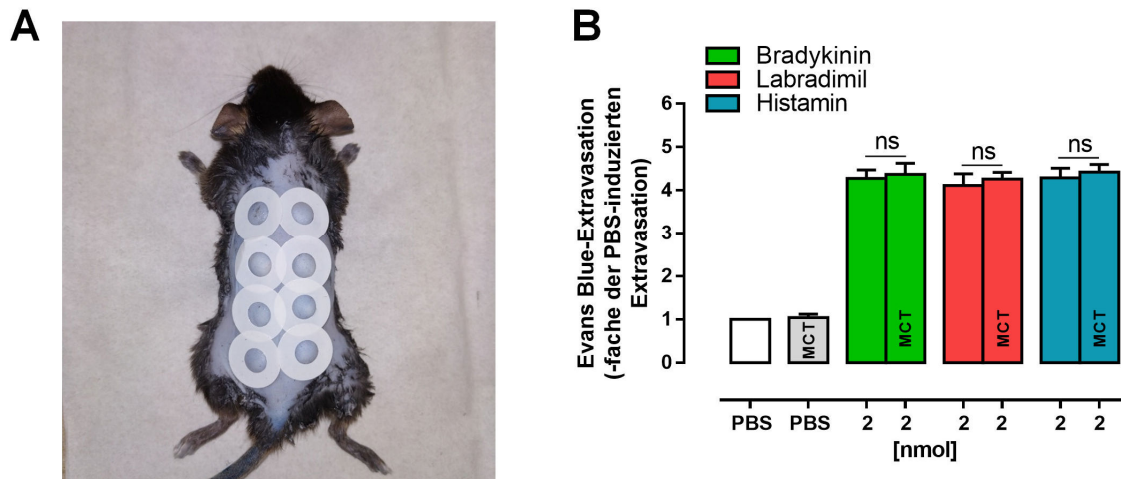
**Bestimmung eines geeigneten Vehikels zur dermalen Applikation** Für den cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor SB296 wurde ein neuer Versuchsaufbau des Miles Assay entwickelt. Aufgrund der hohen Lipophilie und geringen Bioverfügbarkeit von SB296 (182) wurde die Substanz lokal dermal auf die vorgesehenen i. d. Applikationsstellen aufgetragen. Zu diesem Zweck musste SB296 in einer geeigneten Trägerlösung (Vehikel) gelöst werden, die selbst keinen Einfluss auf die dermale Extravasation ausübt.

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein aprotisches Lösungsmittel, das in der Lage ist, die Permeabilität von Lipidmembranen zu erhöhen. Daher findet es auch als Permeationsbeschleuniger für topische oder transdermale Arzneiformen Anwendung (199). Bei der Verwendung im Miles Assay in C57BL/6 konnte jedoch bereits nach kurzer Zeit im Vergleich zu keiner Vorbehandlung eine deutlich sichtbare, gesteigerte Blaufärbung an den vorgesehenen, mit reinem DMSO (5 µL, 20 min) behandelten i. d. Applikationsstellen festgestellt werden (Abb. 32A). Die dermale Extravasation wurde anschließend in Form der Extravasation des Evans Blue quantifiziert (Abb. 32B). Bradykinin zeigte eine nicht-signifikante Erhöhung der induzierten dermalen Extravasation nach dermalen DMSO-Vorbehandlung (jeweils n = 3, von 4,29 ± 0,32- auf 6,21 ± 0,41-fach PBS, ns), wohingegen diese für Labradimil (jeweils n = 3, von 4,12 ± 0,34- auf 6,58 ± 0,33-fach PBS, #P < 0,05) und Histamin (jeweils n = 3, von 3,95 ± 0,36- auf 6,59 ± 0,89-fach PBS, #P < 0,05) signifikant erhöht war. Demnach erwies sich DMSO im Miles Assay als nicht geeignet für die dermale Applikation von SB296.



**Abb. 32:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 nach lokaler dermaler Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Zur Untersuchung der Eignung von DMSO als Trägerlösung (Vehikel) wurde nach dermaler Applikation von DMSO (5  $\mu$ L, 20 min) auf die vorgesehenen Applikationsstellen die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Bereits nach kurzer Zeit konnte an den vorgesehenen, mit DMSO vorbehandelten Applikationsstellen (rechts) eine stärkere Blaufärbung festgestellt werden. (B) Die Vorbehandlung mit DMSO führte zu einer tendenziell gesteigerten dermalen Extravasation nach intradermaler Applikation von Bradykinin (jeweils n = 3, von  $4,29 \pm 0,32$ - auf  $6,21 \pm 0,41$ -fach PBS, ns), wohingegen die dermale Extravasation nach Induktion mittels Labradimil (jeweils n = 3, von  $4,12 \pm 0,34$ - auf  $6,58 \pm 0,33$ -fach PBS, #P < 0,05) und Histamin (jeweils n = 3, von  $3,95 \pm 0,36$ - auf  $6,59 \pm 0,89$ -fach PBS, #P < 0,05) signifikant erhöht war. Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey.

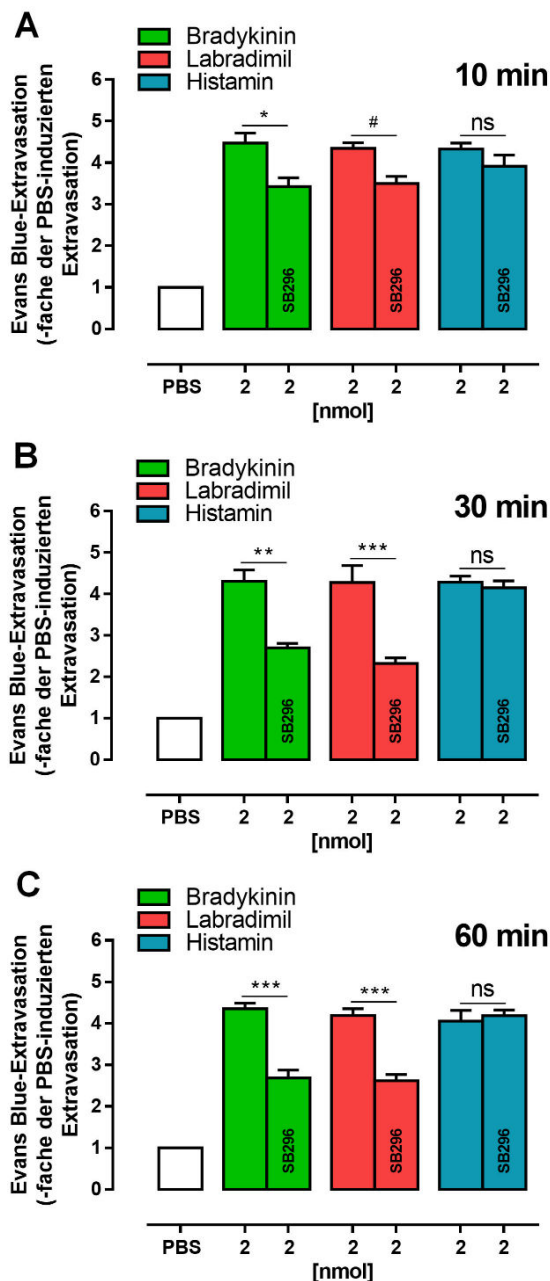
Als weiteres potentiell Vehikel für die dermale Applikation von SB296 wurde der Einfluss von mittelkettigen Triglyceriden (Medium-chain Triglycerides, MCT, Miglyol® 812, Caesar & Loretz, Hilden) auf die dermale Extravasation untersucht. Dabei handelt es sich um eine gängige Rezeptursubstanz aus der Apothekenpraxis mit guten Lösungseigenschaften für lipophile Substanzen (200). Anders als bei DMSO zeigten sich nach Auftragung von MCT auf die vorgesehenen i. d. Applikationsstellen keine Auffälligkeiten (Abb. 33A). Die anschließende Quantifizierung zeigte keinen Einfluss von MCT auf die durch Bradykinin, Labradimil oder Histamin induzierte dermale Extravasation im Vergleich zu keiner Vorbehandlung (jeweils n = 6, ns). Aufgrund dieser Ergebnisse und der guten Löslichkeit wurde im weiteren Verlauf mit MCT als Vehikel für SB296 gearbeitet.



**Abb. 33:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 nach lokaler dermaler Vorbehandlung mit mittelkettigen Triglyceriden (MCT). Zur Untersuchung der Eignung von MCT als Trägerlösung (Vehikel) wurde nach dermaler Applikation von MCT (5  $\mu$ L, 20 min) auf die vorgesehenen Applikationsstellen die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Die dermale Applikation von MCT (rechts) zeigte im Vergleich zu keiner Vorbehandlung (links) keine sichtbaren Unterschiede der Evans Blue-Verteilung in der Haut. (B) Nach Quantifizierung des Evans Blue konnte kein Einfluss von MCT auf die durch Bradykinin, Labradimil oder Histamin induzierte dermale Extravasation in Vergleich zu keiner dermalen Vorbehandlung festgestellt werden (jeweils  $n = 6$ , ns). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

**Direkte cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -Inhibition durch SB296** Der cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -Inhibitor SB296 wurde für die dermale Vorbehandlung in MCT gelöst (100  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup>). Durch die lokal beschränkte Anwendung konnte in jeder Maus der Einfluss des Wirkstoffs direkt gegen eine Kontrolle mit reinem Vehikel untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Applikationsstellen wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben auf einer Seite mit SB296 in MCT und auf der anderen Seite mit reinem MCT vorbehandelt. Zur Untersuchung einer möglichen Zeit-Wirkungs-Beziehung wurde die dermale Extravasation 10 min, 30 min oder 60 min nach Auftragung von jeweils 0,5 mg SB296 (jeweils in 5  $\mu$ L MCT) mittels i. d. Injektionen von Bradykinin, Labradimil und Histamin in C57BL/6 induziert. Eine Einwirkzeit von 10 min führte bereits im Vergleich zu MCT zu einer signifikanten Reduktion der Bradykinin- (jeweils  $n = 6$ , von  $4,47 \pm 0,24$ - auf  $3,43 \pm 0,21$ -fach PBS, \* $P < 0,01$ ) und Labradimil-induzierten Extravasation (jeweils  $n = 6$ , von  $4,35 \pm 0,13$ - auf  $3,50 \pm 0,17$ -fach PBS, # $P < 0,05$ ; Abb. 34A). Dieser Effekt konnte bei beiden B2-Agonisten nach 30 min noch gesteigert werden (Bradykinin: jeweils  $n = 6$ , von  $4,31 \pm 0,27$ - auf  $2,70 \pm 0,11$ -fach PBS, \*\* $P < 0,001$ ; Labradimil: jeweils  $n = 6$ , von  $4,28 \pm 0,42$ - auf  $2,32 \pm 0,14$ -fach PBS, \*\*\* $P < 0,0001$ ; Abb. 34B). Nach 60 min konnte keine weitere Reduktion der dermalen Extravasation nach Induktion durch Bradykinin (jeweils  $n = 6$ , von  $4,35 \pm 0,14$ - auf  $2,69 \pm 0,19$ -fach PBS, \*\*\* $P < 0,001$ ) oder Labradimil (jeweils

n = 6, von  $4,19 \pm 0,16$ - auf  $2,62 \pm 0,15$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ; Abb. 34C) festgestellt werden. Bei keinem der Experimente wurde ein Einfluss von SB296 auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation festgestellt (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel).



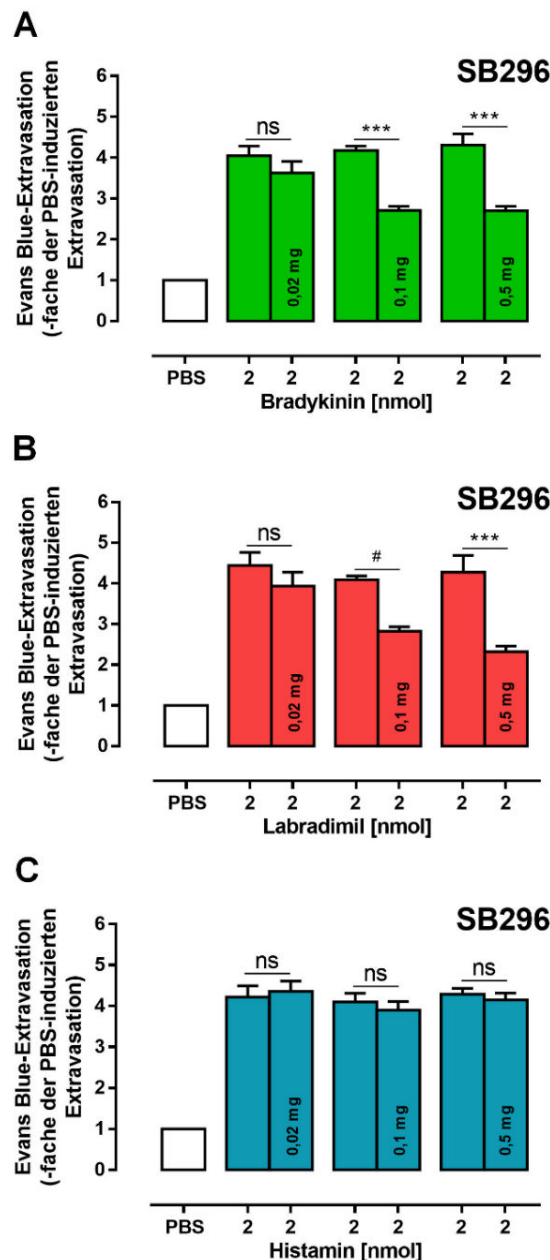
**Abb. 34:** Resultate des Miles Assay in C57BL/6 zur Untersuchung einer Zeit-Wirkungs-Beziehung des dermal verabreichten cytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>α (cPLA<sub>2</sub>α)-Inhibitors SB296 auf die nach 10, 30 oder 60 min induzierte dermale Extravasation. Nach dermalen Applikation von SB296 (0,5 mg in 5 µL Vehikel pro Applikationsstelle) bzw. Vehikel (5 µL) wurde die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Bereits nach 10-minütiger Einwirkzeit ließ sich im Vergleich zur Vehikelkontrolle eine signifikante Reduktion der Bradykinin- (jeweils n = 6, von  $4,47 \pm 0,24$ - auf  $3,43 \pm 0,21$ -fach PBS,  $*P < 0,01$ ) und Labradimil-vermittelten dermalen Extravasation (jeweils n = 6, von  $4,35 \pm 0,13$ - auf  $3,50 \pm 0,17$ -fach PBS,  $\#P < 0,05$ ) feststellen. (B) Der Effekt von SB296 war nach 30 min noch stärker (Bradykinin: jeweils n = 6, von  $4,31 \pm 0,27$ - auf  $2,70 \pm 0,11$ -fach PBS,  $***P < 0,001$ ; Labradimil: jeweils n = 6, von  $4,28 \pm 0,42$ - auf  $2,32 \pm 0,14$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ). (C) Eine 60-minütige Einwirkzeit von SB296 führte weder bei Bradykinin (jeweils n = 6, von  $4,35 \pm 0,14$ - auf  $2,69 \pm 0,19$ -fach PBS,  $***P < 0,001$ ) noch bei Labradimil (jeweils n = 6, von  $4,19 \pm 0,16$ - auf  $2,62 \pm 0,15$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) zu einer weiteren Reduktion der dermalen Extravasation. Es konnte bei keiner Wirkdauer ein Einfluss von SB296 auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation nachgewiesen werden (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

Nach Ermittlung des maximalen Effekts von dermal verabreichtem SB296 (0,5 mg) nach 30 min Einwirkdauer sollte eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht werden. Die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation konnte durch eine Vorbehandlung mit 0,02 mg SB296 nicht signifikant reduziert werden (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel; Abb. 35A).



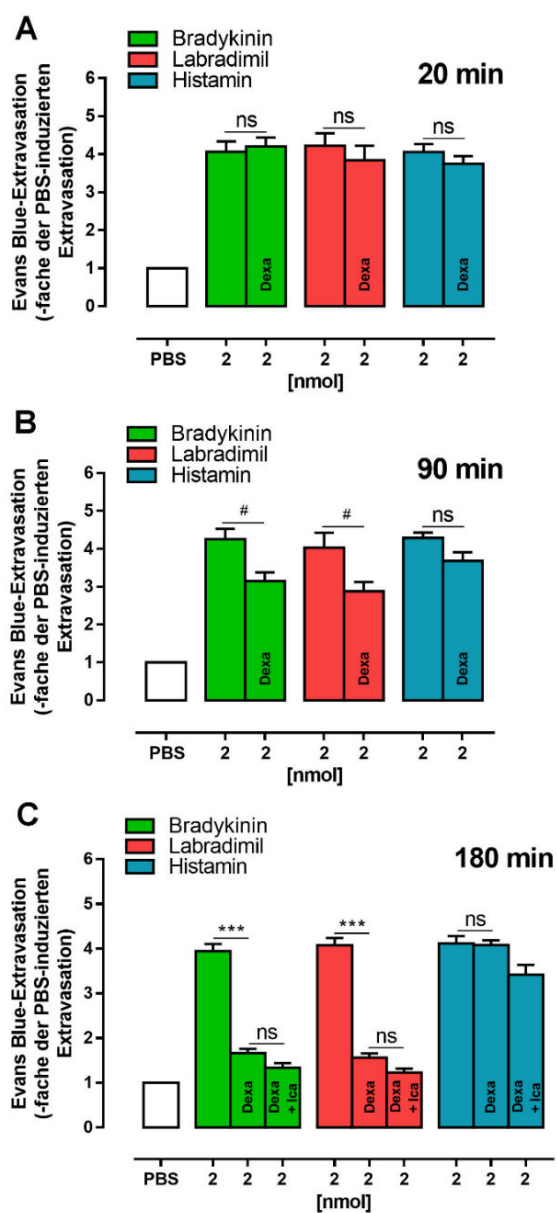
Dahingegen konnten bereits 0,1 mg SB296 (jeweils  $n = 6$ , von  $4,17 \pm 0,11$ - auf  $2,71 \pm 0,10$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ) im Vergleich zu Vehikel eine ähnlich starke Reduktion der Extravasation hervorrufen wie 0,5 mg (jeweils  $n = 6$ , von  $4,31 \pm 0,27$ - auf  $2,70 \pm 0,11$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ). Die Labradimil-vermittelte dermale Extravasation konnte von 0,02 mg SB296 ebenfalls nicht signifikant reduziert werden (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel; Abb. 35B). Allerdings führten 0,1 mg SB296 (jeweils  $n = 6$ , von  $4,09 \pm 0,10$ - auf  $2,83 \pm 0,11$ -fach PBS,  $\#P < 0,05$ ) zu einer geringeren Reduktion der Extravasation als 0,5 mg (jeweils  $n = 6$ , von  $4,28 \pm 0,42$ - auf  $2,32 \pm 0,14$ -fach PBS,  $***P < 0,0001$ ). Es konnte für keine SB296-Dosis ein Effekt auf die dermale Extravasation nach i. d. Histamin-Applikation festgestellt werden (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten darauf hin, dass Arachidonsäure ein Schlüsselmetabolit bei der B2-vermittelten dermalen Extravasation darstellt.

**Indirekte cPLA<sub>2</sub>α-Inhibition durch Dexamethason** Glucocorticoide wirken entzündungshemmend und immunsuppressiv und bilden eine wichtige Grundlage für die lokale oder systemische Behandlung zahlreicher Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen. Dexamethason ist ein synthetisches Glucocorticoid, das zur systemischen Therapie verwendet wird und über eine 30-fach höhere Wirkpotenz als natürliches Cortisol bzw. Hydrocortison verfügt (201). Neben einer Vielzahl anderer Mechanismen, kann es die Expression des antiinflammatorischen Proteins Annexin A1 induzieren, welches als physiologischer cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor agiert und damit Einfluss auf den Arachidonsäure-Stoffwechsel nehmen kann (133). Die Anwendung von Dexamethason im Miles Assay sollte neue Erkenntnisse über mögliche direkte aber auch indirekte bzw. genomische Effekte von Glucocorticoiden auf die B2-vermittelte dermale Extravasation bringen. Daher wurde eine Zeit-Wirkungs-Beziehung von i. p. verabreichtem Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG}$ ) untersucht, bei der die dermale Extravasation 20, 90 oder 180 min nach Applikation i. d. induziert wurde. Eine Wirkdauer von 20 min zeigte keine signifikanten Effekte auf die durch jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil oder Histamin induzierte dermale Extravasation (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel; Abb. 36A). Dagegen konnte nach 90 min im Vergleich zu Vehikel eine Reduktion der sowohl Bradykinin- (jeweils  $n = 6$ , von  $4,26 \pm 0,27$ - auf  $3,15 \pm 0,23$ -fach PBS,  $\#P < 0,05$ ) als auch Labradimil-vermittelten Extravasation (jeweils  $n = 6$ , von  $4,03 \pm 0,40$ - auf  $2,89 \pm 0,24$ -fach PBS,  $\#P < 0,05$ ) beobachtet werden (Abb. 36B). Nach 180 min konnte dieser Effekt noch deutlich gesteigert werden (Abb. 36C). Die Bradykinin-induzierte Extravasation in der Haut sank verglichen zur Vehikelkontrolle vom  $3,94 \pm 0,16$ -fachen auf das  $1,66 \pm 0,10$ -fache der PBS-induzierten Extravasation (jeweils  $n = 6$ ,  $***P < 0,0001$ ). Dieser Effekt bestätigte sich auch nach Induktion mittels i. d. Labradimil (jeweils  $n = 6$ , von



**Abb. 35:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 zur Untersuchung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von 0,02, 0,1 oder 0,5 mg dermal verabreichtem cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)-Inhibitor SB296 auf die nach 30 min induzierte dermale Extravasation. Nach dermalen Applikation von 0,02, 0,1 oder 0,5 mg SB296 pro Applikationsstelle (in 5 µL Vehikel) bzw. Vehikel (5 µL) wurde die Extravasation nach 30 min durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Durch Vorbehandlung mit 0,02 mg SB296 konnte die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation nicht signifikant reduziert werden (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Dagegen führten bereits 0,1 mg SB296 (jeweils n = 6, von 4,17 ± 0,11- auf 2,71 ± 0,10-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) im Vergleich zu Vehikel zu einer vergleichbaren Reduktion der Extravasation wie 0,5 mg (jeweils n = 6, von 4,31 ± 0,27- auf 2,70 ± 0,11-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001). (B) Auch die Labradimil-vermittelte dermale Extravasation konnte von 0,02 mg SB296 nicht signifikant reduziert werden (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Allerdings konnte hier durch 0,1 mg SB296 (jeweils n = 6, von 4,09 ± 0,10- auf 2,83 ± 0,11-fach PBS, #P < 0,05) nur ein geringerer Effekt auf die Labradimil-induzierte dermale Extravasation festgestellt werden als durch 0,5 mg (jeweils n = 6, von 4,28 ± 0,42- auf 2,32 ± 0,14-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001). Keine der angewendeten SB296-Dosen hatte ein Effekt auf die Histamin-vermittelte dermale Extravasation (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey. Abbildung bereits publiziert in Krybus *et al.*, 2022 (100).

4,08 ± 0,16- auf 1,56 ± 0,10-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001). Die dermale Extravasation konnte weder für Bradykinin noch für Labradimil durch gleichzeitige i. v. Applikation des B2-Antagonisten Icatibant weiter reduziert werden (jeweils n = 6, ns vs. Dexamethason). Dexamethason zeigte auch nach 90 bzw. 180 min noch immer keinen Einfluss auf die Histamin-induzierte Extravasation (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Die Daten zeigen, dass bei der Wirkung von Dexamethason womöglich von einem genomischen Effekt auf die B2-vermittelte dermale Extravasation ausgegangen werden kann, der eine vergleichbar effektive Hemmung wie der B2-Antagonist Icatibant hervorruft.



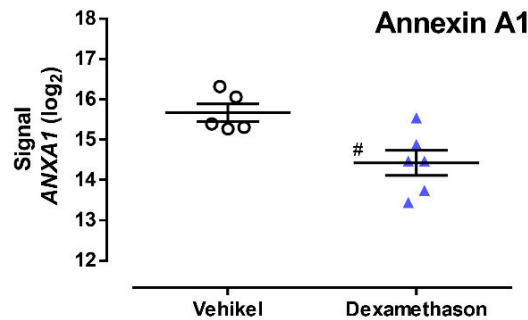
**Abb. 36:** Ergebnisse des Miles Assay in C57BL/6 zur Untersuchung einer Zeit-Wirkungs-Beziehung des Glucocorticoids Dexamethason auf die nach 20, 90 oder 180 min induzierte dermale Extravasation. Nach intraperitonealer Applikation von Dexamethason (Dexa, 100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) wurde die Extravasation durch dorsale intradermale Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, Labradimil und Histamin im Vergleich zu phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) induziert. (A) Nach 20-minütiger Einwirkzeit zeigte sich keine signifikante Reduktion der Bradykinin- und Labradimil-vermittelten dermalen Extravasation (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). (B) Nach 90 min konnte letztendlich eine signifikante Verminderung der Extravasation bei sowohl Bradykinin (jeweils n = 6, von 4,26 ± 0,27- auf 3,15 ± 0,23-fach PBS, #P < 0,05) als auch Labradimil (jeweils n = 6, von 4,03 ± 0,40- auf 2,89 ± 0,24-fach PBS, #P < 0,05) festgestellt werden. (C) Der Effekt von Dexamethason war nach 180 min Einwirkzeit noch stärker ausgeprägt. Sowohl die durch Bradykinin (jeweils n = 6, von 3,94 ± 0,16- auf 1,66 ± 0,10-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) als auch Labradimil hervorgerufene dermale Extravasation (jeweils n = 6, von 4,08 ± 0,16- auf 1,56 ± 0,10-fach PBS, \*\*\*P < 0,0001) wurde im Vergleich zu Vehikel deutlich reduziert. Dieser Effekt ließ sich durch gleichzeitige intravenöse Gabe von Icatibant (Ica, 2 nmol) nicht weiter verstärken (jeweils n = 6, ns vs. Dexamethason). Es konnte bei keiner Wirkdauer ein Einfluss von Dexamethason auf die Histamin-induzierte dermale Extravasation nachgewiesen werden (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Die statistische Auswertung erfolgte durch einfache ANOVA und anschließenden multiplen Vergleichstest nach Tukey.

### 3.3 Genexpressionsanalysen

Glucocorticoide verfügen über eine hohe Lipophilie und Membrangängigkeit, die es ihnen ermöglicht, ihre Wirkung über intrazelluläre (nukleäre) Glucocorticoidrezeptoren zu entfalten. In Form eines homodimeren Substrat-Rezeptor-Komplexes können sie als Transkriptionsfaktoren fungieren und so Einfluss auf die Expression von Genen nehmen (161). Daten aus dem Miles Assay (Kapitel 3.2.7) deuteten ebenfalls darauf hin, dass die Wirkung von Dexamethason auf Basis genomischer Effekte zustande gekommen sein könnte. Ein plausibler und in der Literatur bereits beschriebener Mechanismus könnte eine Überexpression von Annexin A1, einem physiologischen cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor, sein (133). Darüber hinaus könnten jedoch auch weitere Gene, die unter anderem für Proteine wie PG-Synthasen, Rezeptoren oder Strukturproteine kodieren, eine Rolle bei der B2-vermittelten dermalen Extravasation spielen und durch Dexamethason beeinflusst werden. Die genomischen Effekte von Dexamethason sollten mithilfe von Genexpressionsanalysen (DNA-Microarray) untersucht und weitere mögliche Mechanismen der Wirkung der Glucocorticoide auf die B2-induzierte dermale Extravasation aufgedeckt werden. Zu diesem Zweck wurde wie in Kapitel 2.8.1 beschrieben dorsales, subkutanes Gewebe von C57BL/6 180 min nach i. p. Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> KG) isoliert und die RNA aufgereinigt. Anschließend wurde die mRNA-Expression mithilfe der Microarray-Technologie (Kapitel 2.8.3) analysiert. Zur besseren Übersicht werden im Folgenden wie bereits beschrieben die quantifizierten Signale der Gene als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) angegeben.

#### 3.3.1 Regulation der cytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub>α

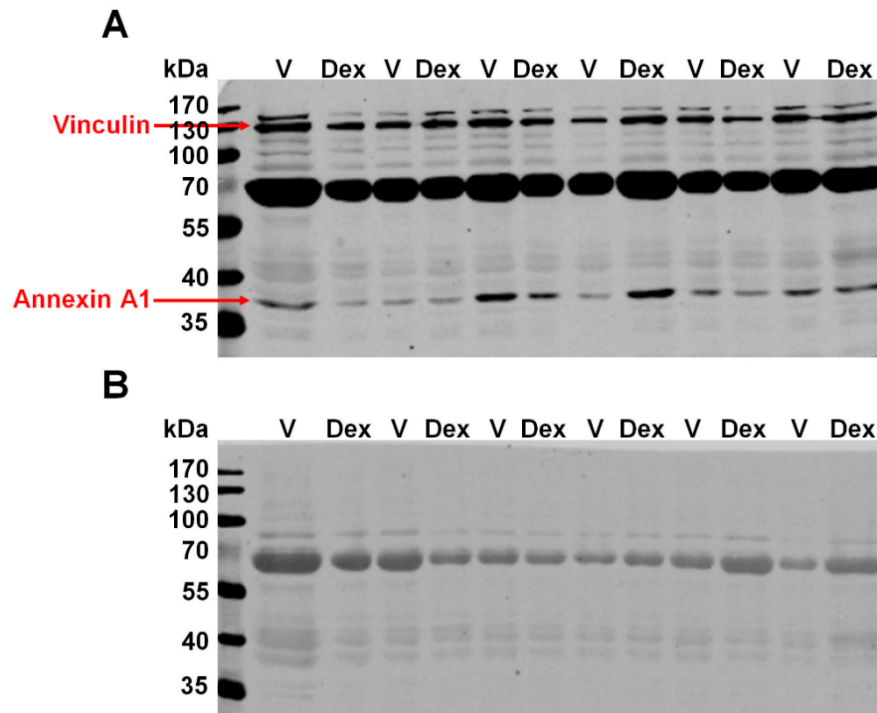
**Annexin A1** Die Hochregulation der Expression von Annexin A1 und die damit verbundene Hemmung der cPLA<sub>2</sub>α ist ein bekannter Mechanismus, der den Effekt von Glucocorticoiden auf den Arachidonsäure- bzw. PG-Stoffwechsel erklären kann (133). In Subkutangewebe von C57BL/6 konnte nach i. p. Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> KG) und 180-minütiger Wirkdauer mittels Microarray jedoch keine erhöhte Genexpression des *ANXA1*-Gens festgestellt werden (Abb. 37). Es zeigte sich sogar der gegenteilige Effekt, sodass die Expression von Annexin A1 signifikant reduziert war (Vehikel: n = 5, 15,67 ± 0,22 vs. Dexamethason: n = 6, 14,42 ± 0,31, #P < 0,05).



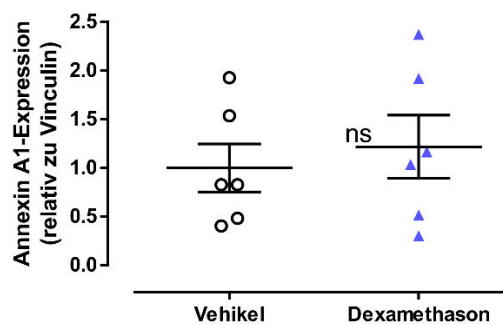
**Abb. 37:** Ergebnisse der Microarray-Expressionsanalysen des Gens *ANXA1* (Annexin A1) in Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason oder Vehikel. Nach intraperitonealer Behandlung von C57BL/6 mit Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder Vehikel und einer Wirkdauer von 180 min wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus dem dorsalen Subkutangewebe isoliert und mittels Microarray analysiert. Nach Vorbehandlung mit Dexamethason wurde eine signifikante Verminderung der Genexpression von Annexin A1 beobachtet (Vehikel:  $n = 5$ ,  $15,67 \pm 0,22$  vs. Dexamethason:  $n = 6$ ,  $14,42 \pm 0,31$ ,  $\#P < 0,05$ ). Die Angabe der Signalstärke erfolgte als binärer Logarithmus ( $\log_2$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs.

Um die Expression von Annexin A1 auch auf Proteinebene zu quantifizieren, wurden Western Blots mit denselben Subkutangewebeproben durchgeführt. In beiden Behandlungsgruppen ließen sich Annexin A1 (37 kDa) und das zur relativen Quantifizierung verwendete Housekeeping-Protein Vinculin (124 kDa) mit den in Tab. 4 beschriebenen Antikörpern detektieren (Abb. 38A). Die Spezifität des Anti-Annexin A1- und des Anti-Vinculin-Antikörpers sowie der ermittelten Signale konnte durch eine Kontrolle ohne Zugabe dieser Antikörper nachgewiesen werden, bei der keine Signale für die entsprechenden Proteinmassen mehr detektiert werden konnten (Abb. 38B).

Anschließend konnte für beide Behandlungsgruppen die Annexin A1-Expression in Relation zur Vinculin-Expression quantifiziert werden (Abb. 39). Die Expression von Annexin A1 konnte durch Vorbehandlung mit Dexamethason im Vergleich zu Vehikel nicht signifikant erhöht werden (jeweils  $n = 6$ , von  $1,00 \pm 0,25$  auf  $1,22 \pm 0,33$ , ns).



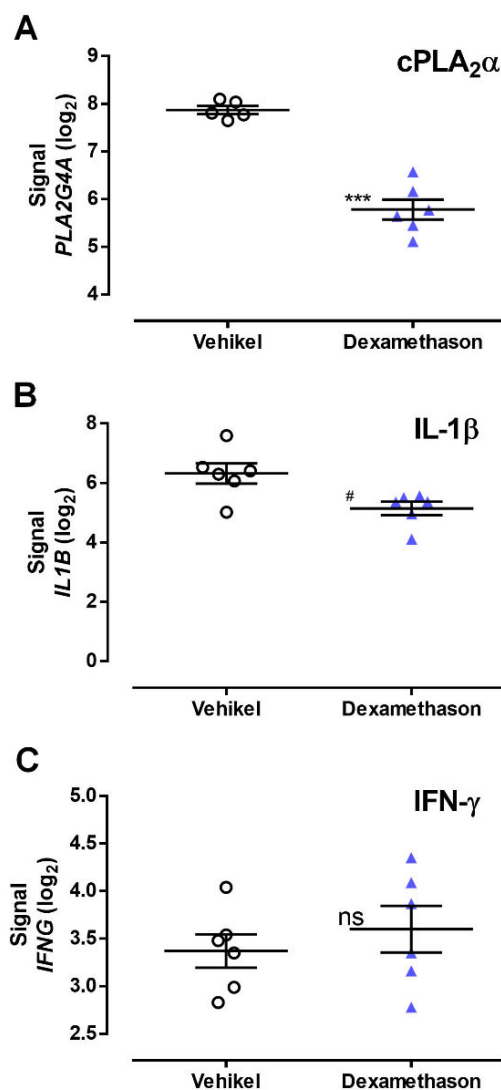
**Abb. 38:** Fluoreszenzaufnahmen der Immundetektion von Annexin A1 (37 kDa) und dem Housekeeping-Protein Vinculin (124 kDa) nach Western Blot der aufgetrennten Proteinfraction aus Subkutangewebe von C57BL/6. C57BL/6 wurden im Vorfeld intraperitoneal mit Dexamethason (Dex, 100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel (V) behandelt und das dorsale Subkutangewebe nach 180 min isoliert. (A) In Homogenaten beider Behandlungsgruppen ließen sich Annexin A1 (37 kDa) und Vinculin (124 kDa) detektieren. (B) Zur Kontrolle der Spezifität der Anti-Annexin A1- und Anti-Vinculin-Antikörper für die detektierten Proteine wurden die gleichen Blots ohne Zugabe dieser Antikörper durchgeführt, woraufhin keine Signale für die entsprechenden Proteinmassen mehr detektiert werden konnten.



**Abb. 39:** Quantifizierung der Signale der Immundetektion von Annexin A1 (Abb. 38) in Relation zu Vinculin aus Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason oder Vehikel und 180-minütiger Einwirkzeit. Die intraperitoneale Vorbehandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) konnte die Proteinexpression von Annexin A1 im Vergleich zu Vehikel nicht signifikant erhöhen (jeweils n = 6, von 1,00 ± 0,25 auf 1,22 ± 0,33, ns). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test.

**Cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>α und Cytokine** Bei der direkten Analyse des *PLA2G4A*-Gens, das für cPLA<sub>2</sub>α kodiert, konnte jedoch eine deutliche Reduktion der Genexpression

nach Vorbehandlung mit Dexamethason beobachtet werden (Vehikel:  $n = 5$ ,  $7,87 \pm 0,08$  vs. Dexamethason:  $n = 6$ ,  $5,78 \pm 0,21$ ,  $***P < 0,0001$ ; Abb. 40A). Proinflammatorische Cytokine, für die beschrieben wurde, dass sie die Expression von  $cPLA_2\alpha$  induzieren können, wurden ebenfalls untersucht (202). Die Expression von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) konnte durch Dexamethason gehemmt werden (jeweils  $n = 6$ , von  $6,32 \pm 0,34$  auf  $5,15 \pm 0,22$ ,  $\#P < 0,05$ , Abb. 40B), während kein signifikanter Effekt auf die Expression von Interferon- $\gamma$  festgestellt wurde (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel, Abb. 40C)



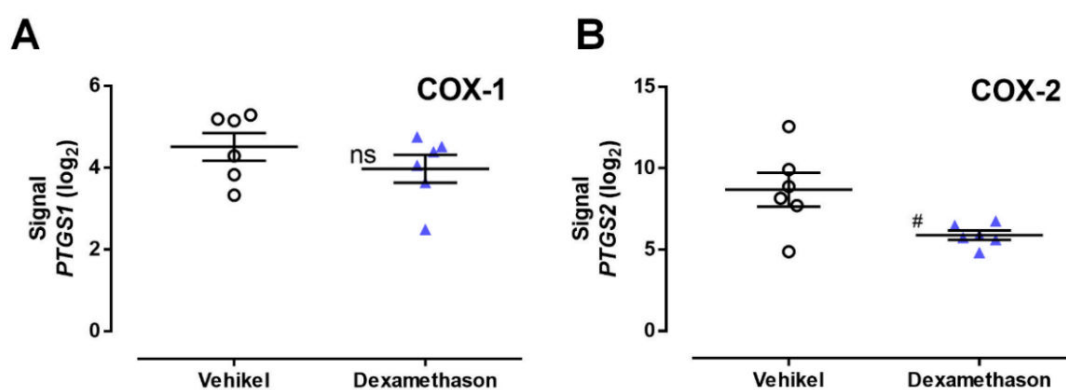
**Abb. 40:** Ergebnisse der Microarray-Expressionsanalysen der Gene *PLA2G4A* (cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$ ,  $cPLA_2\alpha$ ), *IL1B* (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) und *IFNG* (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) in Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason oder Vehikel. Nach intraperitonealer Vorbehandlung von C57BL/6 mit Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder Vehikel und einer Wirkdauer von 180 min wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus dem dorsalen Subkutangewebe isoliert und mittels Microarray analysiert. (A) Nach Vorbehandlung mit Dexamethason wurde eine signifikante Reduktion der Genexpression von  $cPLA_2\alpha$  beobachtet (Vehikel:  $n = 5$ ,  $7,87 \pm 0,08$  vs. Dexamethason:  $n = 6$ ,  $5,78 \pm 0,21$ ,  $***P < 0,0001$ ). (B) Die Expression von IL-1 $\beta$  wurde ebenfalls durch Dexamethason reduziert (jeweils  $n = 6$ , von  $6,32 \pm 0,34$  auf  $5,15 \pm 0,22$ ,  $\#P < 0,05$ ), wohingegen für (C) IFN- $\gamma$  kein signifikanter Effekt beobachtet werden konnte. Die Angabe der Signalstärken erfolgte als binärer Logarithmus ( $\log_2$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs.

Die beschriebene Induktion von Annexin A1 durch Glucocorticoide konnte in Subkutangewebe von C57BL/6 für Dexamethason weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Jedoch deuten die Daten darauf hin, dass Dexamethason in der Lage ist, die Genexpression von  $cPLA_2\alpha$  in der Haut von Mäusen zu inhibieren.

### 3.3.2 Regulation der Prostanoidwirkung

Die Synthese von Prostanoiden aus Arachidonsäure läuft zunächst über COX, die über den instabilen Zwischenmetaboliten PGG<sub>2</sub> das biologisch inaktive PGH<sub>2</sub> bildet. Anschließend wird PGH<sub>2</sub> durch entsprechende Synthase zu den aktiven PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> oder TXA<sub>2</sub> umgesetzt, die über diverse Rezeptoren ihre Wirkung entfalten (131). Die Inaktivierung der Prostanoiden erfolgt einerseits auf nicht-enzymatischem Wege, andererseits jedoch auch durch enzymatische Oxidation mittels 15-HPGD (138). Demnach könnte die Regulation der Expression der genannten Proteine durch Dexamethason Einfluss auf die Konzentration und Wirkung von Prostanoiden nehmen, die in Zusammenhang mit der B2-vermittelten dermalen Extravasation stehen.

Bei der Genexpressionsanalyse von COX-1 (*PTGS1*-Gen) und COX-2 (*PTGS2*-Gen) zeigte die Vorbehandlung mit Dexamethason für COX-1 keine signifikante Veränderung (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel; Abb. 41A). Im Gegensatz dazu konnte die Expression von COX-2 durch Dexamethason im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit Vehikel signifikant vermindert werden (jeweils n = 6, von  $8,69 \pm 1,04$  auf  $5,89 \pm 0,28$ , #P < 0,05; Abb. 41B).

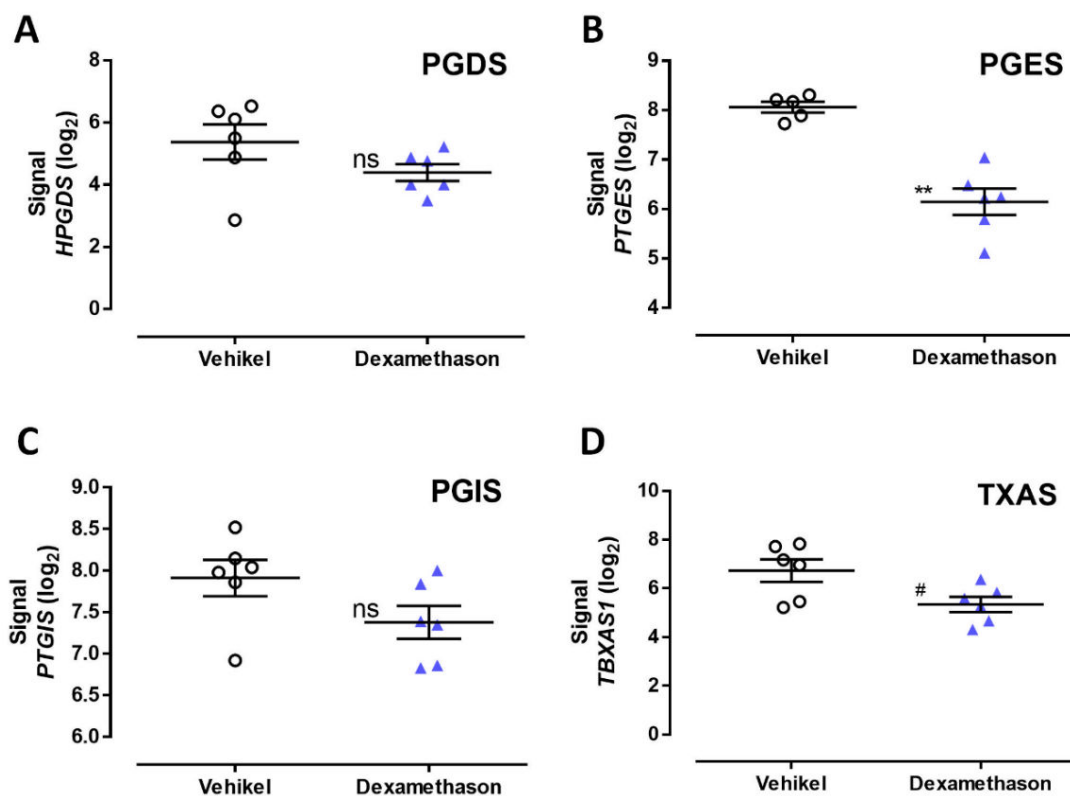


**Abb. 41:** Ergebnisse der Microarray-Expressionsanalysen der Gene *PTGS1* (Cyclooxygenase-1, COX-1) und *PTGS2* (COX-2) in Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason oder Vehikel. Nach intraperitonealer Behandlung von C57BL/6 mit Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder Vehikel und einer Wirkdauer von 180 min wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus dem dorsalen Subkutangewebe isoliert und mittels Microarray analysiert. (A) Nach Vorbehandlung mit Dexamethason wurde kein signifikanter Effekt auf die Genexpression von COX-1 beobachtet (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). (B) Die Genexpression von COX-2 konnte durch Dexamethason im Vergleich zu Vehikel jedoch signifikant reduziert werden (jeweils n = 6, von  $8,69 \pm 1,04$  auf  $5,89 \pm 0,28$ , #P < 0,05). Die Angabe der Signalstärken erfolgte als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test.

Neben COX-1 und COX-2 wurden auch die Expressionslevel der Gene für PGD-Synthase (PGDS, *HPGDS*-Gen), PGE-Synthase (PGES, *PTGES*-Gen), PGI-Synthase (PGIS, *PTGIS*-Gen) und TXA-Synthase (TXAS, *TBXAS1*-Gen) untersucht (PGF-Synthase nicht



verfügbar). Nach Vorbehandlung mit Dexamethason konnte für PGDS kein signifikanter Effekt festgestellt werden (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel; Abb. 42A), wohingegen für PGES eine Reduktion beobachtet werden konnte (Vehikel:  $n = 5$ ,  $8,06 \pm 0,11$  vs. Dexamethason:  $n = 6$ ,  $6,15 \pm 0,27$ ,  $**P < 0,001$ ; Abb. 42B). Die Genexpression von PGIS wurde im Vergleich zu Vehikel nicht signifikant beeinflusst (jeweils  $n = 6$ , ns; Abb. 42C). TXAS zeigte jedoch im Vergleich zu Vehikel eine signifikant verminderte Expression seines Gens (jeweils  $n = 6$ , von  $6,73 \pm 0,46$  auf  $5,34 \pm 0,31$ ,  $\#P < 0,05$ ; Abb. 42D).



**Abb. 42:** Resultate der Microarray-Expressionsanalysen der Gene *HPGDS* (Prostaglandin D-Synthase, PGDS), *PTGES* (Prostaglandin E-Synthase, PGES), *PTGIS* (Prostaglandin I-Synthase, PGIS) und *TBXAS1* (Thromboxan A-Synthase, TXAS) in Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason oder Vehikel. Nach intraperitonealer Behandlung von C57BL/6 mit Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder Vehikel und einer Wirkdauer von 180 min wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus dem dorsalen Subkutangewebe isoliert und mittels Microarray analysiert. (A) Nach Behandlung mit Dexamethason wurde kein signifikanter Effekt auf die Genexpression von PGDS beobachtet (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). (B) Die Genexpression von PGES konnte mittels Dexamethason signifikant reduziert werden (Vehikel:  $n = 5$ ,  $8,06 \pm 0,11$  vs. Dexamethason:  $n = 6$ ,  $6,15 \pm 0,27$ ,  $**P < 0,001$ ), wohingegen für (C) PGIS kein signifikanter Effekt von Dexamethason festgestellt werden konnte (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). (D) TXAS zeigte jedoch im Vergleich zu Vehikel eine signifikante Reduktion der Genexpression (jeweils  $n = 6$ , von  $6,73 \pm 0,46$  auf  $5,34 \pm 0,31$ ,  $\#P < 0,05$ ). Die Angabe der Signalstärken erfolgte als binärer Logarithmus ( $\log_2$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs.

Da Prostanoiden ihre Wirkung über diverse Rezeptoren entfalten, könnte die Regulation der Rezeptorgene ebenfalls Einfluss auf die Wirkung der Prostanoiden nehmen. In Tab. 10 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der Prostanoidrezeptoren zusammengefasst. Bei keinem der Rezeptoren konnte im Vergleich zur Vehikelkontrolle ein signifikanter Effekt von Dexamethason auf die Genexpression beobachtet werden.

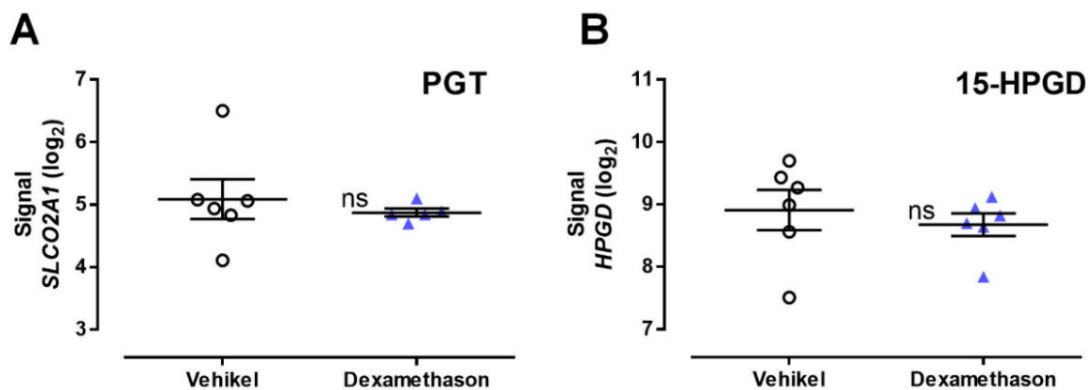
**Tab. 10:** Ergebnisse der Microarray-Expressionsanalysen von Prostanoidrezeptoren in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Rezeptor	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
<b>PGD<sub>2</sub>-R1 (DP1)</b>	<i>PTGDR</i>	2,67 ± 0,36 (n = 6)	2,85 ± 0,46 (n = 6)	> 0,05
<b>PGD<sub>2</sub>-R2 (DP2)</b>	<i>PTGDR2</i>	3,05 ± 0,28 (n = 6)	3,07 ± 0,34 (n = 6)	> 0,05
<b>PGE<sub>2</sub>-R1 (EP1)</b>	<i>PTGER1</i>	5,03 ± 0,40 (n = 6)	4,95 ± 0,37 (n = 6)	> 0,05
<b>PGE<sub>2</sub>-R2 (EP2)</b>	<i>PTGER2</i>	3,32 ± 0,47 (n = 6)	3,34 ± 0,66 (n = 6)	> 0,05
<b>PGE<sub>2</sub>-R3 (EP3)</b>	<i>PTGER3</i>	5,32 ± 0,58 (n = 6)	4,77 ± 0,63 (n = 6)	> 0,05
<b>PGE<sub>2</sub>-R4 (EP4)</b>	<i>PTGER4</i>	5,33 ± 0,49 (n = 6)	4,81 ± 0,44 (n = 6)	> 0,05
<b>PGF<sub>2α</sub>-R (FP)</b>	<i>PTGFR</i>	4,37 ± 0,47 (n = 6)	4,23 ± 0,67 (n = 6)	> 0,05
<b>PGI<sub>2</sub>-R (IP)</b>	<i>PTGIR</i>	3,08 ± 0,30 (n = 6)	3,03 ± 0,15 (n = 6)	> 0,05
<b>TXA<sub>2</sub>-R (TP)</b>	<i>TBXA2R</i>	3,40 ± 0,25 (n = 6)	3,38 ± 0,21 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Rezeptorname mit exprimierendem Gen, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test. PG = Prostaglandin, R = Rezeptor

Die Inaktivierung der Prostanoiden erfolgt nach Aufnahme über den PG-Carrier PGT (140) nicht-enzymatisch oder unter anderem durch Oxidation über 15-HPGD (138,139). Die Microarray-Analyse zeigte jedoch im Vergleich zu Vehikel keinen Effekt von Dexamethason auf die Genexpression von PGT (*SLCO2A1*-Gen; Vehikel: n = 6 vs. Dexamethason: n = 5, ns; Abb. 43A) oder 15-HPGD (*HPGD*-Gen; jeweils n = 6, ns; Abb. 43B). Die Daten deuten darauf hin, dass Dexamethason in der Haut von Mäusen im Stande ist, die Expression

bestimmter Enzyme, die für die Prostanoidsynthese verantwortlich sind (COX-2, PGES, TXAS) herunterzuregulieren. Dahingegen scheint Dexamethason keinen Einfluss auf die Expression der Prostanoidrezeptoren, des Transporters PGT oder des inaktivierenden Enzyms 15-HPGD zu haben.



**Abb. 43:** Ergebnisse der Microarray-Expressionsanalysen des *SLCO2A1*- (Prostaglandin-Transporter, PGT) und *HPGD*-Gens (15-Hydroxy-Prostaglandin-Dehydrogenase, 15-HPGD) in Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason oder Vehikel. Nach intraperitonealer Behandlung von C57BL/6 mit Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder Vehikel und einer Wirkdauer von 180 min wurde die Ribonukleinsäure (RNA) aus dem dorsalen Subkutangewebe isoliert und mittels Microarray analysiert. Die Vorbehandlung mit Dexamethason führte zu keinem signifikanten Effekt auf die Genexpression von (A) PGT (Vehikel:  $n = 6$  vs. Dexamethason:  $n = 5$ , ns) oder (B) 15-HPGD (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel). Die Angabe der Signalstärken erfolgte als binärer Logarithmus ( $\log_2$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs.

### 3.3.3 Regulation der Leukotrienwirkung

Leukotriene sind Entzündungsmediatoren und können unter anderem die Endothelpermeabilität erhöhen (194). Sie gehen aus Arachidonsäure hervor, wobei das Enzym 5-LOX gemeinsam mit seinem Aktivator FLAP (5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein) an der Umsetzung beteiligt ist. Das so gebildete Leukotrien  $A_4$  ( $LTA_4$ ) wird wiederum durch die Leukotrien  $C_4$ -Synthase (LTC4S) in (Cysteinyl-)Leukotrien  $C_4$  ( $LTC_4$ ) umgewandelt, ehe es in dieser Form oder in Form seiner Metabolite Leukotrien  $D_4$  ( $LTD_4$ ) bzw. Leukotrien  $E_4$  ( $LTE_4$ ) seine Rezeptoren CysLT-Rezeptor 1 (CysLT1) und 2 (CysLT2) aktivieren kann (203). Eine Hemmung der Expression der beteiligten Proteine durch Dexamethason könnte daher womöglich zu einer Reduktion der Endothelpermeabilität führen.

Die Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalysen der genannten Proteine, die an der Synthese und Wirkung von Leukotrienen beteiligt sind, wurden in Tab. 11 zusammengefasst. Dexamethason zeigte keinen Einfluss auf die Genexpression von *ALOX5* bzw. 5-LOX (jeweils  $n = 6$ , ns vs. Vehikel), wohingegen die Expression des aktivierenden Proteins FLAP signifikant reduziert wurde (Vehikel:  $n = 5$ ,  $9,01 \pm 0,08$  vs. Dexamethason:  $n = 6$ ,

7,53 ± 0,31, P = 0,0024). Die Expression der für die weitere Umsetzung notwendigen LTC4S (*LTC4S*-Gen) wurde ebenfalls im Vergleich zu Vehikel signifikant reduziert (jeweils n = 6, von 5,43 ± 0,22 auf 4,46 ± 0,12, P = 0,0033). Darüber hinaus konnte auch die Expression von CysLT1 (*CYSLTR1*-Gen) durch Dexamethason signifikant verringert werden (Vehikel: n = 5, 7,54 ± 0,11 vs. Dexamethason: n = 6, 4,94 ± 0,20, P < 0,0001), wohingegen CysLT2 (*CYSLTR2*-Gen) nicht beeinflusst wurde (jeweils n = 6, ns vs. Vehikel). Die Daten deuten darauf hin, dass Dexamethason sowohl die Leukotriensynthese durch Hemmung der FLAP- und der LTC4S-Expression als auch die CysLT1-Expression hemmen kann und damit womöglich Einfluss auf die Endothelpermeabilität nehmen könnte.

**Tab. 11:** Resultate der Microarray-Genexpressionsanalysen von Proteinen, die an der Synthese und Wirkung von Leukotrienen beteiligt sind, in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Protein	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
5-LOX	<i>ALOX5</i>	3,35 ± 0,24 (n = 6)	3,11 ± 0,25 (n = 6)	> 0,05
FLAP	<i>ALOX5AP</i>	9,01 ± 0,08 (n = 5)	7,53 ± 0,31 (n = 6)	<b>0,0024</b>
LTCS4	<i>LTC4S</i>	8,06 ± 0,11 (n = 6)	6,15 ± 0,27 (n = 6)	<b>0,0033</b>
CysLT1	<i>CYSLTR1</i>	7,54 ± 0,11 (n = 5)	4,94 ± 0,20 (n = 6)	<b>&lt; 0,0001</b>
CysLT2	<i>CYSLTR2</i>	3,51 ± 0,07 (n = 6)	3,52 ± 0,12 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Name des Proteins und exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs. 5-LOX = 5-Lipoxygenase, CysLT1 = Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor 1, CysLT2 = Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor 2, FLAP = 5-Lipoxygenase-aktivierendes Protein, LTCS4 = Leukotrien C<sub>4</sub>-Synthase

### 3.3.4 Regulation der Wirkung von Epoxyeicosatriensäuren

EETs entstehen durch CYP-vermittelte Epoxidierung von Arachidonsäure und können als EDHFs durch Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen eine Hyperpolarisation glatter Muskelzellen und damit eine Vasorelaxation hervorrufen (195). Dabei sind von den in Säugetieren vorkommenden CYP-Enzymen vor allem Mitglieder der CYP2-Familie, insbesondere der Unterfamilie CYP2C und CYP2J, in der Lage, EETs zu synthetisieren (204). Ihr Abbau erfolgt über Epoxidhydrolasen (205). Eine verminderte EET-Konzentration könnte eine geringere Vasorelaxation nach sich ziehen und die dermale Extravasation reduzieren.

Bei der Untersuchung der Genexpression der CYP-Enzyme lag nur ein kleiner Anteil der bekannten murinen CYP-Enzyme auf dem ausgewählten Microarray-Chip vor. Die Ergebnisse der untersuchten CYP2C- (Tab. 12) und CYP2J-Enzyme (Tab. 13) sind im Folgenden zusammengefasst. Dabei führte die Vorbehandlung mit Dexamethason im Vergleich zu Vehikel bei CYP2J9 zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression (jeweils  $n = 6$ , von  $6,35 \pm 0,55$  auf  $5,83 \pm 0,16$ ,  $P = 0,0349$ ). Dahingegen konnte kein Effekt von Dexamethason auf die anderen Isoenzyme beobachtet werden.

Da der Abbau von EETs enzymatisch durch Epoxidhydrolasen erfolgt (205), könnte die Regulation der Expression dieser Enzyme die vasodilatatorische Wirkung der EETs beeinflussen. In Tab. 14 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der untersuchten Epoxidhydrolasen zusammengefasst. Dabei konnte nur für Epoxidhydrolase 3 (*EPHX3*-Gen) eine signifikante Verminderung der Genexpression durch Dexamethason gegenüber Vehikel beobachtet werden (jeweils  $n = 6$ , von  $4,05 \pm 0,18$  auf  $3,18 \pm 0,46$ ,  $P = 0,0028$ ).

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass Dexamethason nur einen hemmenden Einfluss auf die Expression von CYP2J9 und der Epoxidhydrolase 3 in der Haut von Mäusen haben könnte.

**Tab. 12:** Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalysen der Cytochrom P450 (CYP-) Unterfamilie CYP2C in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Cytochrom P450 (CYP)	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
<b>CYP2C29</b>	<i>CYP2C29</i>	4,40 ± 0,71 (n = 6)	4,74 ± 0,42 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C38</b>	<i>CYP2C38</i>	3,52 ± 0,24 (n = 6)	3,25 ± 0,27 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C39</b>	<i>CYP2C39</i>	2,89 ± 0,19 (n = 6)	2,82 ± 0,16 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C40</b>	<i>CYP2C40</i>	2,73 ± 0,35 (n = 6)	2,69 ± 0,18 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C44</b>	<i>CYP2C44</i>	2,85 ± 0,34 (n = 6)	2,67 ± 0,25 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C50</b>	<i>CYP2C50</i>	4,22 ± 0,63 (n = 6)	4,21 ± 0,66 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C54</b>	<i>CYP2C54</i>	4,17 ± 0,35 (n = 6)	4,42 ± 0,59 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C55</b>	<i>CYP2C55</i>	3,79 ± 0,23 n = 6	3,65 ± 0,24 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C65</b>	<i>CYP2C65</i>	3,66 ± 0,32 (n = 6)	3,76 ± 0,39 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C66</b>	<i>CYP2C66</i>	4,34 ± 0,37 (n = 6)	4,23 ± 0,37 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C67</b>	<i>CYP2C67</i>	3,00 ± 0,37 (n = 6)	3,14 ± 0,36 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C68</b>	<i>CYP2C68</i>	3,39 ± 0,36 (n = 6)	3,56 ± 0,57 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C69</b>	<i>CYP2C69</i>	2,94 ± 0,31 (n = 6)	2,68 ± 0,43 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2C70</b>	<i>CYP2C70</i>	3,69 ± 0,24 (n = 6)	3,67 ± 0,32 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Name des CYP-Enzyms und des exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test.

**Tab. 13:** Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalysen der Cytochrom P450 (CYP-) Unterfamilie CYP2J in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Cytochrom P450 (CYP)	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
<b>CYP2J5</b>	<i>CYP2J5</i>	2,60 ± 0,66 (n = 6)	3,20 ± 0,28 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2J6</b>	<i>CYP2J6</i>	7,27 ± 0,39 (n = 6)	6,95 ± 0,43 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2J7</b>	<i>CYP2J7</i>	3,78 ± 0,61 (n = 6)	4,35 ± 0,39 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2J8</b>	<i>CYP2J8</i>	4,08 ± 0,47 (n = 6)	3,80 ± 0,57 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2J9</b>	<i>CYP2J9</i>	6,35 ± 0,55 (n = 6)	5,83 ± 0,16 (n = 6)	<b>0,0349</b>
<b>CYP2J11</b>	<i>CYP2J11</i>	2,34 ± 0,49 (n = 6)	2,67 ± 0,43 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2J12</b>	<i>CYP2J12</i>	2,98 ± 0,64 (n = 6)	3,07 ± 0,62 (n = 6)	> 0,05
<b>CYP2J13</b>	<i>CYP2J13</i>	3,13 ± 0,43 (n = 6)	2,89 ± 0,52 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Name des CYP-Enzyms und des exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test.

**Tab. 14:** Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalysen von Epoxidhydrolasen (EH) in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Epoxidhydrolase (EH)	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
EH1, mikrosomal	<i>EPHX1</i>	9,37 ± 0,56 (n = 6)	9,09 ± 0,22 (n = 6)	> 0,05
EH2, cytoplasmatisch	<i>EPHX2</i>	9,41 ± 0,73 (n = 6)	10,19 ± 0,40 (n = 6)	> 0,05
EH3	<i>EPHX3</i>	4,05 ± 0,18 (n = 6)	3,18 ± 0,46 (n = 6)	<b>0,0028</b>
EH4	<i>EPHX4</i>	4,96 ± 0,46 (n = 6)	4,42 ± 0,44 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Name der EH und des exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test.

### 3.3.5 Regulation der Bradykinin-Signalgebung

An der Bradykinin-Signalgebung sind Rezeptoren, Enzyme oder proteinbasierte Second messenger beteiligt, deren Regulation die Wirkung von Bradykinin auf Gefäßendothel und glatte Gefäßmuskulatur beeinflussen könnte. Eine Übersicht der Bradykinin-Signalwege, die nach Aktivierung von B1 bzw. B2 in Gang gesetzt werden, ist in Kapitel 1.3.2 dargestellt. Die Genexpressionsanalyse der Proteine zeigte nur für PKG1 (*PRKG1*-Gen) eine verminderte Expression nach Vorbehandlung mit Dexamethason im Vergleich zur Kontrolle mit Vehikel (jeweils n = 6, von 11,49 ± 0,42 auf 10,05 ± 0,64, P = 0,0012; Tab. 15).



**Tab. 15:** Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalysen von Genen, deren resultierende Proteine an der Bradykinin-Signalgebung beteiligt sind, in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Vorbehandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Protein	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
<b>B1</b>	<i>BDKRB1</i>	3,62 ± 0,32 (n = 6)	3,83 ± 0,36 (n = 6)	> 0,05
<b>B2</b>	<i>BDKRB2</i>	2,95 ± 0,29 (n = 6)	2,88 ± 0,50 (n = 6)	> 0,05
<b>G<sub>q/11</sub>*</b>	<i>GNA11</i>	7,99 ± 0,33 (n = 6)	7,89 ± 0,32 (n = 6)	> 0,05
<b>PLCβ1*</b>	<i>PLCB1</i>	6,91 ± 0,36 (n = 6)	6,96 ± 0,23 (n = 6)	> 0,05
<b>PKCα*</b>	<i>PRKCA</i>	11,01 ± 0,52 (n = 6)	11,06 ± 0,41 (n = 6)	> 0,05
<b>CaM1*</b>	<i>CALM1</i>	15,52 ± 0,22 (n = 6)	15,40 ± 0,25 (n = 6)	> 0,05
<b>MLCK</b>	<i>MYLK</i>	7,00 ± 0,59 (n = 6)	7,57 ± 0,80 (n = 6)	> 0,05
<b>eNOS*</b>	<i>NOS3</i>	4,29 ± 0,59 (n = 6)	4,51 ± 0,35 (n = 6)	> 0,05
<b>sGCα2*</b>	<i>GUCY1A2</i>	3,36 ± 0,42 (n = 6)	3,26 ± 0,20 (n = 6)	> 0,05
<b>PKG1*</b>	<i>PRKG1</i>	11,49 ± 0,42 (n = 6)	10,05 ± 0,64 (n = 6)	<b>0,0012</b>
<b>AC1*</b>	<i>ADCY1</i>	3,36 ± 0,42 (n = 6)	3,26 ± 0,20 (n = 6)	> 0,05
<b>PKAα, katalytisch*</b>	<i>PRKACA</i>	12,47 ± 0,29 (n = 6)	12,50 ± 0,22 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Name des Proteins und des exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test. \*weitere untersuchte Isoformen nicht signifikant (P > 0,5; siehe Anhang); AC = Adenylatcyclase, B1 = Bradykinin-B1-Rezeptor, B2 = Bradykinin-B2-Rezeptor, CaM = Calmodulin, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, G = Guanosintriphosphat-bindendes Protein, MLCK = Myosin-leichte-Ketten-Kinase, PK = Proteinkinase, PL = Phospholipase, sGC = lösliche Guanylatcyclase

Arrestine sind in der Lage durch Bindung an B2 diesen zu desensibilisieren bzw. zu internalisieren, sodass Bradykinin als Ligand seine Wirkung nicht mehr entfalten kann (97). Sowohl β-Arrestin 1 (*ADRBK1*-Gen) als auch β-Arrestin 2 (*ADRBK2*-Gen) konnten durch Dexamethason im Vergleich zu Vehikel auf mRNA-Ebene signifikant herunterreguliert werden (β-Arrestin 1: jeweils n = 6, von 9,29 ± 0,25 auf 8,75 ± 0,28, P = 0,0046; β-Arrestin 2: jeweils n = 6, von 6,72 ± 0,64 auf 5,72 ± 0,30, P = 0,0102; Tab. 16).

**Tab. 16:** Ergebnisse der Microarray-Genexpressionsanalysen von  $\beta$ -Arrestin 1 und 2 in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Protein	Gen	Signal $\pm$ SEM ( $\log_2$ ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
$\beta$ -Arrestin-1	<i>ARRB1</i>	$9,29 \pm 0,25$ (n = 6)	$8,75 \pm 0,28$ (n = 6)	<b>0,0046</b>
$\beta$ -Arrestin-2	<i>ARRB2</i>	$6,72 \pm 0,64$ (n = 6)	$5,72 \pm 0,30$ (n = 6)	<b>0,0102</b>

Angegeben sind der Name des Proteins und exprimierenden Gens, die Signalstärken ( $\pm$  Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus ( $\log_2$ ) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test.

Die Daten deuten darauf hin, dass Dexamethason dazu fähig ist, die Expression von Proteinen, die an der Bradykinin-Signalgebung beteiligt sind (PKG1) oder diese regulieren ( $\beta$ -Arrestin 1 bzw. 2), in der Haut von Mäusen zu reduzieren.

### 3.3.6 Regulation Bradykinin-abbauender Enzyme

Bradykinin verfügt über eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit ( $< 30 \text{ s}$ ), die durch den Abbau durch im Plasma vorhandene Peptidasen wie ACE zustande kommt (206). Eine gesteigerte Expression dieser Enzyme könnte zu einem noch schnelleren Abbau von Bradykinin führen und seine Wirkung weiter begrenzen, was einen Effekt auf die B2-vermittelte dermale Extravasation nach sich ziehen könnte. In Tab. 17 sind in der Literatur beschriebene Enzyme, die an der Degradation von Bradykinin beteiligt sein können (207,208), sowie die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen nach Vorbehandlung der Mäuse mit Dexamethason oder Vehikel aufgeführt. Dexamethason konnte die Expression von ACE (Vehikel: n = 5,  $14,19 \pm 0,24$  vs. Dexamethason: n = 6,  $13,01 \pm 0,32$ , P = 0,0193) und DPP4 (Vehikel: n = 5,  $12,30 \pm 0,25$  vs. Dexamethason: n = 6,  $9,75 \pm 0,22$ , P < 0,0001) im Vergleich zur Vehikelkontrolle signifikant reduzieren. Diese Daten sprechen jedoch nicht dafür, dass der hemmende Effekt von Dexamethason auf die B2-vermittelte dermale Extravasation durch einen erhöhten enzymatischen Bradykinin-Abbau zustande kommt, da relevante abbauende Enzyme womöglich sogar herunterreguliert werden.

**Tab. 17:** Resultate der Microarray-Genexpressionsanalysen Bradykinin-abbauender Enzyme in Subkutangebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Enzym	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
<b>ACE</b>	<i>ACE</i>	14,19 ± 0,24 (n = 5)	13,01 ± 0,32 (n = 6)	<b>0,0193</b>
<b>NEP</b>	<i>MME</i>	7,65 ± 0,67 (n = 6)	7,45 ± 0,52 (n = 6)	> 0,05
<b>NEP2</b>	<i>MMEL1</i>	2,90 ± 0,24 (n = 6)	2,88 ± 0,30 (n = 6)	> 0,05
<b>APP1</b>	<i>XPNPEP1</i>	9,36 ± 0,20 (n = 6)	9,49 ± 0,19 (n = 6)	> 0,05
<b>APP2</b>	<i>XPNPEP2</i>	5,50 ± 1,05 (n = 6)	4,63 ± 0,32 (n = 6)	> 0,05
<b>CPN1</b>	<i>CPN1</i>	3,13 ± 0,13 (n = 6)	3,04 ± 0,41 (n = 6)	> 0,05
<b>CPN2</b>	<i>CPN2</i>	2,72 ± 0,38 (n = 6)	2,81 ± 0,37 (n = 6)	> 0,05
<b>CPM</b>	<i>CPM</i>	4,10 ± 1,23 (n = 6)	4,50 ± 1,37 (n = 6)	> 0,05
<b>EP 24.15</b>	<i>THOP1</i>	7,94 ± 0,45 (n = 6)	8,37 ± 0,40 (n = 6)	> 0,05
<b>ECE1</b>	<i>ECE1</i>	8,27 ± 0,24 (n = 6)	8,25 ± 0,39 (n = 6)	> 0,05
<b>ECE2</b>	<i>ECE2</i>	3,74 ± 0,69 (n = 6)	3,38 ± 0,32 (n = 6)	> 0,05
<b>PEP</b>	<i>PREP</i>	11,44 ± 0,17 (n = 6)	11,46 ± 0,33 (n = 6)	> 0,05
<b>DPP4</b>	<i>DPP4</i>	12,30 ± 0,25 (n = 5)	9,75 ± 0,22 (n = 6)	<b>&lt; 0,0001</b>

Angegeben sind der Name des Enzyms und des exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs. ACE = Angiotensin I-konvertierendes Enzym, APP = Aminopeptidase P, CPM = Carboxypeptidase M, CPN = Carboxypeptidase N, DPP4 = Dipeptidylpeptidase IV, ECE = Endothelin-konvertierendes Enzym, EP = Endopeptidase, NEP = Neprilysin, PEP = Prolyl-Endopeptidase

### 3.3.7 Regulation von Junction-Proteinen

Endothelzellen sind durch eine Reihe von Verbindungsproteinen (Junction-Proteine) miteinander verbunden. Durch Ausbildung von TJ und AJ wird die Gefäßintegrität aufrecht erhalten und die Endothelpermeabilität reguliert (12). Die Hochregulation der Expression von

Junction-Proteinen könnte somit einen hemmenden Einfluss auf die Endothelpermeabilität haben. In Tab. 18 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von bekannten Junction-Proteinen (12,209) zusammengefasst. Einzig VE-Cadherin zeigte eine signifikante Induktion nach Vorbehandlung mit Dexamethason (*CDH5*, jeweils n = 6, von 11,05 ± 0,22 auf 11,85 ± 0,15, P = 0,0001) und könnte eventuell an der hemmenden Wirkung von Dexamethason auf die endotheliale Permeabilität beteiligt sein.

**Tab. 18:** Resultate der Microarray-Genexpressionsanalysen von Junction-Proteinen in Subkutangewebe von C57BL/6 nach intraperitonealer Behandlung mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> Körpergewicht) oder Vehikel und 180 min Einwirkzeit.

Junction-Protein	Gen	Signal ± SEM (log <sub>2</sub> ) (n)		P-Wert
		Vehikel	Dexamethason	
<b>Claudin-1*</b>	<i>CLDN1</i>	8,40 ± 0,39 (n = 5)	6,83 ± 1,17 (n = 6)	<b>0,0058</b>
<b>Claudin-5*</b>	<i>CLDN5</i>	7,58 ± 0,50 (n = 6)	6,69 ± 0,69 (n = 6)	<b>0,0377</b>
<b>Occludin</b>	<i>OCLN</i>	4,81 ± 0,51 (n = 6)	5,06 ± 0,54 (n = 6)	> 0,05
<b>Tetraspanin-1*</b>	<i>TSPAN1</i>	2,82 ± 0,27 (n = 6)	2,71 ± 0,26 (n = 6)	> 0,05
<b>Cingulin</b>	<i>CGN</i>	3,97 ± 0,32 (n = 6)	3,97 ± 0,44 (n = 6)	> 0,05
<b>JAM1*</b>	<i>F11r</i>	6,52 ± 0,37 (n = 6)	5,94 ± 0,33 (n = 6)	<b>0,0155</b>
<b>TJP1*</b>	<i>TJP1</i>	9,68 ± 0,18 (n = 6)	9,20 ± 0,39 (n = 6)	<b>0,0197</b>
<b>β-Catenin-1*</b>	<i>CTNNB1</i>	13,57 ± 0,25 (n = 6)	13,52 ± 0,57 (n = 6)	> 0,05
<b>ESAM</b>	<i>ESAM</i>	6,33 ± 0,18 (n = 6)	6,58 ± 0,10 (n = 6)	> 0,05
<b>VE-Cadherin (5-Cadherin)*</b>	<i>CDH5</i>	11,05 ± 0,22 (n = 6)	11,85 ± 0,15 (n = 6)	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Vinculin</b>	<i>VCL</i>	11,25 ± 0,20 (n = 6)	11,65 ± 0,55 (n = 6)	> 0,05

Angegeben sind der Name des Junction-Proteins und exprimierenden Gens, die Signalstärken (± Standardfehler [SEM] für eine Anzahl [n] Mäuse) als binärer Logarithmus (log<sub>2</sub>) nach Vorbehandlung mit Vehikel oder Dexamethason sowie der P-Wert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test nach Ausschluss von Ausreißern durch Ausreißertest nach Grubbs. \*weitere untersuchte Isoformen nicht signifikant (P > 0,5; siehe Anhang); ESAM = Endothelial cell-specific Adhesion Molecule, JAM = Junction Adhesion Molecule, TJP = Tight Junction Protein, VE = Vascular Endothelium

## Diskussion

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war, ein besseres Verständnis der Bradykinin-vermittelten Signalwege zu gewinnen. Sie sind essentiell an der Pathogenese von Erkrankungen wie dem hereditären Angioödem oder dem nicht-allergischen Angioödem als Nebenwirkung von gängigen kardiovaskulären Medikamenten beteiligt. Zu diesen zählen insbesondere ACEi, ARB oder der Wirkstoff Sacubitril (11,31). Aufgrund der häufigeren Anwendung dieser Medikamente in Folge einer höheren Lebenserwartung der Population (49) ist von einer steigenden Inzidenz solcher potenziell lebensbedrohlichen Ereignisse auszugehen. Ein besseres Verständnis der Pathogenese Bradykinin-vermittelter Angioödeme könnte somit den Weg für neue Optionen in der Therapie und Prävention ebnen. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die COX eine wichtige Rolle bei der B<sub>2</sub>-vermittelten dermalen Extravasation in sowohl Mäusen als auch Menschen spielt. Dahingegen scheint ein Beitrag der eNOS und des aus ihr hervorgehenden NO vernachlässigbar zu sein (99,170). Daher lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der weiteren Untersuchung der COX-vermittelten Signalwege. Darüber hinaus sollte jedoch auch die Rolle des Substrats Arachidonsäure und ihrer anderen Metabolite, Leukotriene und EETs, bei der Bradykinin-vermittelten dermalen Extravasation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der Miles Assay verwendet, um den Effekt von COX-, 5-LOX- und CYP-Inhibitoren sowie diverser PG-Rezeptor-Antagonisten auf die durch B<sub>2</sub>-Aktivierung in C57BL/6 und COX-1<sup>-/-</sup> hervorgerufene dermale Extravasation zu analysieren. Zusätzlich wurde der PGI<sub>2</sub>-Metabolit 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in Subkutangewebe von C57BL/6 und HDMEC nach Stimulation mit Bradykinin mittels ELISA und LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert. Weitere Miles Assays umfassten den Einsatz des direkten cPLA<sub>2α</sub>-Inhibitors SB296 und des Glucocorticoids Dexamethason, welches cPLA<sub>2α</sub> auf indirektem Wege hemmen und die Arachidonsäuresynthese so beeinflussen kann (133). Genexpressionsanalysen in Subkutangewebe von C57BL/6 nach Behandlung mit Dexamethason sollten zudem neue Ansätze zur Hemmung der B<sub>2</sub>-assoziierten dermalen Extravasation schaffen.

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass Arachidonsäure, deren Freisetzung in Reaktion auf Bradykinin erfolgt, vorwiegend durch COX-1 umgesetzt wird, wohingegen 5-LOX und CYP-Enzyme wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen. In der Folge gebildetes PGI<sub>2</sub> stellt zudem das entscheidende PG dar, welches die Wirkung von Bradykinin auf die dermale Extravasation vermittelt. Dies deutet darauf hin, dass COX-1-vermitteltes PGI<sub>2</sub> wesentlich zur Bradykinin-induzierten Extravasation, die dem nicht-allergischen Angioödem zugrunde liegt, beiträgt. Zudem konnte Dexamethason die B<sub>2</sub>-

vermittelte dermale Extravasation über das Maß einer cPLA<sub>2</sub>- oder COX-Hemmung hinaus und vergleichbar effektiv wie der B<sub>2</sub>-Antagonist Icatibant hemmen. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass zum einen der Einsatz von Glucocorticoiden einen rationalen Therapieansatz für Bradykinin-induzierte Angioödeme bildet und zum anderen weitere Mechanismen dabei eine Rolle spielen müssen. Anschließende Genexpressionsanalysen in C57BL/6 konnten Anhaltspunkte für die Beteiligung der cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  oder VE-Cadherin an der Wirkung von Dexamethason liefern, deren Aussagekraft jedoch aufgrund der zellulären Heterogenität der untersuchten Proben limitiert ist.

#### **4.1 Rolle der Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung für die Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation**

Das Mikrogefäßsystem ist ein Netz winziger Gefäße des arteriellen, venösen und lymphatischen Systems, das sich durch verschiedene Organe zieht. Es ermöglicht den Austausch von Wasser, Elektrolyten, Proteinen und Immunzellen, die für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die Immunabwehr unerlässlich sind. Die Fähigkeit, den Übergang verschiedener Stoffe entsprechend des Bedarfs des jeweiligen Gewebes und ohne Störung des physiologischen Gleichgewichts zu steuern, spielt dabei eine entscheidende Rolle. Durch Erhöhung der Flussrate in Folge einer Vasodilatation oder der Nutzung von Konzentrationsgradienten kann das Gleichgewicht reguliert werden, ohne direkten Einfluss auf die Durchlässigkeit der Gefäße für Substanzen zu nehmen (210). Weitere und komplexere Arten der Regulation umfassen rezeptorvermittelte Öffnungsmechanismen der Endothelbarriere, die mit einer vorübergehenden Erhöhung der Permeabilität einhergehen. Hierbei sind insbesondere Bradykinin und Histamin zu nennen, die durch Aktivierung ihrer entsprechenden GPCR die Gefäßpermeabilität erhöhen (63). Eine Erhöhung der Konzentrationen dieser Mediatoren über das physiologische Maß hinaus kann jedoch letztlich zur Bildung verschiedener Formen des Angioödems führen (8).

Extravasation findet hauptsächlich in kleineren Gefäßen wie Kapillaren und postkapillären Venolen statt. Die Regulierung der endothelialen Barrierefunktion ist entscheidend für die Funktion und Integrität der Gefäße. Zu den Faktoren, die sich auf die vaskuläre Permeabilität auswirken, gehören insbesondere die Eigenschaften der beteiligten Mikrogefäße und der extravasierenden Verbindungen (Größe, Form, Ladung). Es gibt verschiedene anatomische Wege, durch die Moleküle die endotheliale Barriere passieren können. So können sie z. B. durch Kanäle oder Vesikel transzellulär innerhalb einzelner Endothelzellen oder durch Öffnung von Junction-Komplexen zwischen benachbarten Zellen parazellulär trans-

portiert werden (12). Unter physiologischen Bedingungen können gelöste Stoffe und kleinere Moleküle das Endothel auf passivem bzw. spontanem Wege passieren, während größere Proteine wie Albumin auf einen aktiven Transport per Transcytose angewiesen sind. Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Bradykinin sind in der Lage, die endotheliale Integrität durch Lockerung der Zell-Zell-Verbindungen zu beeinträchtigen und die Endothelpermeabilität zu erhöhen. Unter solch pathophysiologischen Bedingungen können Albumin und größere Plasmaproteine wie Antikörper oder zelluläre Bestandteile wie Leukozyten das Gefäßlumen ungehindert auch auf parazellulärem Weg verlassen. Die Kombination aus übermäßiger Extravasation und unzureichendem Abfluss der interstitiellen Flüssigkeit über das lymphatische oder kapilläre System kann letztlich zur Bildung von Ödemen und Entzündungen im betroffenen Gewebe führen (211).

Während eines Angioödems ist die Durchlässigkeit der Gefäße für Albumin erhöht, sodass die Menge des extravasierten Albumins als Surrogatparameter zur Bewertung der vaskulären Hyperpermeabilität verwendet werden kann. Miles und Miles schufen 1952 mit dem Miles Assay die methodischen Grundlagen für die Untersuchung der Histamin-induzierten dermalen Extravasation von zuvor systemisch verabreichtem Pontamin-Himmelblau in Meerschweinchen (176). Der ursprüngliche Farbstoff wurde durch den Azofarbstoff Evans Blue ersetzt, der eine starke Affinität zu Albumin aufweist, sodass die Steigerung der Gefäßpermeabilität anhand einer lokalen Zunahme des extravasierenden Albumin-Farbstoff-Komplexes bewertet werden konnte. Diese Methode wurde weiter optimiert und mittlerweile an verschiedene Organe von Mäusen angepasst, um die Wirkung der verwendeten Substanzen auf die Extravasation zu bewerten (177). Der in dieser Arbeit beschriebene Miles Assay wurde bereits erfolgreich angewandt, um die induzierte dermale Extravasation in der dorsalen Haut von Mäusen als Reaktion auf verschiedene Mediatoren und den Einfluss pharmakologischer Interventionen darauf zu bewerten (99,170). Bradykinin kann über zwei verschiedene GPCR, B1 und B2, seine Wirkung entfalten. Während die Expression von B1 von Entzündungsmediatoren wie Cytokinen abhängt, wird B2 konstitutiv in vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert (79). Um die Wirkung von Bradykinin und der Rezeptoraktivierung auf die dermale Extravasation zu untersuchen, wurden im Miles Assay C57BL/6 mit i. d. Injektionen von jeweils 2 nmol Bradykinin, des proteolytisch stabileren B2-Agonisten Labradimil (180) und Histamin behandelt. Dies führte bei allen drei Substanzen im Vergleich zu einer Kontrollinjektion mit PBS zu einer vergleichbar stark ausgeprägten dermalen Extravasation, die anhand des lokal akkumulierten Evans Blue nach Extraktion photometrisch quantifiziert werden konnte. Die dermale Extravasation, die durch Bradykinin und auch Labradimil induziert wurde, konnte durch Vorbehandlung der Mäuse mit dem selektiven B2-Antagonisten Icatibant (6) fast vollständig gehemmt werden, wohingegen die

Histamin-vermittelte Extravasation nicht beeinflusst wurde. Dies bestätigt bereits veröffentlichte Daten, die besagen, dass die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation im Wesentlichen über eine Aktivierung des B2-Rezeptors vermittelt wird (170). Die i. d. Injektion einer Kombination aus jeweils 2 nmol Bradykinin und Histamin führte jedoch zu keiner signifikant höheren dermalen Extravasation im Vergleich zur Injektion der einzelnen Substanzen. Dies deutet darauf hin, dass die auf diesem Wege induzierbare bzw. in diesem Assay messbare dermale Extravasation limitiert sein könnte. Entzündungsmediatoren wie Bradykinin und Histamin erhöhen die Gefäßpermeabilität durch verschiedene molekulare Mechanismen, einschließlich der Öffnung endothelialer AJs und der Steigerung des parazellulären Transports, was zu einer verstärkten Bewegung von Flüssigkeit aus dem Gefäß in den interstitiellen Raum führt (67,212,213). Ähnlich wie Bradykinin, welches seine Wirkung über den G<sub>q</sub>-gekoppelten B2-Rezeptor vermittelt (83), führt Histamin durch Aktivierung des G<sub>q</sub>-gekoppelten H1-Rezeptors zur vaskulären Hyperpermeabilität (214). Zudem ist bekannt, dass beide Mediatoren die Phosphorylierung von eNOS vermitteln und so die Bildung von NO fördern können. Während der NO-cGMP-Weg zu einer Entspannung der glatten Gefäßmuskelzellen und einer damit verbundenen Vasodilatation führt, kann NO auch das für die Ausbildung von AJs notwendige  $\beta$ -Catenin nitrosylieren und dadurch die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen stören (211). Bisherige Daten deuten jedoch darauf hin, dass die eNOS-vermittelte NO-Produktion eine vernachlässigbare Rolle bei der B2-vermittelten dermalen Extravasation in der Maus spielt (99). Jedoch wurden hierbei keine Daten zur Rolle von eNOS bei der Histamin-induzierten dermalen Extravasation aufgeführt. Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass die Signalgebung über COX-abhängige Signalwege zwar für die Bradykinin- jedoch nicht für die Histamin-induzierte dermale Extravasation relevant zu sein scheint (99). Vielmehr geben andere Daten aus Versuchen in Mäusen eher Hinweise darauf, dass die Induktion der Hyperpermeabilität durch Histamin im Wesentlichen auf eine eNOS-vermittelte Vasodilatation mit gesteigertem Blutfluss und Störung der Endothelbarriere zurückzuführen ist (214). Ältere Studien konnten zudem bereits einen synergistischen Effekt von Histamin auf die Bradykinin-vermittelte Extravasation von Evans Blue (hier bezeichnet als Azovan Blue) in der Haut von Ratten zeigen (215). Somit lässt sich nicht ohne Weiteres erklären, weshalb die gleichzeitige i. d. Anwendung von Bradykinin und Histamin in dieser Form des Miles Assay nicht zu einem synergistischen Effekt auf die dermale Extravasation führt. Ein Grund könnte jedoch sein, dass die Extravasation des Evans Blue-Albumin-Komplexes zum Erliegen kommt, sobald der Konzentrationsgradient bzw. kolloidosmotische Druck abnimmt und sich ein Gleichgewicht zwischen Plasma und interstitieller Flüssigkeit einstellt (216). Demnach sollte bei der Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung der Mediatoren ebenfalls eine Plateaubildung der Wirkung im Miles Assay festzustellen sein. Diese wurde im Vorfeld jedoch nur für



Bradykinin und bis zu einer i. d. Dosis von 2 nmol untersucht (99,170). Weitere Experimente zur Aufklärung dieses Sachverhalts sollten daher die Untersuchung höherer Dosen von Bradykinin bzw. der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Histamin im Miles Assay umfassen. Andersherum könnte die Kombination geringerer i. d. Dosen von Bradykinin und Histamin im Vergleich zu den einzelnen Substanzen diese These ebenfalls näher erleuchten.

## **4.2 Einfluss der Cyclooxygenase auf die Bradykinin-vermittelte Ödembildung in der Haut**

Angioödeme lassen sich allgemein in allergische (IgE-vermittelte) und nicht-allergische Formen, bei denen eine Vielzahl durch erhöhte Bradykininspiegel hervorgerufen werden, aufteilen (22). Akute Angioödemattacken, die mit Schwellungen der oberen Atemwege einhergehen und durch Beeinträchtigung der Atmung lebensbedrohlich sein können, stellen eine große Herausforderung dar, da in kürzester Zeit die Pathomechanismen erkannt werden müssen, um eine kausale Pharmakotherapie einzuleiten. Diese setzt sich daher im Notfall meist unabhängig von der Ätiologie initial aus der Verabreichung von Antihistaminika, Adrenalin und Glucocorticoiden zusammen. Allerdings hat sich dieses Behandlungsschema bei Patienten mit hereditärem bzw. nicht-allergischem Angioödem als nur begrenzt wirksam erwiesen (11). In Deutschland zugelassene Therapieoptionen, die Bradykinin-Signalwege direkt adressieren, sind die Substitutionstherapie mit C1-INH (217), der Plasmakallikrein-Antikörper Lanadelumab (57), der oral verfügbare Plasmakallikrein-Inhibitor Berotralstat (58) oder der B2-Rezeptor-Antagonist Icatibant (6). In den USA steht zusätzlich der rekombinante proteinbasierte Kallikrein-Inhibitor Ecallantid zur Verfügung (218). Jedoch beschränkt sich die Zulassung für alle diese Arzneimittel auf das HAE, welches wiederum meist mit einem Mangel an funktionsfähigem C1-INH, einem physiologischen Inaktivator des Plasmakallikreins, verbunden ist (28). Die häufigste Ursache nicht-allergischer Angioödeme stellen hingegen Nebenwirkungen von RAAS-Inhibitoren, insbesondere ACEi, dar, die auf einem verminderten Abbau von Bradykinin und der dadurch resultierenden Überaktivierung von B2 basieren (30). Die Hemmung des B2-Rezeptors würde daher auch hier einen rationalen Ansatz für die Therapie bilden, jedoch sind die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien über den Nutzen von Icatibant widersprüchlich. Icatibant hat sich in einer randomisierten klinischen Phase II-Studie bei zuvor unbehandelten Patienten mit ACEi-induziertem Angioödem als effektiv gegenüber Placebo gezeigt (90), wohingegen zwei weitere randomisierte Studien keine signifikante Wirksamkeit von Icatibant bei Patienten feststellen konnten, die mit Glucocorticoiden vorbehandelt wurden (219,220). Allerdings muss

berücksichtigt werden, dass die anfängliche pharmakologische Intervention mit Glucocorticoiden sowie der verzögerte Einsatz von Icatibant dessen Nutzen maskiert haben könnten. Das akute Bradykinin-induzierte Angioödem ist durch eine B<sub>2</sub>-Überaktivierung gekennzeichnet, jedoch ist nicht klar, welche Rolle nachgeschaltete Signalwege spielen. Die Bindung von Bradykinin an den endothelialen G<sub>q</sub>-gekoppelten B<sub>2</sub>-Rezeptor führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege. Dazu gehören die über PLC und IP<sub>3</sub> vermittelte Freisetzung intrazellulären Calciums, die Aktivierung der eNOS mit anschließender Bildung von NO sowie die Aktivierung von PLA<sub>2</sub>, die zur Synthese von Arachidonsäure und in der Folge auch der COX-abhängigen Prostanoiden führt (11).

Die Familie der Prostanoiden setzt sich aus den überwiegend biologisch aktiven PGs und TX zusammen. Sie sind Überträger von inter- und intrazellulären Signalen, die eine Vielzahl von Funktionen vermitteln wie unter anderem Entzündungsprozesse, Thrombozytenaggregation oder Vasokonstriktion und -relaxation (102). Da Prostanoiden im Körper nicht gespeichert werden, erfolgt die Synthese *de novo* aus Arachidonsäure, die nach Zellaktivierung, beispielsweise im Endothel durch Bradykinin und Thrombin, aus der Phospholipidmembran freigesetzt wird (108). Die Umsetzung von Arachidonsäure zu PGH<sub>2</sub> erfolgt substratgesteuert durch COX, die gebunden an die Membran des endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns vorliegen (121,122). Neuere Studien haben mittlerweile gezeigt, dass beide Isoformen, COX-1 und COX-2, sowohl unter physiologischen Bedingungen in menschlichen Geweben vorkommen als auch in verschiedenen pathologischen Zuständen hochreguliert werden können und somit die einfache Unterscheidung in konstitutiv exprimierte und induzierbare Isoform hinkt (128). Dafür benötigte zielgerichtete Untersuchungen zu den physiologischen Funktionen der beiden Isoformen wurden insbesondere durch Generierung entsprechender Knockout-Mausmodelle möglich (171,221). Doch auch die Entwicklung selektiver Inhibitoren der strukturell sehr ähnlichen COX-1 und COX-2 ebnete den Weg dahin (130,222). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation, die der Ausbildung Bradykinin-induzierter Angioödeme zu Grunde liegt, in Zusammenhang mit der Aktivität der COX steht (99,170). In dieser Arbeit wurde bei der Durchführung von Miles Assays in C57BL/6 ebenfalls beobachtet, dass die unspezifische Hemmung der COX-1 und COX-2 durch sowohl Ibuprofen (12 mg kg<sup>-1</sup> KG) als auch Diclofenac (5 mg kg<sup>-1</sup> KG) die B<sub>2</sub>-vermittelte dermale Extravasation durch Bradykinin und Labradimil im Vergleich zur Vehikelkontrolle deutlich reduziert (Abb. 24). Dies bestätigt die bereits erhobenen Daten von Bisha *et al.* (Diclofenac) (170) und Gholamreza-Fahimi *et al.* (Ibuprofen und Diclofenac) (99), bei denen in C57BL/6 eine vergleichbare Hemmung durch beide unspezifischen COX-Inhibitoren hervorgerufen wurde. Der Effekt konnte auch hier nicht für die Histamin-induzierte dermale Extravasation nachgewiesen werden, weswegen

davon ausgegangen werden kann, dass eine B2-vermittelte COX-Aktivierung entscheidend an der Extravasation beteiligt ist. Darüber hinaus wurde der Miles Assay auch in COX-1<sup>-/-</sup> durchgeführt. Es fiel besonders auf, dass der Effekt von Diclofenac in COX-1<sup>-/-</sup> nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zeigten COX-1<sup>-/-</sup> im Vergleich zu C57BL/6 unter Kontrollbedingungen eine deutlich verminderte dermale Extravasation nach B2-Aktivierung durch Bradykinin und Labradimil, wohingegen die Histamin-vermittelte Extravasation weiterhin unverändert war. Diese Befunde erweitern die bisherige Sichtweise auf die Rolle der COX für die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation dahingehend, dass allen Anschein nach COX-1 die entscheidende Isoform darstellt und ihre Aktivität essentiell für die weitere Signalgebung nach B2-Aktivierung ist. Der bereits zuvor im Miles Assay eingesetzte selektive COX-1-Inhibitor SC-560 (222) zeigte zwar ebenfalls eine signifikante Hemmung der B2-vermittelten dermalen Extravasation, allerdings war diese schwächer ausgeprägt als die Hemmung durch eine unspezifische COX-Inhibition mittels Ibuprofen oder Diclofenac (99). Jedoch ist hier anzumerken, dass die Anwendung von SC-560 aufgrund der erhöhten Toxizität nur in geringen Dosen möglich war und somit die maximale Wirkung unter Umständen nicht erreicht werden konnte.

Die Relevanz der COX-1 für die B2-induzierte dermale Extravasation konnte in weiteren Miles Assays, in denen die COX-2-selektiveren Inhibitoren Rofecoxib und Etoricoxib verwendet wurden, auf den ersten Blick nicht direkt bestätigt werden (Abb. 25). Anders als erwartet zeigten beide COX-2-Inhibitoren einen inhibierenden Effekt auf die Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation. Bei der Extravasation durch Labradimil war dies für Etoricoxib, jedoch nicht für Rofecoxib der Fall. Dies entspricht den Befunden anderer Miles Assays, bei denen der ebenfalls COX-2-selektivere Inhibitor Celecoxib zum Einsatz kam (99). Die Tatsache, dass alle verwendeten COX-2-spezifischen Inhibitoren nach B2-Aktivierung diese hemmende Wirkung auf die dermale Extravasation zeigten, könnte durch eine Restaffinität für die COX-1-Isoform erklärt werden. So ist beispielsweise die klinische Anwendung von Etoricoxib für Tageshöchst Dosen von bis zu 120 mg zugelassen, was in Bezug auf einen erwachsenen Menschen mit 80 kg KG einer Dosis von 1,5 mg kg<sup>-1</sup> KG entspräche (223). Im Gegensatz dazu übersteigt die im Mausmodell verwendete Dosis von 20 mg kg<sup>-1</sup> bei weitem die für den Menschen zugelassene Höchstdosis. Da die Selektivität von Arzneimitteln immer von der erreichten Konzentration an ihren Zielproteinen abhängt, ist es wahrscheinlich, dass die hohe Dosis von Etoricoxib die Selektivität abschwächt. Dieses Argument wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass die Hemmung der B2-vermittelten dermalen Extravasation durch Etoricoxib bei COX-1<sup>-/-</sup> nicht mehr nachweisbar war. Eindeutig zu prüfen wäre jedoch, ob der Knockout von COX-1 bzw. des *PTGS1*-Gens zu Ver-

änderungen bei der COX-2-Expression führt. Sollte diese dadurch kompensatorisch hochreguliert werden, entstünde Raum für die Annahme, dass Aufgaben der COX-1 durch COX-2 übernommen und ein Einfluss auf die B2-vermittelte dermale Extravasation nicht ausgeschlossen werden könnte. Allerdings hätte Etoricoxib in diesem Fall auch eine hemmende Wirkung bei COX-1<sup>-/-</sup> hervorrufen müssen, was nicht der Fall ist. Andere Studien deuten ebenfalls nicht darauf hin, dass die Expression von COX-2 in der Haut von COX-1-defizienten Mäusen verändert ist (224,225). Jedoch ist anzumerken, dass hier nur auf transkriptionaler Ebene argumentiert wird, sodass ein Nachweis auf Proteinebene durch beispielsweise Western Blots diese These noch bestätigen müsste. Weitere Klarheit über die Rolle der COX-2 könnte zudem durch die Wiederholung der Experimente in COX-2-defizienten Mäusen geschaffen werden. Dieses primär gesteckte Ziel musste jedoch bereits nach kurzer Zeit verworfen werden, da die Mauslinie einen Phänotyp aufweist, der durch die häufige Entwicklung einer tödlichen Nephropathie in einem jungen Alter von etwa 8 Wochen gekennzeichnet ist. Der Effekt von Rofecoxib könnte hingegen durch eine weitere pharmakologische Wirkung zustande gekommen sein. So wurde beschrieben, dass Rofecoxib die PGI<sub>2</sub>-Synthese direkt hemmen und so auch auf dieser Ebene in den PG-Stoffwechsel eingreifen kann (226). Jedoch scheint dies kein Klasseneffekt zu sein, da dieser Mechanismus für Celecoxib in dieser Studie nicht nachgewiesen werden konnte. Somit müsste für Celecoxib und wahrscheinlich auch für Etoricoxib, für das in diesem Zusammenhang keine Daten vorliegen, die Wirkung auf die B2-vermittelte dermale Extravasation im Miles Assay auf anderem Wege erklärt werden. Obwohl die Daten insgesamt eher für eine Beteiligung der COX-1 sprechen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach einer längeren Inkubationszeit von Bradykinin bzw. Labradimil, die COX-2-Expression induziert wird und auch diese Isoform in die Ödembildung eingreift. So zeigten Inkubationsversuche mit Bradykinin in humanen glatten Muskelzellen aus der Aorta (227) bzw. der Arteria pulmonalis (228) im anschließenden Western Blot nach 4 h bzw. nach 60 min einen signifikanten Anstieg der COX-2-Expression.

Es ist nicht ganz klar, inwiefern sich die neuen Erkenntnisse über die vornehmliche Bedeutung der COX-1- gegenüber der COX-2-Isoform für die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation bzw. das nicht-allergische Angioödem auf den Menschen übertragen lassen. Allerdings zeigte die ABRASE-Studie (A Bradykinin in Skin Edema Trial), bei der Probanden mit einer einmaligen Standarddosis des unspezifischen COX-Inhibitors Ibuprofen, des COX-2-selektiveren Inhibitors Etoricoxib oder Placebo behandelt wurden, ehe eine i. d. Injektion von Bradykinin in den Unterarm erfolgte, nur Effekte in der Ibuprofen-Gruppe (99). Dies deutet darauf hin, dass COX-2 bei der Entwicklung der Bradykinin-induzierten Extravasation auch in der menschlichen Haut eine untergeordnete Rolle spielen könnte, wobei

der Effekt von Ibuprofen in der Maus deutlich stärker ausgeprägt war. Jedoch wurden hier in Relation zum Körpergewicht weitaus höhere Dosen verwendet. Zudem wurden die Wirkstoffe i. p. appliziert, was zu einer schnelleren Resorption und damit kürzeren Zeit bis zum Erreichen der maximalen und insgesamt höheren Plasmakonzentration im Vergleich zur oralen Verabreichung führt (229). Jedoch könnte die nach B2-Aktivierung ablaufende Signalgebung in kleinen dermalen Blutgefäßen von Mäusen auch insgesamt stärker von COX abhängig sein als im Menschen. In großen murinen Blutgefäßen wie der Aorta hat sich beispielsweise gezeigt, dass Bradykinin nach B2-Aktivierung eine COX-abhängige Vasokonstriktion vermittelt, wobei jedoch keine Aussagen bezüglich der dominanten COX-Isoform getroffen werden konnten (170,230,231). Im Gegensatz dazu führte eine kontinuierliche Infusion von Bradykinin in die Arteria brachialis beim Menschen zu einer Vasodilatation sowie zu einer Erhöhung des Blutflusses im Unterarm, der durch den unspezifischen COX-Inhibitor Acetylsalicylsäure nicht gehemmt werden konnte (232). Da dieser erhöhte Blutfluss überwiegend von einer Vasodilatation der Widerstandsgefäße abhängt, wäre davon auszugehen, dass eine Bradykinin-vermittelte COX-Aktivierung in diesen Gefäßen von geringerer Bedeutung ist. Vielmehr zeigte eine weitere Studie, dass die unspezifische NOS-Inhibition mittels  $N^G$ -Monomethyl-L-Arginin die von der Arteria brachialis ausgehende Bradykinin-vermittelte Hyperämie im Unterarm hemmen kann (233). Wohlgermerkt erwies sich die eNOS-vermittelte NO-Produktion für die B2-induzierte Extravasation in den mikrovaskulären dermalen Gefäßen von Mäusen als weniger relevant (99), wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die nach B2-Aktivierung nachgeschaltete Signalgebung in Widerstandsgefäßen von der dermalen mikrovaskulären Signalgebung unterscheidet. Komplizierter wird dieser Sachverhalt mit Blick auf eine weitere Studie bei der in Widerstandsgefäßen des menschlichen Unterarms weder ein Einfluss von PG noch von NO nachgewiesen werden konnte (234). Die Bradykinin-induzierte Vasodilatation und der Blutfluss reduzierte sich hier allerdings durch Hemmung calciumabhängiger Kaliumkanäle und der damit verbundenen Hyperpolarisation der Gefäßwand, wodurch die Frage nach der Beteiligung von EDHFs in den Raum tritt. Eine Kombination verschiedener nachgeschalteter Signalwege nach B2-Aktivierung erscheint sogar sehr wahrscheinlich, da die dermale Extravasation durch COX-Inhibition in keinem der Versuche vollständig gehemmt werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Miles Assay angewandte Methodik, die sich auf die i. d. Injektion von Bradykinin konzentriert, nur Aspekte der Pathophysiologie des nicht-allergischen Angioödems abdeckt. Die Daten deuten jedoch darauf hin, dass in der Maus insbesondere die COX-1-Isoform erheblichen Einfluss auf die B2-vermittelte dermale Extravasation hat. Dennoch kann eine Beteiligung der COX-2, vor allem mit Blick auf

die im Miles Assay sehr kurze Inkubationszeit von Bradykinin und einer möglichen Induktion dieser Isoform, nicht ausgeschlossen werden. Ob diese Befunde auf den Menschen bzw. das nicht-allergische Angioödem übertragbar sind, ist nicht ganz klar, da Studien in verschiedenen Gefäßsystemen sowohl COX-abhängige als auch -unabhängige Signalwege nach B2-Aktivierung beschreiben und deren Anteil an der Ausprägung nicht-allergischer Angioödeme ungewiss ist. Dennoch ist die B2-Aktivierung ein entscheidender Schritt bei der Entwicklung nicht-allergischer Angioödeme (11) und die Daten deuten darauf hin, dass die COX-1-Aktivität zur Bradykinin-induzierten Extravasation beiträgt.

### 4.3 Einfluss der 5-LOX-abhängigen Cysteinyl-Leukotrienbildung

Leukotriene sind eine Gruppe biologisch hoch potenter Lipide, die als Mediatoren der Pathogenese entzündlicher und allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale und rheumatoider Arthritis gelten. Die Gruppe umfasst unter anderem die CysLTs LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>, die der Lage sind, glatte Muskulatur zu kontrahieren und die Gefäßpermeabilität zu erhöhen (235). Die Synthese erfolgt zunächst durch Umsetzung von Arachidonsäure zu LTA<sub>4</sub>. Hierfür essentiell ist die hauptsächlich durch Leukozyten exprimierte 5-LOX, deren Aktivität entscheidend von ihrem aktivierenden Protein FLAP abhängt (135,194). Daraufhin erfolgt die LTC<sub>4</sub>S-abhängige Konjugation von LTA<sub>4</sub> an Glutathion unter Bildung des CysLT LTC<sub>4</sub>, das genau wie seine Metabolite LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> seine Wirkung über die GPCRs CysLT1 und CysLT2 entfalten kann (236). CysLTs stehen im Zusammenhang mit der Auslösung pseudoallergischer Angioödeme, die weder einer allergischen noch Bradykinin-vermittelten Form zugeteilt werden können (11). Sie können als unerwünschte Arzneimittelwirkung von COX-Inhibitoren wie dem NSAR Acetylsalicylsäure auftreten. Es wird davon ausgegangen, dass die pseudoallergische Reaktion auf Acetylsalicylsäure durch die COX-Hemmung zustande kommt, wodurch das Substrat Arachidonsäure dem alternativen 5-LOX-Stoffwechselweg zugeführt und die vermehrte Bildung von CysLTs begünstigt wird („Leukotrien-Shift“)(237). Dementsprechend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Bildung von Leukotrienen in Reaktion auf die B2-Aktivierung zur dermalen Extravasation beiträgt. Zu diesem Zweck wurde der 5-LOX-Inhibitor Zileuton verwendet, der in den USA zur Behandlung von leichtem bis mittelschwerem Asthma bronchiale zugelassen ist (238). Im Miles Assay in C57BL/6 konnte jedoch kein Effekt von i. p. verabreichtem Zileuton (20 mg kg<sup>-1</sup> KG) auf die Bradykinin-, Labradimil oder Histamin-induzierte dermale Extravasation festgestellt werden (Abb. 26). Die gewählte Dosis des 5-LOX-Inhibitors orientierte sich an einer bereits publizierten Studie, bei der die Zymosan-induzierte Bildung diverser

5-LOX-abhängiger Stoffwechselprodukte wie LTB<sub>4</sub> und LTC<sub>4</sub> durch Zileuton (10 mg kg<sup>-1</sup> KG i. p.) im Plasma von Mäusen signifikant reduziert werden konnte (239). Somit sprechen die Daten nicht dafür, dass die Leukotrienbildung in Folge einer B2-Aktivierung zur dermalen Extravasation beiträgt. Studien in Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (240) und in CysLT2-defizienten Mäusen (36,241) deuten darauf hin, dass die Leukotrien-abhängige vaskuläre Hyperpermeabilität durch Aktivierung von CysLT2 vermittelt wird. Somit könnten Miles Assays, bei denen dieser Rezeptor beispielsweise durch den CysLT2-Antagonisten BayCysLT<sub>2</sub> gehemmt wird, diese Daten noch weiter stützen. In Mäusen erwies sich die Substanz im Miles Assay bei der Hemmung der dermalen Extravasation nach selektiver CysLT2-Aktivierung bereits als wirksam (242). Es ist bekannt, dass CysLTs in der Lage sind, die vaskuläre Endothelpermeabilität zu erhöhen und so zur Bildung von Angioödemem führen könnten (237). Wirkstoffe wie der 5-LOX-Inhibitor Zileuton oder der CysLT1-Antagonist Montelukast entfalten unter anderem ihre antiinflammatorische Wirkung durch Hemmung der Leukotrien-vermittelten vaskulären Hyperpermeabilität und damit verbundenen Immunzellinfiltration bei der Behandlung von Asthma bronchiale (243). In einer kleinen retrospektiven Studie mit Fokus auf Angioödem ohne Urticariabildung verschiedener Herkunft zeigte eine Kombination aus Antihistaminika und Montelukast einen entweder teilweisen oder vollständigen Rückgang der Ausprägung (244). Allerdings umfasste die Studie nur elf Probanden, wobei bei allen eine initiale Monotherapie mit Cetirizin erfolgte, ehe nach keiner Besserung der Symptomatik auf eine Kombination aus Cetirizin und Montelukast umgestellt wurde. Zusammengefasst gibt es jedoch insgesamt nur wenig Evidenz für eine B2-vermittelte Hochregulation der Leukotrienproduktion, die als Ursache für die Ausprägung von Angioödemem ausgemacht werden könnte. Die Daten aus dem Miles Assay, bei dem der 5-LOX-Inhibitor Zileuton die B2-vermittelte dermale Extravasation nicht reduzieren konnte, unterstützen diese These zusätzlich.

#### **4.4 Rolle der Cytochrom P450-vermittelten Bildung von Epoxyeicosatriensäuren**

Neben der Umsetzung durch COX oder 5-LOX kann Arachidonsäure auch durch CYP-Epoxygenasen metabolisiert werden. In Endothelzellen wandeln CYP2C- und CYP2J-Isoformen (vorwiegend CYP2C8, CYP2C9 und CYP2J2) Arachidonsäure in EETs um, die wichtige gefäßerweiternde Eigenschaften in Koronararterien und peripheren Gefäßsystemen vermitteln. EETs werden vom Endothel freigesetzt und relaxieren auf parakrinem Wege die glatten Gefäßmuskelzellen, indem sie unabhängig von NO und PGI<sub>2</sub> an der Öffnung von calciumabhängigen Kaliumkanälen beteiligt sind und so durch den

Ausstrom von Kalium zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führen (134). Daher werden sie auch als Endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) bezeichnet (195). Erste Beschreibungen der EETs zeigten, dass sie den Blutfluss in Mesenterialarterien erhöhen können (245), ehe dies auch in renalen, zerebralen und koronaren Gefäßen nachgewiesen werden konnte (246). Zudem konnten ihre vasodilatatorischen Effekte in weiteren Blutgefäßen von Nagetieren und anderen Säugetieren inkl. Menschen beobachtet werden (246,247). Ein Zusammenhang zwischen der vasodilatatorischen Wirkung von Bradykinin und EETs konnte bereits schon sehr früh in Organbadexperimenten mit Segmenten boviner und porciner Koronararterien festgestellt werden (248). In der Folge konnten Fisslthaler *et al.* zeigen, dass die Induktion von CYP2C8/34 in Endothelzellen porciner Koronararterien die Bildung von 11,12-EET erhöht, was mit Hyperpolarisation und Vasorelaxation verbunden war (249). Spätere *in vivo* Experimente deuteten auf eine Bradykinin-vermittelte, NO-unabhängige Vasodilatation in afferenten renalen Arterien hin, die mit der Freisetzung von EETs verbunden sein sollte (250,251). Um auch einen möglichen Einfluss von EETs auf die Bildung B2-vermittelter Angioödeme bzw. in kleinen dermalen Blutgefäßen der Haut zu untersuchen, wurden im Miles Assay verschiedene CYP-Inhibitoren eingesetzt, um die Epoxidierung von Arachidonsäure zu EET zu verhindern (196). Jedoch zeigten weder Sulfaphenazol ( $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ), welches mit hoher Affinität CYP2C9 aber auch weitere CYP2C-Isoformen wie CYP2C8 bzw. das dazu homologe porcine CYP2C34 hemmt und bereits erfolgreich zur Hemmung der Bildung von 11,12-EET verwendet wurde (249), noch die unselektiven CYP-Inhibitoren Ketoconazol ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) und Cimetidin ( $120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) einen Effekt auf die B2-vermittelte dermale Extravasation (Abb. 27). Die gewählten Dosen richteten sich nach bereits veröffentlichten Studien in Mäusen, bei denen nach *i. p.* Applikation der Substanzen nachweisliche Effekte beobachtet werden konnten, die auf eine gute Bioverfügbarkeit über diesen Applikationsweg schließen lassen (252-254). Somit deuten die Daten darauf hin, dass die Bildung von EETs nicht im Zusammenhang mit der B2-induzierten dermalen Extravasation steht. Allerdings kann nicht nachgewiesen werden, ob die Hemmung der verschiedenen CYP-Isoformen alle für die Bildung von EETs verantwortlichen Isoformen abgedeckt hat. Diese unterscheiden sich zudem von Spezies zu Spezies. Es konnte gezeigt werden, dass Mitglieder der in Säugetieren vorkommenden CYP-Unterfamilien CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2G, CYP2J, CYP2N und CYP4A *in vitro* zur EET-Biosynthese fähig sind (255). Mit den gewählten CYP-Inhibitoren Sulfaphenazol (CYP2C8/9), Ketoconazol (CYP3A4/5, CYP2C19, CYP1A2, CYP2D6) und Cimetidin (CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5) (196,256) konnten zwar viele Isoformen gehemmt werden, jedoch führt die Tatsache, dass die Substanzen nur einzeln und nicht in Kombination angewendet wurden, dazu, dass immer nur eine limitierte Auswahl der CYPs abgedeckt wurde. Zudem wurden wichtige



CYP-Isoformen wie die eingangs erwähnte CYP2J2 nicht oder zumindest nicht nachweislich gehemmt. Inhibitoren calciumabhängiger Kaliumkanäle wie Apamin oder Tetrabutylammonium konnten im Organbad die Bradykinin-vermittelte Vasorelaxation inhibieren (248). Eine Anwendung im Miles Assay könnte eventuell weitere Hinweise auf die Beteiligung von EDHFs liefern, ohne jedoch einen direkten Nachweis eines EET-Einflusses zu erbringen.

Insgesamt deuten die Daten allerdings nicht darauf hin, dass EETs wesentlich an der B2-vermittelten dermalen Extravasation in Mäusen beteiligt sind. Jedoch muss festgehalten werden, dass wichtige involvierte CYP-Isoformen in den Versuchen nicht erfasst worden sein könnten. Zudem unterscheiden sich die Isoformen, die für die Epoxidierung der Arachidonsäure zu EETs verantwortlich sind, in Maus und Mensch (134). Daher ist fraglich, ob die Befunde in dieser Form auf den Menschen übertragen werden können.

#### **4.5 Beteiligung vasodilatatorisch wirksamer Prostaglandine**

Nachdem die hier dargestellten Befunde deutlich dafürsprechen, dass COX-1 essentiell in der B2-vermittelten dermalen Extravasation involviert ist, wohingegen wenig Evidenz für die Beteiligung von 5-LOX oder CYPs vorliegt, wurde der Fokus der weiteren Arbeit auf die Identifikation der relevanten Prostanoiden gelegt. Nach der Umsetzung von Arachidonsäure durch die membrangebundene COX zu  $\text{PGH}_2$  (121,122), dient diese noch inaktive Verbindung im Cytoplasma als Substrat gewebsspezifischer und membranständiger Isomerasen und Oxidoreduktasen (oftmals einfacher als Synthasen bezeichnet) für die Produktion der biologisch hochaktiven  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$ . Prostanoiden werden von den meisten Zellen unseres Körpers gebildet und fungieren als auto- und parakrine Lipidmediatoren, die ihre Wirkung über die Aktivierung von GPCRs entfalten (108). Bislang bekannt sind die entsprechenden acht homologen Rezeptorsubtypen DP1, EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP und TP (141). Diese Rezeptoren können auf der Grundlage ihrer Signaltransduktion und Wirkung auf glatte Muskulatur vereinfacht in drei Kategorien eingeteilt werden: die relaxierenden  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren (DP1, EP2, EP4, IP), die konstringierenden  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren (EP1, FP, TP) und der hemmende  $G_i$ -gekoppelte Rezeptor EP3. Die relaxierenden Rezeptoren bzw. ihre physiologischen Agonisten  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGI}_2$  sind in der Lage, einen Anstieg von cAMP zu vermitteln und könnten so durch die resultierende Vasodilatation und Erhöhung der lokalen Hautdurchblutung zur Ödembildung in kleinen dermalen Blutgefäßen nach B2-Aktivierung beitragen (131). Es ist bereits bekannt, dass Bradykinin die Produktion von PGs in Endothelzellen verschiedener Herkunft stimu-

lieren kann (79). So konnte beispielsweise in Endothelzellen aus Schweinearterien festgestellt werden, dass nach Bradykinin-Inkubation die Konzentration von  $\text{PGI}_2$  im Zellmedium 30-fach erhöht war (257). Darüber hinaus konnte bereits eine Bradykinin-vermittelte Freisetzung von  $\text{PGE}_2$  in isolierten Hautpräparaten von Ratten nachgewiesen werden (258). Um festzustellen, welche PGs als Folge der COX-1-abhängigen  $\text{PGH}_2$ -Produktion im Hautgewebe von Mäusen bei der Aktivierung von B2 synthetisiert werden, wurden entsprechende Rezeptorantagonisten im Miles Assay verwendet (259). Eingesetzt wurden der DP1-Antagonist Laropiprant (synonym: MK-0524;  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) (260), der EP2-Antagonist PF-04418948 ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) (261), der EP4-Antagonist Grapiprant (synonym: CJ-023,423;  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) (262) und der IP-Antagonist RO1138452 ( $50 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) (263). In C57BL/6 führte die Hemmung von DP1, EP2 oder EP4 jedoch zu keiner Reduktion der B2- oder Histamin-induzierten dermalen Extravasation (Abb. 28). Im Gegensatz dazu konnte der IP-Antagonist RO1138452 sowohl die Bradykinin- als auch die Labradimil-vermittelte Extravasation in der Haut signifikant vermindern, wohingegen die Histamin-induzierte Extravasation weiterhin unverändert blieb (Abb. 29). Dieser Effekt konnte zudem auch nach dermalen Applikation von RO1138452 ( $0,1 \text{ mg pro i. d. Applikationsstelle}$ ) beobachtet werden. Auffallend war darüber hinaus, dass die Wirkung von RO1138452 in  $\text{COX-1}^{-/-}$  nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Zudem muss erwähnt werden, dass die B2-vermittelte Extravasation in der Haut wie in vorhergehenden Versuchen auch (Abb. 24, Abb. 25) in  $\text{COX-1}^{-/-}$  unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu C57BL/6 deutlich reduziert war. Um den Beitrag des physiologischen IP-Liganden  $\text{PGI}_2$  weiter zu bekräftigen, wurde der stabilere  $\text{PGI}_2$ -Metabolit 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  aus subkutanem Gewebe von C57BL/6 isoliert, identifiziert und quantifiziert. Durch Bestimmung dieses Metaboliten können indirekt Rückschlüsse auf die ursprüngliche  $\text{PGI}_2$ -Konzentration im Gewebe gezogen werden, da  $\text{PGI}_2$  über eine sehr kurze Halbwertszeit verfügt und daraufhin spontan und enzymunabhängig zu 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ , welches über eine deutlich längere Plasmahalbwertszeit von ca. 30 min verfügt, hydrolysiert wird (132). Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass nach B2-Aktivierung die Konzentration von 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  im Vergleich zur Behandlung mit PBS im Subkutangewebe stark erhöht war (Abb. 30). Die Vorbehandlung der Mäuse mit Diclofenac ( $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ KG i. p.}$ ) führte zu einer deutlichen Reduktion dieser Konzentration. Gleichermäßen konnten diese Effekte auch in HDMEC demonstriert werden (Abb. 31). Während die Inkubation mit Bradykinin ( $10 \mu\text{M}$ ) zu einer deutlichen Erhöhung der 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration im Zellkulturmedium führte, konnte Diclofenac ( $10 \mu\text{M}$ ) diese Wirkung nahezu vollständig und genauso effektiv wie der B2-Antagonist Icatibant ( $10 \mu\text{M}$ ) aufheben. Die ELISA-Befunde aus HDMEC konnten daraufhin zusätzlich mittels LC-MS/MS bestätigt und 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  eindeutig anhand seiner Masse ( $M = 370,5 \text{ g mol}^{-1}$ ) identifiziert werden. Die Daten liefern starke Nachweise dafür, dass die

B2-Aktivierung in kleinen dermalen Blutgefäßen von Mäusen mit einer COX-1-abhängigen PGI<sub>2</sub>-Freisetzung einhergeht. Leider konnte diese Hypothese aufgrund von Problemen bei der Zucht nicht durch Quantifizierung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in COX-1<sup>-/-</sup>, wo eine deutliche Reduktion der B2-abhängigen PGI<sub>2</sub>-Synthese erwartet werden würde, gefestigt werden. Studien von Kirkby *et al.* an COX-1- und COX-2-defizienten Mäusen deuteten bereits an, dass die physiologische Produktion von PGI<sub>2</sub> im kardiovaskulären System von COX-1 und nicht von COX-2 abhängen könnte (264). Die neuen Daten könnten diese Erkenntnis nun auch auf pathophysiologische Bedingungen ausweiten. Sie stehen in Einklang mit Ergebnissen aus anderen Studien. Bei Experimenten an IP-defizienten Mäusen konnte im Vergleich zum Wildtyp eine geringere dermale Extravasation als Reaktion auf eine kombinierte i. d. Injektion von Bradykinin und PGI<sub>2</sub> beobachtet werden (265). Limitierend ist hier jedoch zu erwähnen, dass die Autoren dieser Studie keine Behandlungen mit Bradykinin allein durchgeführt haben und so nicht in der Lage waren, die Effekte zu vergleichen und die potenzierende Wirkung von PGI<sub>2</sub> auf die Bradykinin-induzierte Extravasation in der Haut von Mäusen aufzuzeigen. In Kaninchen konnte zudem nach Perfusion mit Bradykinin durch die Aorta abdominalis und Vena cava inferior eine B2-vermittelte und durch Diclofenac hemmbare PGI<sub>2</sub>-Produktion und verminderte Ödembildung demonstriert werden (266). Es kann jedoch anhand der Daten aus dem Miles Assay nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere PGs an der Bradykinin-vermittelten dermalen Extravasation beteiligt sind. Die unselektive COX-Inhibition (Abb. 24) erzielte eine durchweg stärkere Hemmung der Permeabilität nach B2-Aktivierung als die IP-Blockade. Allerdings wurde keine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufgestellt, sodass nicht bekannt ist, ob der maximale Effekt bereits erzielt wurde. Zudem lagen zwar für den EP2-Antagonist PF-04418948 (267) und den DP1-Antagonist Laropiprant (268) zuverlässige Daten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung nach i. p. Applikation in Mäusen vor, allerdings konnte für den EP4-Antagonisten Grapiprant die gewählte Dosis nur anhand pharmakokinetischer Daten errechnet werden (262), sodass hier unter Umständen keine ausreichend hohen Konzentrationen am Rezeptor erreicht wurden, um die Wirkung von PGE<sub>2</sub> kompetitiv zu hemmen. Die Bedeutung von PGE<sub>2</sub> bei der Entstehung von Angioödemem bzw. der Erhöhung der vaskulären Permeabilität ist nicht ganz klar, da Studien PGE<sub>2</sub> sowohl eine protektive als auch potenzierende Wirkung nachsagen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass PGE<sub>2</sub> durch seine vier verschiedenen Rezeptoren EP1, EP2, EP3 und EP4 seine Effekte über eine Vielzahl von Signalwegen vermitteln kann. So ist bekannt, dass sowohl EP2- als auch EP4-Agonisten die Durchlässigkeit der Gefäße fördern können, indem sie die periphere Gefäßerweiterung und den lokalen Blutfluss verstärken (269). Bei der Untersuchung der Effekte von PGs in der Haut von Meerschweinchen, konnte gezeigt werden, dass PGE<sub>2</sub> die Bradykinin-vermittelte Extravasation potenzieren kann, obwohl PGE<sub>2</sub> alleine nur eine geringfügige Wirkung hat (270). Anhand von Untersuchungen

in der Haut von Kaninchen, wo der Effekt ebenfalls beobachtet werden konnte, wurde dieser Synergismus auf die gefäßerweiternde und damit durchblutungsfördernde Eigenschaft von  $\text{PGE}_2$  zurückgeführt (271). Andererseits konnte auch bereits beobachtet werden, dass die Aktivierung von EP4 in humanen mikrovaskulären Lungenendothelzellen die Barrierefunktion in Form der Hemmung der Neutrophilenwanderung verstärkt (272). Auf der anderen Seite sind EP3-Agonisten ebenfalls in der Lage, die vaskuläre Permeabilität zu hemmen und dies auch ohne einen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser und den Blutfluss zu nehmen (273). Die Interaktionen zwischen  $\text{PGE}_2$  und seinen Rezeptoren sind stark abhängig von Gewebe und Zelltyp, der spezifischen Rezeptorexpression und der Variation der Bindungsaffinitäten. EP1 und EP2 weisen beispielsweise eine geringere Affinität zu  $\text{PGE}_2$  auf als EP3 und EP4, sodass für die Aktivierung eine deutlich höhere lokale Konzentration des Liganden vorhanden sein muss (274). Diese Unterschiede können somit zu einer differentiellen Rezeptoraktivierung führen, wodurch  $\text{PGE}_2$  in der Lage ist, sehr unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Effekte auf die Zellfunktion in den verschiedenen Gewebetypen zu vermitteln. Demnach könnte die Rolle von  $\text{PGE}_2$  bei der B2-vermittelten Ödembildung auch auf einem Zusammenspiel der Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren basieren und wäre so zu komplex, als dass sie durch die einfache Hemmung jeweils nur eines Rezeptors exakt bestimmt werden könnte. Ähnlich wie für  $\text{PGI}_2$  könnte die Identifizierung und Quantifizierung von  $\text{PGE}_2$  sowie weitere Untersuchungen mit Kombinationen verschiedener  $\text{PGE}_2$ -Rezeptorantagonisten aber auch Rezeptorexpressionsanalysen diesen Sachverhalt näher veranschaulichen.

Nichtsdestotrotz geben die Befunde dieser Arbeit deutliche Anzeichen dafür, dass  $\text{PGI}_2$  das bedeutendste PG bei der Vermittlung der B2-induzierten dermalen Extravasation in Mäusen ist und in Folge der B2-Aktivierung vermehrt und in Abhängigkeit von COX-1 synthetisiert wird. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist nicht ganz klar. In der ABRASE-Studie wurde bereits festgestellt, dass die Hemmung der COX durch Ibuprofen die Größe und Dauer der Quaddeln bei freiwilligen Probanden nach i. d. Injektion von 2 nmol Bradykinin signifikant verringerte, jedoch wurden die beteiligten COX-Produkte nicht näher charakterisiert (99). Zudem konnten in einer kleinen Studie mit 24 Probanden, die eine initiale, antihypertensive Therapie mit 10 mg Ramipril pro Tag über vier bis sechs Wochen erhalten haben, bereits nach drei Tagen statistisch signifikant erhöhte Konzentrationen des stabileren  $\text{PGI}_2$ -Metaboliten 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  im Blutplasma gemessen werden (275). Diese gingen einher mit einer im Plasma nachgewiesenen, deutlich reduzierten Aktivität der ACE, dem Schlüsselenzym für den Abbau von Bradykinin. Durch Verwendung humaner dermalen Endothelzellen sollte jedoch eine Brücke zwischen den murinen und humanen Pathomechanismen gebaut werden und auch hier konnte eine Hochregulation von  $\text{PGI}_2$  in

Form der Bestimmung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> nach B<sub>2</sub>-Aktivierung eindeutig nachgewiesen werden. Jedoch unterscheiden sich die Einflüsse, denen Endothelzellen *in vivo* ausgesetzt sind, deutlich von denen in Zellkulturen. Faktoren wie beispielsweise der Blutfluss und Blutdruck, das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen oder auch die Wirkung endokriner Mediatoren werden nicht berücksichtigt. Daher können anhand der Zellkulturdaten auch keine direkten Rückschlüsse auf die Beteiligung des B<sub>2</sub>-vermittelten PGI<sub>2</sub> an der Erhöhung der vaskulären Permeabilität, die der Ausprägung von Angioödemem zu Grunde liegt, im Menschen gezogen werden. Dieser Prozess umfasst deutlich komplexere molekulare Mechanismen, wie die Öffnung endothelialer Zell-Zell-Verbindungen und der Steigerung des transzellulären Transports (67,212,213).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen insgesamt einen starken Beitrag von COX-1 abhängigem PGI<sub>2</sub> an der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation in Mäusen. Darüber hinaus zeigten Experimente an HDMEC, dass die Bildung von PGI<sub>2</sub> als Reaktion auf Bradykinin auch in menschlichen Endothelzellen stattfindet. Daher könnte die Identifizierung von PGI<sub>2</sub> als Schlüsselmolekül bei der Bradykinin-induzierten dermalen Extravasation die Tür für neue Behandlungsstrategien bei akuten medikamenteninduzierten nicht-allergischen Angioödemem wie z. B. ACEi-induzierten Angioödemem (6,90) öffnen. Die Entwicklung von Hemmstoffen der PGI<sub>2</sub>-Synthase (276) oder weiterer IP-Rezeptor-Antagonisten könnte dafür zielführend sein. Mehrere hochaffine Verbindungen wie RO1138452 oder das oral verfügbare RO3244794 wurden bereits erfolgreich in Tiermodellen für Osteoarthritis und entzündlicher Arthritis eingesetzt, bei denen Extravasation und Ödembildung zu beobachten sind (277). Im Gegensatz zur Akuttherapie könnte die Langzeittherapie zur Prävention von Angioödemem jedoch mit ausgeprägten Nebenwirkungen, die auch von selektiven und unselektiven COX-Inhibitoren bekannt sind, verbunden sein, beispielsweise schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt oder auch Herzversagen (278).

Auch wenn noch weitere Forschung insbesondere mit Blick auf die Mechanismen im Menschen von Nöten sind, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit den derzeitigen Wissensstand in Bezug auf die Signalwege nach der Aktivierung von B<sub>2</sub> in kleinen dermalen Blutgefäßen erweitern und auf einen wesentlichen Beitrag von COX-1-abhängigem PGI<sub>2</sub> zur dermalen Extravasation und zum Bradykinin-induzierten Ödem hinweisen.

## 4.6 Rolle der cPLA<sub>2</sub>α-abhängigen Arachidonsäurefreisetzung

Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit haben sich im Wesentlichen auf die Rolle von Arachidonsäure-Metaboliten bzw. der für ihre Biosynthese verantwortlichen Enzyme fokussiert. Die daraus hervorgegangenen Daten liefern eine hohe Evidenz für die COX-1-abhängige PGI<sub>2</sub>-Synthese als zentralen Schritt bei der Bradykinin-vermittelten Ödembildung in der Haut. Anhand dessen und mit Blick auf die gesamte Arachidonsäurekaskade liegt daher die Vermutung nahe, dass durch Hemmung der Bereitstellung von Arachidonsäure gleichermaßen eine Verminderung der B2-vermittelten dermalen Extravasation erreicht werden könnte, da dies zu einem Mangel des für die PG-Produktion notwendigen Substrats führen würde. Arachidonsäure wird zunächst entweder durch die Nahrung aufgenommen oder aus der essentiellen zweifach ungesättigten Fettsäure Linolsäure synthetisiert (279), ehe sie in Phospholipide der Membranen integriert werden kann (101). In Reaktion auf physiologische und pathologische Signale kann sie anschließend freigesetzt werden und als Substrat für die Umsetzung durch COX, 5-LOX oder CYP fungieren. Das Schlüsselenzym bei diesem entscheidenden Schritt ist die cPLA<sub>2</sub>α (synonym: cPLA<sub>2</sub>-4A), die anders als andere Acylhydrolasen der Gruppe IV PLA<sub>2</sub>-Familie aufgrund der besonderen Struktur des aktiven Zentrums eine Selektivität für Arachidonoylreste der Phospholipide aufweist (118). Dafür essentiell ist die Bindung von Ca<sup>2+</sup>, was zu einer Erhöhung der Membranaffinität führt und die Translokation des Enzyms vom Cytosol zu den Phospholipidmembranen des Golgi-Apparats, des Endoplasmatischen Retikulums oder des Nukleus initiiert, wo letztlich die Freisetzung der Arachidonsäure durch Hydrolyse der Esterbindung stattfindet (119,120).

Ähnlich wie ihr Substrat weisen bereits beschriebene Hemmstoffe der cPLA<sub>2</sub>α eine hohe Lipophilie auf. Der ausgewählte cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor SB296 ist in der Lage, das Enzym hochselektiv und mit hoher Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich zu hemmen (181), allerdings macht die geringe Bioverfügbarkeit der Substanz eine topische Anwendung notwendig. Die Substanz konnte auf diesem Applikationsweg bereits nachweislich die durch Benzalkoniumchlorid hervorgerufene Dermatitis und damit verbundene Schwellung im Mausmodell hemmen (182). Auf der Suche nach einem geeigneten Vehikel, in dem SB296 auch in höheren Konzentrationen gelöst und dermal aufgetragen werden konnte, zeigten Probeversuche mit reinem DMSO im Miles Assay einen deutlich verstärkenden Effekt auf die dermale Extravasation, der unabhängig von der i. d. applizierten Substanz war (Abb. 32). DMSO ist ein aprotisches Lösungsmittel, das die Permeabilität von Lipidmembranen erhöhen kann und als Permeationsbeschleuniger für topische oder transdermale Arzneiformen Anwendung findet (199). Mit Blick auf die Endothelbarriere können Moleküle diese auf verschiedenen Wegen passieren. Sie können transzellulär, beispielsweise durch

Kanäle oder Vesikel innerhalb einzelner Endothelzellen, oder durch Öffnung von Verbindungskomplexen parazellulär zwischen benachbarten Zellen transportiert werden. Größere Proteine wie Albumin sind unter physiologischen Bedingungen auf die aktive Transcytose angewiesen. Entzündungsmediatoren wie Bradykinin sind in der Lage, die endotheliale Integrität durch Störung der Organisation interendothelialer Verknüpfungen zu beeinträchtigen und die Endothelpermeabilität zu erhöhen, sodass auch größere Plasmaproteine das Gefäßlumen auf parazellulärem Weg verlassen können (12). Für DMSO konnten anhand molekulardynamischer Simulationen drei unterschiedliche und konzentrationsabhängige Wirkungsweisen an Lipiddoppelschichten beschrieben werden. Bei niedrigeren DMSO-Konzentrationen (bis 10 mol %) kommt es zu einer Auflockerung der Membran und Erhöhung der Membranfluidität. Höhere Konzentration (bis 40 mol %) können je nach Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht zur Porenbildung mit zunehmender Stabilität führen, ehe es schließlich darüber hinaus bei sehr hohen DMSO-Konzentrationen zu einer Auflösung der Doppelschicht kommen kann (280). Zudem konnten auch bereits vasodilatatorische Effekte für DMSO nachgewiesen werden (281), die den Blutfluss und dadurch die Extravasation noch weiter verstärken könnten. Da im Miles Assay DMSO in unverdünnter Form aufgetragen wurde, könnte es nach Überwindung der epidermalen Barriere auch in höheren Konzentrationen die mikrovaskulären dermalen Blutgefäße erreicht und dort die endotheliale Permeabilität gesteigert haben. Dies würde die deutlich erhöhte Evans Blue-Extravasation unter Kontrollbedingungen mit PBS erklären. Dennoch scheinen zelluläre Regulationsmechanismen der Endothelpermeabilität wie die Bradykinin- oder Histamin-vermittelte Hyperpermeabilität unter solchen Gegebenheiten nach wie vor zu funktionieren und die Extravasation noch weiter zu verstärken. Dies weist darauf hin, dass die Membranıntegrität der Endothelzellen, zumindest nach der für DMSO gewählten dermalen Einwirkzeit von 20 min, noch erhalten und die Aktivierung der transmembranen GPCRs möglich ist. In einer Studie mit Endothelzellen aus der bovinen Aorta konnte beobachtet werden, dass DMSO die PGI<sub>2</sub>-Produktion hemmt. Dieser Effekt konnte auf eine Verminderung der Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran zurückgeführt werden, wohingegen die COX-Aktivität nicht beeinflusst wurde (282). Dies könnte erklären, weshalb sich die gemessene Extravasation durch DMSO unter Kontrollbedingungen mit PBS und durch B<sub>2</sub>-Aktivierung ohne DMSO im Miles Assay nicht direkt addieren. Allerdings muss angemerkt werden, dass aufgrund des Fokus auf die Findung eines inerten Vehikels für die dermale Applikation von SB296 nur drei Einzelversuche stattgefunden haben, wodurch die Aussagekraft der Daten begrenzt ist.

Letztlich erwies sich MCT bzw. Neutralöl als geeignete Trägersubstanz, da das Öl einerseits den cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor SB296 in ausreichender Konzentration lösen konnte und andererseits keinen Einfluss auf die dermale Extravasation im Miles Assay gezeigt hat (Abb. 33). Für SB296 wurde nach dermalen Applikation eine zeit- (Abb. 34) und dosisabhängige (Abb. 35) Reduktion der B2-vermittelten Extravasation in der Haut beobachtet, die ihr Maximum nach 30 min und bei einer lokalen Dosis von 0,1 mg erreichte. Dies unterstreicht die besondere Position, die Arachidonsäure als Substrat nach B2-Aktivierung einnimmt. Die Extravasation durch Histamin wurde nicht beeinflusst, sodass weiterhin davon ausgegangen werden kann, dass Arachidonsäure und ihre Metabolite für diese Form der Ödembildung keine große Rolle spielt. Es ist wichtig, zu erwähnen, dass erneut keine vollständige Hemmung der Extravasation beobachtet werden konnte und diese sich auf einem ähnlichen Niveau wie die durch unselektive COX-Inhibition hervorgerufene Hemmung (Abb. 24) bewegte. Dies deutet darauf hin, dass die nach B2-Aktivierung freigesetzte Arachidonsäure zum wahrscheinlich überwiegenden Teil durch die substratgesteuerte COX (94) umgesetzt wird und bestätigt die bereits in dieser Arbeit vorgestellten Daten, die eine untergeordnete Rolle der 5-LOX (Abb. 26) und CYP-Enzyme (Abb. 27) impliziert haben.

Neben der direkten Hemmung durch selektive Inhibitoren ist bekannt, dass Glucocorticoide cPLA<sub>2</sub>α auf indirektem Wege hemmen können (162). Der damit verbundene Mechanismus, durch den diese Substanzklasse in der Lage ist, in den Arachidonsäure-Metabolismus einzugreifen, basiert auf der Hochregulation der Genexpression des physiologischen cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitors Annexin A1 (synonym: Lipocortin-1) (133). Annexine sind eine hochkonservierte Proteinfamilie, die in Abhängigkeit von Calcium an Phospholipide der Zellmembranen binden können (283). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich bei der Hemmung von cPLA<sub>2</sub>α nicht um einen Klasseneffekt der Annexine in Form einer Substratverarmung handelt (284), sondern die Enzyminhibition durch eine direkte Interaktion zwischen cPLA<sub>2</sub>α und Annexin A1 zustande kommt (285). Knockout-Mausmodelle lassen jedoch vermuten, dass eine Regulation von cPLA<sub>2</sub> durch Annexin A1 auch auf Expressionsebene stattfindet (286). Frühe Studien zeigten bereits, dass die Expression von Annexin A1 durch Dexamethason hochreguliert wird und das gebildete Protein fähig ist, cPLA<sub>2</sub>α zu hemmen (287,288), weshalb das synthetische Glucocorticoid auch im Miles Assay verwendet wurde. In diesem Versuch wurde Dexamethason in C57BL/6 bewusst in einer sehr hohen Dosis (100 mg kg<sup>-1</sup> KG i. p.) angewendet, die der Behandlung akuter symptomatischer Phasen entzündlicher Erkrankungen nachempfunden werden sollte (289). Bei Untersuchungen einer damals neu etablierten Annexin A1-defizienten Mauslinie konnte bei Carrageenin-induzierten Pfotenödemen bereits zwei Stunden nach i. p. Behandlung mit Dexamethason im



Vergleich zu Placebo im Wildtyp eine signifikante Hemmung der Ödemausprägung beobachtet werden. Da dieser Effekt bei Annexin A1-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Hemmung durch *de novo* gebildetes Annexin A1 zustande kam (286). Aufgrund der in der Studie beobachtbaren zeitlich steigenden Tendenz der Wirkung von Dexamethason wurde im Miles Assay zunächst eine Einwirkzeit von drei Stunden gewählt, ehe die dermale Extravasation induziert wurde. Es konnte eindrucksvoll beobachtet werden, dass Dexamethason in der Lage ist, die B2-vermittelte dermale Extravasation fast vollständig und vergleichbar effektiv wie der B2-Antagonist Icatibant (Abb. 23) zu hemmen, wohingegen die Histamin-induzierte Extravasation nicht signifikant reduziert wurde (Abb. 36C). Die Kombination aus Dexamethason und Icatibant konnte diesen Effekt zudem nicht weiter verstärken. Dieser Befund könnte richtungsweisend für die Therapie akuter Bradykinin-vermittelter Angioödeme sein, da der Einsatz von Glucocorticoiden bei nicht allergischen-Angioödemem bislang als nicht kausal und nur begrenzt wirksam angesehen wurde. Im Notfall werden Glucocorticoide wie Prednisolon in Kombination mit Antihistaminika und Adrenalin meist unabhängig von der Ätiologie initial verabreicht, da zunächst, vor allem wegen der deutlich höheren Inzidenz von ca. 85 %, von einem Angioödem allergischer Herkunft ausgegangen wird (11). Die hemmende Wirkung von Glucocorticoiden könnte auch erklären, weshalb in zwei randomisierten Studien keine signifikante Wirksamkeit von Icatibant bei Patienten mit ACE-Hemmer induziertem Angioödem, die mit Glucocorticoiden vorbehandelt wurden, festgestellt werden konnte, da deren Wirkung den Effekt des B2-Blockers maskiert haben könnte (219,220). Dennoch muss festgehalten werden, dass die Behandlung der Mäuse im Miles Assay bereits drei Stunden vor Bradykininexposition stattgefunden hat und nicht erst in der symptomatischen Phase der Ödembildung, die die Situation bei einem akuten Anfall eher widerspiegeln würde. Eine prophylaktische Einnahme von Glucocorticoiden über eine lange Zeit wäre hingegen mit ausgeprägten Nebenwirkungen wie Hypertonie, Osteoporose, Dyslipidämie und Diabetes verbunden (290). Um herauszufinden, ob Dexamethason auch bereits nach kürzerer Zeit Effekte auf die B2-vermittelte Ödembildung zeigt, wurde daher die Extravasation in weiteren Miles Assays nach 20 min (Abb. 36A) und 90 min (Abb. 36B) Einwirkzeit induziert. Während nach 20 min noch kein Effekt beobachtet werden konnte, zeigte sich nach 90 min eine signifikante Hemmung der Bradykinin- und Labradimil-, jedoch nicht der Histamin-induzierten Extravasation, die allerdings deutlich geringer ausgeprägt war als nach drei Stunden. Dies spricht dafür, dass die Wirkung von Dexamethason in dermalen Mikrogefäßen von Mäusen auf transkriptionalen Faktoren beruht und nicht auf einer direkten Hemmung oder Aktivierung bestimmter Zielproteine. Solche genomischen Effekte werden durch Bindung an intrazelluläre Glucocorticoidrezeptoren vermittelt, die nach Homodimerisierung in den Nukleus wandern und dort über Glucocorticoid-responsive Elements der DNA die Expression einer

Vielzahl von Genen regulieren (165). Dieser Befund ist deshalb so wichtig, weil immer mehr Studien auch auf nicht-genomische Mechanismen der Glucocorticoide hindeuten, die unabhängig von der Regulation der Transkription sind. So konnte bereits in humanen vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden, dass die Inkubation mit Dexamethason zu einer akuten, konzentrationsabhängigen Aktivierung der eNOS und damit verbundenen NO-Freisetzung führt, die auch in Form einer Dexamethason-induzierten NO-abhängigen Vasorelaxation von Aortaringen aus C57BL/6 im Organbad nachgewiesen werden konnte (291). In kleinen dermalen Blutgefäßen von Mäusen konnte sich der Effekt nicht bestätigen, da dies zu einer Erhöhung des Blutflusses und Steigerung der Endothelpermeabilität geführt hätte, die sich im Miles Assay bereits nach kurzer Einwirkzeit von Dexamethason in Form einer gesteigerten Bradykinin- und Labradimil-vermittelten Extravasation äußern würde. Zudem konnte in eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Veränderung der nach B2-Aktivierung hervorgerufenen dermalen Extravasation nachgewiesen werden (99).

Letztlich stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen Dexamethason in der Lage ist, eine solch starke Hemmung der B2-induzierten dermalen Extravasation zu bewirken. Es erscheint plausibel, dass die bereits beschriebene Hochregulation von Annexin A1 und die damit verbundene Hemmung von cPLA<sub>2</sub> (133) einen Teil dieses Effekts verursacht, indem die weitere Biosynthese COX-abhängiger PGs verhindert wird (163). Dies stünde in Einklang mit den Befunden dieser Arbeit, die PGs, allen voran PGI<sub>2</sub>, als wichtige Vermittler der B2-induzierten dermalen Extravasation identifiziert haben. Versuche mit einer neu eingeführten Annexin A1-defizienten Mauslinie, mit deren Hilfe die Rolle von Annexin A1 bei der Dexamethason-vermittelten Hemmung der dermalen Extravasation nach B2-Aktivierung näher definiert werden könnte, stehen noch aus. Jedoch geht die Hemmung weit über die durch direkte cPLA<sub>2</sub>-Inhibition mit SB296 beobachtbare Wirkung hinaus. Die neuen Daten bestätigen eine bereits ältere Studie, die zeigen konnte, dass die Vorbehandlung mit Dexamethason die Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation an Ohren von Mäusen inhibiert (292). Hier wurde die Hautreaktion nach Einwirkzeiten zwischen 0,5 und 24 h induziert, wobei die stärkste Hemmung nach einer Wirkdauer von 6 h festgestellt werden konnte. Allerdings wurden neben Bradykinin auch fünf weitere Entzündungsmediatoren, inkl. Histamin, untersucht und bei allen führte die Vorbehandlung mit Dexamethason zu einer deutlichen Inhibition der dermalen Extravasation. Weshalb jedoch im Miles Assay keine signifikante Veränderung der Histamin-induzierten Extravasation festgestellt werden konnte, ist nicht eindeutig zu erklären. Glucocorticoide werden zwar bei allergischen Reaktion eingesetzt, bei denen Histamin als wichtiger Mediator fungiert, allerdings basiert hier die Wirkung auf der Hemmung der IgE-vermittelten Histaminfreisetzung aus Mastzellen (162). Bei einem bereits vorhandenen lokalen Überschuss von Histamin, wie er beispielsweise beim Miles

Assay hervorgerufen wird, müssten somit andere Mechanismen für die Hemmung verantwortlich sein. Auffallend ist jedoch, dass in der Studie von Inagaki *et al.* (292), anders als im Miles Assay dieser Arbeit, die verschiedenen Entzündungsmediatoren anhand ihrer Masse dosiert und dadurch keine vergleichbaren Stoffmengen appliziert wurden. Es könnte sein, dass unter anderen Versuchsbedingungen auch im Miles Assay eine Reduktion der Histamin-induzierten Hyperpermeabilität in der Haut festgestellt werden könnte. Nichtsdestotrotz deutet vieles darauf hin, dass ein Teil der durch Dexamethason hervorgerufenen Hemmung der B2-vermittelten dermalen Extravasation auch auf nicht selektiven Mechanismen beruht, die auch die Inhibition der Histamin-, CysLT- oder Serotonin-vermittelten dermalen Hyperpermeabilität erklärt (292). So wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass Glucocorticoide direkt an den Endothelzellen wirken und die Öffnung der Zell-Zell-Verbindungen, durch die ermöglicht wird, dass auch größere Plasmaproteine auf parazellulärem Weg ins Interstitium übergehen können, verhindern (293-295). Da die Wirkung von Dexamethason im Miles Assay erst nach 90 min bzw. 3 h beobachtet werden konnte (Abb. 36), ist jedoch davon auszugehen, dass der Effekt auf der Regulation der Genexpression bestimmter Proteine basiert und damit genomischer Natur ist. Es konnte beispielsweise bereits gezeigt werden, dass Glucocorticoide die Expression von AJ-Proteinen wie VE-Cadherin, welches möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion an interzellulären Verbindungen spielt, modulieren können (296).

Es stellt sich abschließend die Frage nach der Übertragbarkeit der Befunde auf den Menschen. Bei allergischen Erkrankungen wie dem IgE-vermittelten Angioödem bilden Glucocorticoide neben Antihistaminika eine wichtige Säule in der Akuttherapie (11). Nachweise der Effektivität bei nicht-allergischen Angioödemem gibt es jedoch bislang nicht. Daher könnte die weitere Untersuchung einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der Therapie Bradykinin-vermittelter Angioödeme leisten, da Glucocorticoide eine effektive und kostengünstige Therapieoption darstellen könnten (297). In Anlehnung an die ABRASE-Studie, bei der bei freiwilligen Probanden nach oraler Verabreichung von Ibuprofen eine Hemmung der durch Bradykinin hervorgerufenen Quaddelbildung beobachtet wurde (99), könnte ein ähnliches Studiendesign mit oraler Einnahme von Dexamethason die Daten aus dem Tierversuch untermauern. Solch eine Studie befindet sich zurzeit bereits in Planung. Letztlich muss sich zeigen, ob Glucocorticoide die Ausprägung akuter Bradykinin-vermittelter Angioödeme, wie sie beispielsweise im Rahmen der Therapie mit ACEi auftreten können (30), reduzieren. Die Daten aus dem Tierversuch lassen vermuten, dass die Wirkung erst in hohen Dosen und verzögert eintreten könnte, sodass im akuten Notfall die Therapie so schnell wie möglich initialisiert werden müsste. Eine dauerhafte prophylaktische Behandlung mit hochdosierten Glucocorticoiden, die bei einer chronischen Einnahme von RAAS-

Inhibitoren in Erwägung gezogen werden müsste, wäre mit starken Nebenwirkungen verbunden und würde sich als wenig zielführend erweisen (165).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die neuen Befunde darauf hindeuten, dass Dexamethason in der Lage ist, die B<sub>2</sub>-vermittelte dermale Extravasation, die die pathophysiologische Grundlage für die Bildung Bradykinin-induzierter Angioödeme im Menschen bildet (11), mit einer ähnlichen Effektivität wie der B<sub>2</sub>-Antagonist Icatibant zu hemmen. Allerdings sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht gänzlich verstanden und erfordern weitere Forschung auf diesem Gebiet. Dennoch ist es möglich, dass die neuen Erkenntnisse den Blick auf die Verwendung von Glucocorticoiden bei der Behandlung nicht-allergischer Angioödeme verändern, da sie sich als kausale Therapieoption erweisen und eine günstige und effektive Alternative zu Icatibant darstellen könnten.

#### **4.7 Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression in der Haut**

Die DNA-Microarray-Analyse wurde durchgeführt, um zu untersuchen, welchen Einfluss die Vorbehandlung mit Dexamethason auf die Genexpression in der Haut von Mäusen nimmt. Ziel war es, Proteine zu identifizieren, deren Regulation im Zusammenhang mit der im Miles Assay beobachteten starken inhibitorischen Wirkung von Dexamethason auf die B<sub>2</sub>-induzierte dermale Extravasation stehen könnten. Die Daten aus dem Miles Assay deuteten darauf hin, dass der Effekt auf genomische Faktoren zurückzuführen sein könnte, da erst nach einer Wirkdauer von 3 h eine maximale und fast vollständige Hemmung beobachtet werden konnte (Abb. 36). Für die Genexpressionsanalyse wurden dementsprechend C57BL/6 mit Dexamethason (100 mg kg<sup>-1</sup> KG i. p.) oder Vehikel vorbehandelt und nach 3 h euthanasiert. Daraufhin wurde das dorsale Subkutangewebe isoliert, die enthaltene mRNA aufgereinigt und nach entsprechender Aufbereitung mittels Microarray analysiert. Basierend auf vorangegangenen Befunden wurde der Fokus bei der Auswertung der Microarray-Daten insbesondere auf Proteine gelegt, die im Arachidonsäure-Metabolismus involviert sind. Darüber hinaus wurden weitere plausible Proteine näher betrachtet, wie bekannte Bradykinin-degradierende Enzyme, wichtige Schlüsselproteine der Bradykinin-Signalgebung und auch Junction-Proteine, die an der Regulation der Endothelpermeabilität beteiligt sein könnten.

Ein vielversprechendes Protein ist Annexin A1, das nachweislich durch Glucocorticoide hochreguliert wird und als physiologischer cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor die Arachidonsäurefreisetzung inhibieren kann (162). Anders als erwartet zeigte sich jedoch eine reduzierte Genexpression

nach Vorbehandlung mit Dexamethason (Abb. 37). Auch bei der Quantifizierung auf Proteinebene mittels Western Blot konnte in denselben subkutanen Gewebeproben keine signifikant erhöhte Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 39). Der mögliche Grund dafür zeigt bereits eine Limitation des in dieser Arbeit gewählten Versuchsaufbaus. Das Subkutangewebe besteht aus diversen Zellarten wie Fibroblasten und Adipozyten und weist eine Vielzahl verschiedener Immunzellen auf, die das Eindringen von Krankheitserregern durch die Haut verhindern sollen. Es ist durchspannt mit Kapillaren und post-kapillären Gefäßen, die die Versorgung der Zellen aufrechterhalten. Diese bestehen wiederum aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen, denen im Rahmen der Endothelpermeabilität ein besonderes Augenmerk zukommt (298). Die Zellen verfügen über verschiedene Expressionsmuster (299), sodass sich die erwartete regulatorische Wirkung von Dexamethason eventuell nicht im analysierten Transkriptom der zellulär inhomogenen Gewebeproben widerspiegelt. Neben Annexin A1 wurde auch das Zielprotein cPLA<sub>2</sub>α untersucht. Das Enzym wird in Zellen aller murinen und humanen Gewebe exprimiert und weist eine 95%ige Sequenzidentität auf, die auf eine ähnliche Funktion und Regulation in beiden Organismen schließen lassen (300). Die Microarray-Analyse zeigte eine signifikante Hemmung der Genexpression, die durch Vorbehandlung mit Dexamethason hervorgerufen wurde (Abb. 40A). In Experimenten mit humanen Fibroblasten und Epithelzellen der Lunge konnte bereits beobachtet werden, dass Dexamethason die Expression von cPLA<sub>2</sub>α reduzieren kann, allerdings nur indirekt durch Hemmung der Expression der proinflammatorischen Cytokine IL-1β, TNF-α und IFN-γ, die dazu fähig sind, cPLA<sub>2</sub>α zu induzieren (202). Während TNF-α (*TNFSF2*-Gen) auf dem Microarray-Genchip nicht abgebildet wurde, konnte für IL-1β eine reduzierte Expression nachgewiesen werden (Abb. 40B), wohingegen IFN-γ keine signifikante Veränderung zeigte (Abb. 40C). Jedoch stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß die transkriptionale Hemmung der Cytokine einen Einfluss auf die Expression von cPLA<sub>2</sub>α nehmen kann, da diese Proteine zunächst synthetisiert werden müssen, ehe sie die Transkription von cPLA<sub>2</sub>α induzieren können. Somit ist nicht auszuschließen, dass Dexamethason in Subkutangewebe von Mäusen in der Lage ist, die cPLA<sub>2</sub>α-Expression auch direkt zu regulieren. Dies würde den Effekt von Dexamethason auf die B2-vermittelte dermale Extravasation zwar nicht vollständig erklären, jedoch könnte dieser Mechanismus die direkte cPLA<sub>2</sub>α-Hemmung durch vermehrt exprimiertes Annexin A1 verstärken und so die COX-abhängige PG-Synthese durch Erschöpfung der Bereitstellung von Arachidonsäure weiter limitieren.

Die Genexpressionsanalysen umfassten auch Untersuchungen von Enzymen und Rezeptoren, die für die Biosynthese, Wirkung und den Abbau von Prostanoiden verantwortlich

sind. COX wandelt Arachidonsäure über das instabile PGG<sub>2</sub> zu PGH<sub>2</sub> um, welches im Anschluss durch entsprechende PG-Synthasen zu den bioaktiven PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> oder PGI<sub>2</sub> bzw. durch die TXA-Synthase zu TXA<sub>2</sub> umgesetzt wird. Diese vermitteln ihre Wirkung über die GPCRs DP1 und 2, EP1-4, FP, IP und TP ehe die Inaktivierung zum großen Teil nicht-enzymatisch oder nach Wiederaufnahme in die Zelle durch Oxidation mittels 15-HPGD erfolgt (131,138). Es zeigte sich, dass die Genexpression von COX-2 im Subkutangewebe nach Dexamethason-Behandlung reduziert wurde, wohingegen kein signifikanter Effekt auf COX-1 feststellbar war (Abb. 41). Verschiedene Studien deuteten bereits darauf hin, dass die ursprüngliche Hypothese, wonach COX-1 die konstitutiv exprimierte und COX-2 die induzierbare Isoform ist, in der Form nicht korrekt ist (128). Die Microarray-Daten können dies zusätzlich belegen, da auch unter Kontrollbedingungen die Genexpression von COX-2, zumindest auf Transkriptionslevel, deutlich nachgewiesen werden kann. In diversen Zelltypen konnte bereits gezeigt werden, dass Glucocorticoide in der Lage sind, die Induktion von COX-2 als Reaktion auf verschiedene Entzündungsstimuli wie Lipopolysaccharide zu unterdrücken (301), jedoch konnten keine Studien zur inhibitorischen Wirkung auf die basale Expression gefunden werden. Die Daten aus dem Miles Assay dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass COX-1 die wesentliche Isoform darstellt, die in der B2-Signalgebung im Rahmen der dermalen Extravasation beteiligt ist. Allerdings wurde hier nur die akute Phase der Bradykinin-Exposition (30 min) betrachtet und es ist nicht klar, inwiefern die Induktion von COX-2 darüber hinaus noch involviert sein könnte. Dennoch sprechen die Befunde nicht dafür, dass die Hemmung der COX-2-Expression der entscheidende Wirkmechanismus hinter dem inhibitorischen Effekt von Dexamethason auf die B2-vermittelte Extravasation in der Haut von Mäusen darstellt. Neben COX wurde auch die Genexpression von PGDS, PGES, PGIS und TXAS analysiert (Abb. 42). Hierbei resultierte eine Verminderung der Expression von PGES und TXAS, wohingegen PGDS und PGIS nicht signifikant beeinflusst wurden. Ein Mangel an TXAS könnte zu einer reduzierten Bildung von TXA<sub>2</sub> führen. Eine Studie hat zwar gezeigt, dass TXA<sub>2</sub> die Endothelpermeabilität durch Hochregulation von Interleukin-8 erhöhen kann (302), jedoch ist es neben seiner thrombozytenaggregierenden Eigenschaften insbesondere auch als potenter Vasokonstriktor bekannt (303). Eine Hemmung würde somit den lokalen Blutfluss erhöhen und sich förderlich auf die Ödembildung auswirken. Im Gegensatz dazu bildet PGES PGE<sub>2</sub>, welches durch Aktivierung von EP2 und EP4 selbst zu einer Vasodilatation und Steigerung der Durchblutung führen kann (269). Diese Eigenschaften können nachweislich die Bradykinin-vermittelte dermale Extravasation potenzieren (270,271), sodass ein Einfluss von PGE<sub>2</sub> bzw. der verantwortlichen PGES auf die hemmende Wirkung von Dexamethason plausibel erscheint. Zudem ist bereits beschrieben, dass das auch als mikrosomale PGES-1 bezeichnete Enzym induzierbar ist und diese Induktion durch Glucocorticoide gehemmt werden

kann (304). Obwohl Miles Assays mit EP2- und EP4-Antagonisten in dieser Arbeit nicht darauf hingedeutet haben, konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass auch PGE<sub>2</sub> eine Rolle bei der B2-induzierten dermalen Extravasation in Mäusen spielt. Andererseits zeigte sich im Microarray nur eine tendenzielle Hemmung der PGIS-Expression, obwohl die Miles Assays auf eine starke Beteiligung von PGI<sub>2</sub> hinweisen. Gleichmaßen deuten die Microarray-Daten nicht darauf hin, dass Dexamethason die Expression der verschiedenen PG-Rezeptoren (Tab. 10), des PG-Carriers PGT (Abb. 43A) oder des inaktivierenden Enzyms 15-HPGD (Abb. 43B) beeinflusst, woraus sich eine reduzierte PG-Wirkung nach B2-Aktivierung hätte herleiten lassen können. Letztlich liefert die Genexpressionsanalyse jedoch nur Erklärungsansätze, die insbesondere durch die zelluläre Inhomogenität der Proben kritisch betrachtet werden muss. Die Expression der verschiedenen Synthesen müsste zusätzlich insbesondere in mikrovaskulären Endothelzellen untersucht werden, wo die für die Endothelpermeabilität verantwortliche B2-Aktivierung und PG-Produktion, wie in der Literatur beschrieben (79) und auch in dieser Arbeit an Experimenten mit HDMEC für PGI<sub>2</sub> nachgewiesen, stattfindet.

Neben COX und ihrer PGs lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Untersuchung anderer Arachidonsäure-Metaboliten, den Leukotrienen und EETs. Während für CysLTs erwiesen ist, dass sie die Endothelpermeabilität erhöhen können (194), sind EETs als EDHFs in der Lage, Gefäße zu dilatieren und den Blutfluss zu erhöhen (195). Miles Assays mit Inhibitoren von 5-LOX (Abb. 26) und verschiedenen CYP-Enzymen (Abb. 27) deuteten nicht darauf hin, dass diese Stoffwechselprodukte entscheidend an der Bradykinin-vermittelten dermalen Extravasation in Mäusen beteiligt sind. Im Microarray konnte allerdings gezeigt werden, dass Dexamethason im Subkutangewebe die Expression verschiedener, an der CysLT-Signalgebung beteiligten Proteine (FLAP, LTCS4 und CysLT1) reduzieren kann (Tab. 11). FLAP ist ein Aktivator der 5-LOX und essentiell für die Leukotriensynthese aus Arachidonsäure, wohingegen LTCS4 das zunächst gebildete LTA<sub>2</sub> zum hochaktiven CysLT LTC<sub>4</sub> umsetzt, welches CysLT1 und CysLT2 aktivieren kann (203). Hemmstoffe der Leukotrienbildung oder -wirkung sind bekannt für ihre Anwendung bei Asthma bronchiale, welches auch mit einer endothelialen Hyperpermeabilität einhergeht (243). Obwohl Glucocorticoide essentiell für die Pharmakotherapie von Asthma bronchiale sind, deuten viele Studien jedoch darauf hin, dass sie hier nur einen geringen Einfluss auf die Produktion und Aktivität von CysLTs haben (305). Andere Studien lassen zudem vermuten, dass die vasculäre Hyperpermeabilität durch Aktivierung von CysLT2 vermittelt wird, dessen Expression durch Dexamethason nicht entscheidend gehemmt wurde (36,240,241). Mit zusätzlichem Blick auf die Daten aus dem Miles Assay mit dem 5-LOX-Inhibitor Zileuton ist fraglich, ob

die hier beobachtete Regulation der Leukotriene durch Dexamethason einen entscheidenden Einfluss auf die B<sub>2</sub>-vermittelte dermale Extravasation hat. Gleichermäßen fraglich ist die Beeinflussung von EETs durch Dexamethason. Es wurden die Unterfamilien CYP2C und CYP2J betrachtet, deren Mitglieder in der Lage sein sollen, EETs durch Epoxidierung von Arachidonsäure zu synthetisieren (204). Einzig die Expression von CYP2J9 wurde durch Dexamethason signifikant vermindert, allerdings zeigten Experimente, dass diese Isoform primär als Hydroxylase fungiert (306). Es lässt sich insgesamt anhand dieser Daten jedoch nur bedingt sagen, ob Dexamethason Einfluss auf die EET-Produktion nehmen kann, da der verwendete Microarray-Chip nur eine überschaubare Auswahl an CYP-Isoformen abgebildet hat. Ein erhöhter Abbau von EETs durch Hochregulation der verantwortlichen Epoxidhydrolasen (205) erscheint als Erklärung für die Wirkung von Dexamethason auf die B<sub>2</sub>-vermittelte Extravasation hingegen unwahrscheinlich (Tab. 14).

An der Bradykinin-Signalgebung sind viele Rezeptoren, Enzyme und andere proteinbasierte Second messenger beteiligt, durch deren Regulation die Wirkung von Bradykinin auf die Endothelpermeabilität beeinflusst werden könnte. Bei der Genexpressionsuntersuchung dieser Proteine konnte nur für PKG1 eine hemmende Wirkung durch Dexamethason festgestellt werden. PKG ist eine cGMP-abhängige Kinase, die nach B<sub>2</sub>-Aktivierung in Endothelzellen NO-vermittelt in der benachbarten glatten Gefäßmuskulatur insbesondere für die Phosphorylierung von Proteinen, die den intrazellulären Calciumspiegel kontrollieren, verantwortlich ist. Die Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration führt letztlich zu einer Vasodilatation (93,95). Es stellt sich die Frage, wie relevant die Signalgebung über PKG für die B<sub>2</sub>-vermittelte Extravasation in kleinen dermalen Blutgefäßen von Mäusen ist. Frühere Miles Assays mit eNOS-defizienten Mäusen haben bereits gezeigt, dass nicht eNOS-vermitteltes NO sondern die COX-abhängige PG-Produktion entscheidend für die dermale Extravasation nach B<sub>2</sub>-Aktivierung ist (99). NO führt über Aktivierung der sGC zu einem Anstieg von cGMP, welches essentiell für die Aktivität der PKG ist (95). Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten vorherige Befunde dahingehend bestätigen, dass COX-1-abhängiges PGI<sub>2</sub> ein entscheidender Faktor für die B<sub>2</sub>-Signalgebung zu sein scheint. Anders als NO kann PGI<sub>2</sub> an der glatten Gefäßmuskulatur über G<sub>s</sub>-gekoppelte IP-Rezeptoren die cAMP-Bildung erhöhen und PKA-vermittelt zur Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration und Vasodilatation führen (95). Somit deutet vieles darauf hin, dass dieser Signalweg, in den Glucocorticoide über Hemmung der PG-Produktion eingreifen können, der relevantere ist und eine transkriptionale Hemmung der PKG-Signalgebung nicht entscheidend zur beobachteten inhibitorischen Wirkung von Dexamethason beiträgt. Ein weiterer relevanter Mechanismus zur Regulation der B<sub>2</sub>-Aktivität ist die Rezeptordesensibilisierung durch Arrestine. Nach Bindung von  $\beta$ -Arrestin an B<sub>2</sub> kommt es zu einer Internalisierung des



gebildeten Komplexes in Endosomen, sodass keine Aktivierung durch Bradykinin stattfinden kann (97). Es konnte bereits in humanen Lungenadenokarzinomzellen gezeigt werden, dass Dexamethason die Expression von Arrestinen verändert (307). In den murinen Subkutangewebeproben konnte jedoch nach Vorbehandlung mit Dexamethason nur eine Reduktion der Expression von sowohl  $\beta$ -Arrestin-1 als auch -2 festgestellt werden (Tab. 16), was eine verminderte Bradykinin-Wirkung nicht erklären würde.

Während sich bisherige Betrachtungen auf nachgeschaltete Signalwege nach B<sub>2</sub>-Aktivierung konzentrierten, könnte die Regulation der Genexpression von Peptidasen, die dazu befähigt sind, Bradykinin abzubauen, mögliche Effekte von Dexamethason auf Basis einer verminderten Bradykinin-Konzentration erklären. Bradykinin verfügt aufgrund des Abbaus durch ACE und andere Peptidasen bereits über eine sehr kurze Halbwertszeit (206). Eine Hochregulation solcher Enzyme könnte diese jedoch noch weiter senken. Die Vorbehandlung der Mäuse mit Dexamethason führte allerdings zum gegenteiligen Effekt und reduzierte die Expression von ACE und DPP4 (Tab. 17). ACE wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (308), jedoch insbesondere auf der luminalen Endotheloberfläche pulmonaler Blutgefäße (309). Der Befund aus dem murinen Subkutangewebe deckt sich nicht mit Studien, die eine Hochregulation der Expression von ACE durch Glucocorticoide, unter anderem in Endothelzellen, beschreiben (310-312). Gleichermaßen konnte auch bereits eine Glucocorticoid-vermittelte Hochregulation von DPP4 beschrieben werden, jedoch in Makrophagen (313). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass Dexamethason im Miles Assay die Bradykinin- und Labradimil-vermittelte dermale Extravasation gleichermaßen effektiv gehemmt hat (Abb. 36). Labradimil (synonym: RMP-7, Cereport<sup>®</sup>) ist ein B<sub>2</sub>-Agonist, der ursprünglich entwickelt wurde, um die Bluthirnschranke permeabler für Wirkstoffe zu machen und eine höhere proteolytische Stabilität als Bradykinin aufweist (179). Demnach hätte die Labradimil-induzierte Extravasation eine weniger starke Hemmung erfahren müssen, sofern die Wirkung von Dexamethason auf einer vermehrten Expression Bradykinin-abbauender Enzyme basieren würde. In Anbetracht dessen und mit Blick auf die Microarray-Daten, scheint es unwahrscheinlich, dass die Wirkung von Dexamethason auf diesem Wege zustande gekommen ist.

Die Stabilität und Permeabilität der Blutgefäßwand hängt zu einem überwiegenden Teil von den endothelialen Zell-Zell-Verbindungen ab, die durch eine Vielzahl von Zelladhäsionsmolekülen gebildet und reguliert werden. Endothelzellen haften aneinander, indem sie Strukturen aus adhäsiven Transmembranproteinen bilden, die für die homophile Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich sind (314). Diese Verbindungen werden unterteilt in TJs, AJs und Gap Junctions. Während Gap Junctions transmembranöse Kanäle zwischen benachbarten Zellen formen, bilden TJs und AJs perizelluläre, reißverschlussartige Strukturen entlang der

Zellgrenze, die wichtig sind, um die Gefäßintegrität aufrechtzuerhalten und die Endothelpermeabilität zu regulieren (12). Von den untersuchten Junction-Proteinen zeigte nur VE-Cadherin eine gesteigerte Expression im murinen Subkutangewebe nach Behandlung mit Dexamethason (Tab. 18). VE-Cadherin ist ein endothelspezifisches Adhäsionsmolekül und von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der AJs (315). In murinen cEND-Zellen (Cerebral Capillary Endothelial Cells) konnte bereits nachgewiesen werden, dass Dexamethason die Expression von VE-Cadherin erhöhen und zur strukturellen Reorganisation am Cytoskelett führen kann (316). Andere Untersuchungen zeigten, dass die Bindung von VE-Cadherin durch Antikörper die Zellverbindungen von kultivierten Endothelzellen destabilisieren und auflösen (317). In Mäusen waren die Antikörper jedoch nur in der Lage, die Gefäßpermeabilität in der Lunge und im Herzen zu erhöhen, wohingegen diese in der Haut, im Gehirn, in der Trachea oder im Darm nicht beeinflusst wurde (318). Ähnliche Effekte konnten auch nach Inaktivierung des für VE-Cadherin verantwortlichen murinen *CDH5*-Gens mittels Cre/loxP-Rekombination beobachtet werden, wo am Mausohr keine Veränderung der dermalen Extravasation festgestellt wurde (319). Es wurden jedoch bereits Zusammenhänge zwischen der Bradykinin-vermittelten Hyperpermeabilität beim HAE und VE-Cadherin beobachtet. Plasmaproben von zwei Frauen mit HAE zeigten während einer akuten Attacke deutlich erhöhte Konzentrationen an VE-Cadherin-Fragmenten, wodurch hergeleitet wurde, dass die Erhöhung der Endothelpermeabilität mit einer Abspaltung des Junction-Proteins aus dem Endothel verbunden sein könnte (320). In weiteren Experimenten mit HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) konnte zudem eine Bradykinin-vermittelte, zeitabhängige Freisetzung des gleichen Fragments nachgewiesen werden. Sofern die Dexamethason-induzierte Expressionssteigerung von VE-Cadherin für die beobachtete Wirkung auf die B2-vermittelte dermale Extravasation verantwortlich sein sollte, könnte dieser Mechanismus selektiv für die B2-Signalgebung sein und dadurch erklären, weshalb im Miles Assay kein Effekt auf die Histamin-induzierte Extravasation vermittelt wurde (Abb. 36). Zwar sind Mechanismen beschrieben, durch die Histamin die Endothelpermeabilität durch Beeinflussung von VE-Cadherin erhöhen kann, jedoch wurden diese nicht mit einer Freisetzung des Proteins, sondern dem Verlust der adhäsiven Eigenschaften oder einer Internalisierung verbunden (321). Weitere Experimente, bei denen HUVEC neben Bradykinin (320) auch mit Histamin inkubiert werden, könnten zeigen, ob die Freisetzung von VE-Cadherin selektiv für Bradykinin ist. Darüber hinaus könnten Konzentrationen des Proteins im Plasma von Mäusen nach Bradykinin- oder Histaminexposition ermittelt werden.

Insgesamt weist die durchgeführte Microarray-Genexpressionsanalyse in subkutanem Gewebe von Mäusen, die entweder mit Dexamethason oder Vehikellösung behandelt wurden,

starke Limitationen auf. Der verwendete Genchip führt zwar mit über 22.000 verschiedenen murinen Genen eine sehr hohe Anzahl potentiell untersuchbarer Proteine auf, allerdings zeigten sich beispielsweise bei den CYP-Enzymen, die zur Untersuchung einer Beteiligung von EETs an der Wirkung von Dexamethason herangezogen wurden, deutliche Lücken bei der Auswahl der Isoformen. So fanden z. B. CYP2C9 (*CYP2C9*-Gen), welches nachweislich in der Lage ist, EETs zu synthetisieren (322), oder CYP3A4 (*CYP3A4*-Gen), das bekanntermaßen eine deutliche Relevanz für den Phase I-Metabolismus von Pharmaka hat (196) keinen Platz auf dem Chip. Aber auch wichtige Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  (*TNFSF2*-Gen) wurden nicht aufgeführt. Vielmehr jedoch muss erwähnt sein, dass die zelluläre Inhomogenität der Proben aus Subkutangewebe nur sehr schwer Rückschlüsse auf Regulationsveränderungen einzelner Zelltypen zulassen und die Aussagekraft der Daten daher begrenzt ist. So hätte die Analyse von kultivierten Endothelzellen wie HDMEC deutlich zielgerichteter relevante Gene ausfindig machen können, die die B2-Signalgebung beeinflussen und hier durch die Menge an verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Adipozyten und diversen Immunzellen (298) eventuell untergegangen sind. Dies könnte auch erklären, weshalb gut untersuchte Proteine wie Annexin A1 keine Hochregulation durch Dexamethason angezeigt haben. Des Weiteren muss immer im Hinterkopf behalten werden, dass die Genexpressionsanalyse nur Hinweise auf Transkriptionsebene liefert. Alle Befunde müssten im Nachgang mittels weiterer Methoden wie der quantitativen Echtzeit-PCR und auch auf Proteinebene, z. B. durch Western Blots, bestätigt werden, was in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nur für Annexin A1 erfolgt ist.

Insgesamt deuten die Daten jedoch darauf hin, dass die Hemmung der Expression von cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  einen Beitrag zu der inhibitorischen Wirkung von Dexamethason auf die B2-vermittelte Extravasation in kleinen dermalen Gefäßen von Mäusen leisten kann und die direkte cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ -Hemmung durch Annexin A1 potenzieren könnte. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass neben PGI<sub>2</sub> auch eine verminderte PGE<sub>2</sub>-Synthese, die durch Hemmung der PGES-Expression resultieren könnte, die Wirkung von Dexamethason fördert. Darüber hinaus geben die Daten Anlass zu der Vermutung, dass die vermehrte Expression des AJ-Proteins VE-Cadherin die B2-vermittelte Hyperpermeabilität reduzieren kann und gemeinsam mit den anderen postulierten Mechanismen zur inhibitorischen Wirkung von Dexamethason auf die Bradykinin-induzierte dermale Extravasation in Mäusen beiträgt.

## Zusammenfassung

Das nicht-allergische Angioödem ist durch eine erhöhte Endothelpermeabilität charakterisiert und geht mit Schwellungen der Schleimhaut und/oder Submukosa der Haut einher. Eine Ausprägung im Kopf- und Halsbereich, insbesondere Rachen und Kehlkopf, kann durch Beeinträchtigung der Atmung lebensbedrohlich sein und eine schnelle notfallmedizinische Behandlung notwendig machen. Auslöser dafür ist die Akkumulation des vasoaktiven Peptids Bradykinin, die zu einer Überaktivierung des Bradykinin-B2-Rezeptors (B2) führt und als Nebenwirkung häufig verschriebener kardiovaskulärer Medikamente wie Angiotensin I-konvertierendes Enzym (ACE)-Inhibitoren oder Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT1)-Antagonisten auftreten kann. Ein besseres Verständnis der Pathogenese und der damit verbundenen Signalwege könnte den Weg für neue Optionen in der Therapie und Prävention Bradykinin-induzierter Angioödeme ebnen.

Bisherige Untersuchungen deuteten bereits darauf hin, dass die Cyclooxygenase (COX) und die von ihr abhängigen Prostaglandine eine wichtige Rolle bei der B2-vermittelten dermalen Extravasation in sowohl Mäusen als auch Menschen spielen. Daher wurden die COX-vermittelten Signalwege und darüber hinaus auch die Beteiligung weiterer Arachidonsäure-Metabolite wie Leukotriene und Epoxyeicosatriensäuren (EETs) näher untersucht. Mithilfe des Miles Assay wurde in C57BL/6 und COX-1-defizienten Mäusen der Einfluss von Inhibitoren der COX, 5-Lipoxygenase (5-LOX) und Cytochrom P450 (CYP)-Isoenzyme sowie Antagonisten vasodilatierend wirksamer Prostaglandin (PG)-Rezeptoren auf die B2-vermittelte dermale Extravasation analysiert. Zusätzlich wurde der Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)-Metabolit 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> in Subkutangewebe von C57BL/6 und humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) nach Stimulation mit Bradykinin mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) identifiziert und quantifiziert. Weitere Miles Assays umfassten die Hemmung der Arachidonsäuresynthese durch den cytosolische Phospholipase A<sub>2α</sub> (cPLA<sub>2α</sub>)-Inhibitor SB296 und das Glucocorticoid Dexamethason. Genexpressionsanalysen im Subkutangewebe von C57BL/6 nach Vorbehandlung mit Dexamethason sollten zudem weitere Ansätze zur Hemmung der B2-vermittelten dermalen Extravasation liefern.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Haut von Mäusen in Reaktion auf die B2-Aktivierung COX-1-abhängiges PGI<sub>2</sub> entscheidend an der Vermittlung der dermalen Extravasation beteiligt ist. Dahingegen spielen 5-LOX-abhängige Leukotriene und EETs, die durch CYP gebildet werden, wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Zudem konnte die B2-abhängige PGI<sub>2</sub>-Produktion auch in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden und

so erste Ansätze mit Blick auf die humane Pathophysiologie bei der Entstehung Bradykinin-induzierter Angioödeme schaffen. Darüber hinaus erwies sich Dexamethason im Miles Assay als ähnlich effektiv bei der Hemmung der B<sub>2</sub>-vermittelten dermalen Extravasation in Mäusen wie der B<sub>2</sub>-Antagonist Icatibant. Die Genexpressionsanalysen zur Bestimmung von dabei möglicherweise involvierten genomischen Effekten von Dexamethason deuteten auf eine Beteiligung von cPLA<sub>2</sub>α und womöglich auch vaskulärem endothelialen (VE)-Cadherin hin, wobei der experimentelle Ansatz der Analyse hauptsächlich wegen der im subkutanen Gewebe vorkommenden verschiedenen Zelltypen mit Limitationen behaftet ist und weiterer Nachweise bedarf.

Die neuen Erkenntnisse könnten eine Tür für neue Behandlungsstrategien bei akuten, medikamenteninduzierten, nicht-allergischen Angioödemem wie ACE-Inhibitor-induzierten Angioödemem öffnen. Die klinische Entwicklung von Hemmstoffen der PGI<sub>2</sub>-Synthase oder PGI<sub>2</sub>-Rezeptor (IP)-Antagonisten könnte ganz neue Ansätze für die Therapie schaffen. Darüber hinaus könnte sich der Einsatz von Glucocorticoiden, anders als bislang angenommen, auch bei Bradykinin-vermittelten Angioödemem als wirksam erweisen und so eine kostengünstige und effektive Therapieoption darstellen. Auch wenn noch weitere Forschung insbesondere mit Blick auf die Mechanismen im Menschen von Nöten sind, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit den derzeitigen Wissensstand in Bezug auf die Signalwege nach der Aktivierung von B<sub>2</sub> in kleinen dermalen Blutgefäßen erweitern. Die neuen Befunde weisen auf einen wesentlichen Beitrag von COX-1-abhängigem PGI<sub>2</sub> zur B<sub>2</sub>-vermittelten dermalen Extravasation hin und schaffen Evidenz für den Einsatz von Glucocorticoiden als Akuttherapie bei Bradykinin-induzierten Angioödemem.

## Summary

Non-allergic angioedema is a condition characterized by increased endothelial permeability associated with swelling of the mucosa and/or submucosa of the skin. An expression in the head and neck region, especially the pharynx and larynx, can be life-threatening due to impaired breathing and require rapid emergency medical treatment. This is triggered by accumulation of the vasoactive peptide bradykinin, which leads to overactivation of the bradykinin B2 receptor (B2) and can occur as a side effect of commonly prescribed cardiovascular medications such as angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin II receptor subtype 1 (AT1) antagonists. A better understanding of the pathogenesis and associated signaling pathways may pave the way for new options in the therapy and prevention of bradykinin-induced angioedema.

Previous studies already indicated that cyclooxygenase (COX) activity resulting in prostanoid synthesis may play an important role in B2-mediated dermal extravasation in both mice and humans. Therefore, COX-mediated signaling pathways and, in addition, the involvement of other arachidonic acid metabolites such as leukotrienes and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) were further investigated. Using the Miles assay, the influence of inhibitors of COX, 5-lipoxygenase (5-LOX) and cytochrome P450 (CYP) isozymes, and antagonists of vasodilating prostaglandin (PG) receptors on B2-mediated dermal extravasation was analyzed in C57BL/6 and COX-1-deficient mice. In addition, the prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) metabolite 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  was identified and quantified in subcutaneous tissue of C57BL/6 and human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) after stimulation with bradykinin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Other Miles assays included inhibition of arachidonic acid synthesis by the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> $\alpha$  (cPLA<sub>2</sub> $\alpha$ ) inhibitor SB296 and the glucocorticoid dexamethasone. Gene expression analyses in subcutaneous tissue of C57BL/6 after pretreatment with dexamethasone should also provide further approaches to inhibit B2-mediated dermal extravasation.

It has been shown that in mouse skin, in response to B2 activation, COX-1-dependent PGI<sub>2</sub> is critically involved in mediating dermal extravasation. In contrast, 5-LOX-dependent leukotrienes and EETs produced by CYP isoenzymes probably play a minor role. Moreover, B2-dependent PGI<sub>2</sub> production was also detected in human endothelial cells, thus providing the first approaches with regard to human pathophysiology in the development of bradykinin-induced angioedema. In addition, dexamethasone proved to be similarly effective in inhibiting B2-mediated dermal extravasation in mice as the B2 antagonist

Icatibant in the Miles assay. Gene expression analyses to determine genomic effects of dexamethasone possibly involved in this process indicated involvement of cPLA<sub>2</sub> $\alpha$  and possibly vascular endothelial (VE)-cadherin, although the experimental approach to the analysis has strong limitations and requires further evidence.

The new findings may open a door for new treatment strategies for acute drug-induced non-allergic angioedema such as ACE inhibitor-induced angioedema. The clinical development of inhibitors of PGI<sub>2</sub> synthase or PGI<sub>2</sub> receptor (IP) antagonists could create entirely new approaches to therapy. In addition, the use of glucocorticoids, in contrast to what has been assumed so far, may also prove effective in bradykinin-mediated angioedema, thus providing an inexpensive and effective therapeutic option. Although further research is needed, particularly with regard to mechanisms in humans, in summary the results of this work add to the current knowledge of signaling pathways following B<sub>2</sub> activation in small dermal blood vessels. The new findings indicate a substantial contribution of COX-1-dependent PGI<sub>2</sub> to B<sub>2</sub>-mediated dermal extravasation and establish evidence for the use of glucocorticoids as a causal therapy for bradykinin-induced angioedema.

## Literaturverzeichnis

1. Reshef A, Kidon M, Leibovich I. The Story of Angioedema: from Quincke to Bradykinin. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016;51:121-139.
2. Donaldson VH, Evans RR. A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. *Am J Med* 1963;35:37-44.
3. Caldwell JR, Ruddy S, Schur PH, Austen KF. Acquired inhibitor deficiency in lymphosarcoma. *Clin Immunol Immunopathol* 1972;1:39-52.
4. Fields T, Ghebrehiwet B, Kaplan AP. Kinin formation in hereditary angioedema plasma: evidence against kinin derivation from C2 and in support of "spontaneous" formation of bradykinin. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:54-60.
5. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998;351:1693-1697.
6. Cicardi M, Banerji A, Bracho F, Malbran A, Rosenkranz B, Riedl M, Bork K, Lumry W, Aberer W, Bier H, Bas M, Greve J, Hoffmann TK, 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 WB, Toubi E, Werner S, Anne S, Bjorkander J, Bouillet L, Cillari E, Hurewitz D, Jacobson KW, Katelaris CH, Maurer M, Merk H, Bernstein JA, Feighery C, Floccard B, Gleich G, Hebert J, Kaatz M, Keith P, Kirkpatrick CH, Langton D, Martin L, Pichler C, Resnick D, Wombolt D, Fernandez Romero DS, Zanichelli A, Arcoletto F, Knolle J, Kravec I, Dong L, Zimmermann J, Rosen K, Fan WT. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 2010;363:532-541.
7. Byrd JB, Adam A, Brown NJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006;26:725-737.
8. Hahn J, Hoffmann TK, Bock B, Nordmann-Kleiner M, Trainotti S, Greve J. Angioedema. *Dtsch Arztebl Int* 2017;114:489-496.
9. Bas M, Hoffmann TK, Kojda G. Evaluation and management of angioedema of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;14:170-175.
10. Bas M, Greve J, Strassen U, Khosravani F, Hoffmann TK, Kojda G. Angioedema induced by cardiovascular drugs: new players join old friends. *Allergy* 2015;70:1196-1200.
11. Bas M, Adams V, Suvorava T, Niehues T, Hoffmann TK, Kojda G. Non-allergic angioedema. Role of bradykinin. *Allergy* 2007;62(8):842-856.
12. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006;86:279-367.
13. Kaplan AP. Angioedema. *World Allergy Organ J* 2008;1:103-113.
14. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2011;7 Suppl 1:S1.
15. Busse PJ, Buckland MS. Non-histaminergic angioedema: focus on bradykinin-mediated angioedema. *Clin Exp Allergy* 2013;43:385-394.
16. Cicardi M, Aberer W, Banerji A, Bas M, Bernstein JA, Bork K, Caballero T, Farkas H, Grumach A, Kaplan AP, Riedl MA, Triggiani M, Zanichelli A, Zuraw B. Classification, diagnosis, and approach to treatment for angioedema: consensus



- report from the Hereditary Angioedema International Working Group. *Allergy* 2014;69:602-616.
17. White WB, Bresalier R, Kaplan AP, Palmer BF, Riddell RH, Lesogor A, Chang W, Keefe DL. Safety and tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren: a pooled analysis of clinical experience in more than 12,000 patients with hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2010;12:765-775.
  18. Bozkurt S, Arslan ED, Kose A, Ayrik C, Yilmaz A, Dundar GA. Lingual angioedema after alteplase treatment in a patient with acute ischemic stroke. *World J Emerg Med* 2015;6:74-76.
  19. Hill MD, Barber PA, Takahashi J, Demchuk AM, Feasby TE, Buchan AM. Anaphylactoid reactions and angioedema during alteplase treatment of acute ischemic stroke. *CMAJ* 2000;162:1281-1284.
  20. Busse PJ, Christiansen SC, Riedl MA, Banerji A, Bernstein JA, Castaldo AJ, Craig T, Davis-Lorton M, Frank MM, Li HH, Lumry WR, Zuraw BL. US HAEA Medical Advisory Board 2020 Guidelines for the Management of Hereditary Angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2021;9:132-150 e133.
  21. Zhang B, Li Q, Shi C, Zhang X. Drug-Induced Pseudoallergy: A Review of the Causes and Mechanisms. *Pharmacology* 2018;101:104-110.
  22. Agostoni A, Cicardi M. Drug-induced angioedema without urticaria. *Drug Saf* 2001;24:599-606.
  23. Gompels MM, Lock RJ, Morgan JE, Osborne J, Brown A, Virgo PF. A multicentre evaluation of the diagnostic efficiency of serological investigations for C1 inhibitor deficiency. *J Clin Pathol* 2002;55:145-147.
  24. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:1286-1289.
  25. Bork K, Wulff K, Steinmuller-Magin L, Braenne I, Staubach-Renz P, Witzke G, Hardt J. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. *Allergy* 2018;73:442-450.
  26. Bafunno V, Firinu D, D'Apolito M, Cordisco G, Loffredo S, Leccese A, Bova M, Barca MP, Santacroce R, Cicardi M, Del Giacco S, Margaglione M. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:1009-1017.
  27. Bork K, Wulff K, Rossmann H, Steinmuller-Magin L, Braenne I, Witzke G, Hardt J. Hereditary angioedema cosegregating with a novel kininogen 1 gene mutation changing the N-terminal cleavage site of bradykinin. *Allergy* 2019;74:2479-2481.
  28. Zuraw BL. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor: Four types and counting. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:884-885.
  29. Cicardi M, Zuraw BL. Angioedema Due to Bradykinin Dysregulation. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018;6:1132-1141.
  30. Montinaro V, Cicardi M. ACE inhibitor-mediated angioedema. *Int Immunopharmacol* 2020;78:106081.
  31. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau JL, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR, Investigators P-H, Committees. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med* 2014;371:993-1004.

32. Brown NJ, Byiers S, Carr D, Maldonado M, Warner BA. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor use associated with increased risk of ACE inhibitor-associated angioedema. *Hypertension* 2009;54:516-523.
33. Cicardi M, Zanichelli A. Acquired angioedema. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010;6:14.
34. Wu MA, Castelli R. The Janus faces of acquired angioedema: C1-inhibitor deficiency, lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:207-214.
35. Asero R. Leukotriene receptor antagonists may prevent NSAID-induced exacerbations in patients with chronic urticaria. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:156-157.
36. Duah E, Teegala LR, Kondeti V, Adapala RK, Keshamouni VG, Kanaoka Y, Austen KF, Thodeti CK, Paruchuri S. Cysteinyl leukotriene 2 receptor promotes endothelial permeability, tumor angiogenesis, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:199-204.
37. Cicardi M, Zingale LC, Bergamaschini L, Agostoni A. Angioedema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor use: outcome after switching to a different treatment. *Arch Intern Med* 2004;164:910-913.
38. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007;369:1208-1219.
39. Yusuf S, Teo K, Anderson C, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P. Effects of the angiotensin-receptor blocker telmisartan on cardiovascular events in high-risk patients intolerant to angiotensin-converting enzyme inhibitors: a randomised controlled trial. *Lancet* 2008;372:1174-1183.
40. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM, Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial I. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 2003;349:1893-1906.
41. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 2000;342:145-153.
42. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008;358:1547-1559.
43. Makani H, Messerli FH, Romero J, Wever-Pinzon O, Korniyenko A, Berrios RS, Bangalore S. Meta-analysis of randomized trials of angioedema as an adverse event of renin-angiotensin system inhibitors. *Am J Cardiol* 2012;110:383-391.
44. Woodard-Grice AV, Lucisano AC, Byrd JB, Stone ER, Simmons WH, Brown NJ. Sex-dependent and race-dependent association of XPNPEP2 C-2399A polymorphism with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:532-536.
45. McDowell SE, Coleman JJ, Ferner RE. Systematic review and meta-analysis of ethnic differences in risks of adverse reactions to drugs used in cardiovascular medicine. *BMJ (Clinical research ed)* 2006;332:1177-1181.
46. Sachs B, Meier T, Nothen MM, Stieber C, Stingl J. Drug-induced angioedema. Focus on bradykinin. *Hautarzt* 2018;69:298-305.

47. Mahmoudpour SH, Asselbergs FW, Terreehorst I, Souverein PC, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Continuation of angiotensin converting enzyme inhibitor therapy, in spite of occurrence of angioedema. *Int J Cardiol* 2015;201:644-645.
48. Weber F, Anlauf M. Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Systems. In: Ludwig WD, Mühlbauer B, Seifert R, editors. *Arzneiverordnungs-Report 2021*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2021:131-161.
49. Clarke R, Emberson J, Fletcher A, Breeze E, Marmot M, Shipley MJ. Life expectancy in relation to cardiovascular risk factors: 38 year follow-up of 19,000 men in the Whitehall study. *BMJ (Clinical research ed)* 2009;339:b3513.
50. Bernstein JA, Cremonesi P, Hoffmann TK, Hollingsworth J. Angioedema in the emergency department: a practical guide to differential diagnosis and management. *Int J Emerg Med* 2017;10:15.
51. Lenschow M, Bas M, Johnson F, Wirth M, Strassen U. A score for the differential diagnosis of bradykinin- and histamine-induced head and neck swellings. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2018;275:1767-1773.
52. Long BJ, Koyfman A, Gottlieb M. Evaluation and Management of Angioedema in the Emergency Department. *West J Emerg Med* 2019;20:587-600.
53. Christiansen SC, Davis DK, Castaldo AJ, Zuraw BL. Pediatric Hereditary Angioedema: Onset, Diagnostic Delay, and Disease Severity. *Clin Pediatr (Phila)* 2016;55:935-942.
54. Zanichelli A, Azin GM, Wu MA, Suffritti C, Maggioni L, Caccia S, Perego F, Vacchini R, Cicardi M. Diagnosis, Course, and Management of Angioedema in Patients With Acquired C1-Inhibitor Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017;5:1307-1313.
55. Caballero T. Treatment of Hereditary Angioedema. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2021;31:1-16.
56. Cicardi M, Levy RJ, McNeil DL, Li HH, Sheffer AL, Champion M, Horn PT, Pullman WE. Ecallantide for the treatment of acute attacks in hereditary angioedema. *N Engl J Med* 2010;363:523-531.
57. Banerji A, Busse P, Shennak M, Lumry W, Davis-Lorton M, Wedner HJ, Jacobs J, Baker J, Bernstein JA, Lockey R, Li HH, Craig T, Cicardi M, Riedl M, Al-Ghazawi A, Soo C, Iarrobino R, Sexton DJ, TenHoor C, Kenniston JA, Faucette R, Still JG, Kushner H, Mensah R, Stevens C, Biedenkapp JC, Chyung Y, Adelman B. Inhibiting Plasma Kallikrein for Hereditary Angioedema Prophylaxis. *N Engl J Med* 2017;376:717-728.
58. Powell J, Piszczatoski C, Rubido E. Orladeyo (Berotralstat): A Novel Oral Therapy for the Prevention of Hereditary Angioedema. *Ann Pharmacother* 2021;10600280211032982.
59. Lesage A, Gibson C, Marceau F, Ambrosi HD, Saupe J, Katzer W, Loenders B, Charest-Morin X, Knolle J. In Vitro Pharmacological Profile of a New Small Molecule Bradykinin B2 Receptor Antagonist. *Front Pharmacol* 2020;11:916.
60. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;100:158-173.
61. Komarova Y, Malik AB. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol* 2010;72:463-493.
62. Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001;49:419-432.

63. Wettschureck N, Strilic B, Offermanns S. Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation. *Physiol Rev* 2019;99:1467-1525.
64. Dejana E, Vestweber D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;116:119-144.
65. Oldenburg J, de Rooij J. Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell Tissue Res* 2014;355:545-555.
66. Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, Ristagno G, Maddaluno L, Koh GY, Franco D, Kurtcuoglu V, Poulikakos D, Baluk P, McDonald D, Grazia Lampugnani M, Dejana E. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun* 2012;3:1208.
67. Zuraw BL, Christiansen SC. HAE Pathophysiology and Underlying Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol* 2016;51:216-229.
68. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:564-580.
69. Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB. Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ Res* 2017;120:179-206.
70. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 2015;163:1064-1078.
71. Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, Baluk P, McDonald DM. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res* 2009;335:17-25.
72. Campbell DJ. Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:665-677.
73. Kraut H, Frey EK, Werle E. Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. (IV. Mitteilung über dieses Kreislaufhormon.). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1930;189:97-106.
74. Werle E. Über den Aktivitätszustand des Kallikreins der Bauchspeicheldrüse und ihres äusseren Sekretes beim Hund. *Biochem Z* 1937;290:129-134.
75. Werle E, Grunz M. Zur Kenntnis der darmkontrahierenden, uterusregenden und blutdrucksenkenden Substanz DK. *Biochem Z* 1939;301:429-436.
76. Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 1949;156:261-273.
77. Ferreira SH. A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of Bothrops Jararaca. *Br J Pharmacol Chemother* 1965;24:163-169.
78. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977;196:441-444.
79. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27-77.
80. Ponczek MB. High Molecular Weight Kininogen: A Review of the Structural Literature. *Int J Mol Sci* 2021;22.

81. Jacobsen S, Kriz M. Some data on two purified kininogens from human plasma. *Br J Pharmacol Chemother* 1967;29:25-36.
82. Koumandou VL, Scorilas A. Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms. *PLoS One* 2013;8:e68074.
83. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005;99:6-38.
84. Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, Howarth P, Kaplan A, Kojda G, Leeb-Lundberg F, Lotvall J, Magerl M. New topics in bradykinin research. *Allergy* 2011;66:1397-1406.
85. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001;22:184-204.
86. Saameli K, Eskes TK. Bradykinin and cardiovascular system: estimation of half-life. *Am J Physiol* 1962;203:261-265.
87. Hamid S, Rhaleb IA, Kassem KM, Rhaleb NE. Role of Kinins in Hypertension and Heart Failure. *Pharmaceuticals (Basel)* 2020;13:347.
88. Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21583-21586.
89. Marceau F, Bachelard H, Bouthillier J, Fortin JP, Morissette G, Bawolak MT, Charest-Morin X, Gera L. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. *Int Immunopharmacol* 2020;82:106305.
90. Bas M, Greve J, Stelter K, Havel M, Strassen U, Rotter N, Veit J, Schossow B, Hapfelmeier A, Kehl V, Kojda G, Hoffmann TK. A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema. *N Engl J Med* 2015;372:418-425.
91. Campbell DJ, Krum H, Esler MD. Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans. *Circulation* 2005;111:315-320.
92. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1123:134-145.
93. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33:829-837, 837a-837d.
94. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56:387-437.
95. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:247-266.
96. Simaan M, Bedard-Goulet S, Fessart D, Gratton JP, Laporte SA. Dissociation of beta-arrestin from internalized bradykinin B2 receptor is necessary for receptor recycling and resensitization. *Cell Signal* 2005;17:1074-1083.
97. Zimmerman B, Simaan M, Akoume MY, Hourri N, Chevallier S, Seguela P, Laporte SA. Role of  $\beta$ arrestins in bradykinin B2 receptor-mediated signalling. *Cell Signal* 2011;23:648-659.
98. Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem* 2020;64:423-441.
99. Gholamreza-Fahimi E, Bisha M, Hahn J, Strassen U, Krybus M, Khosravani F, Hoffmann TK, Hohlfeld T, Greve J, Bas M, Twarock S, Kojda G. Cyclooxygenase

- activity in bradykinin-induced dermal extravasation. A study in mice and humans. *Biomed Pharmacother* 2020;123:109797.
100. Krybus M, Sieradzki M, Fahimi E, Metry S, Nusing R, Geisslinger G, Steiner I, Daldrup T, Lehr M, Kojda G. Contribution of cyclooxygenase-1-dependent prostacyclin synthesis to bradykinin-induced dermal extravasation. *Biomed Pharmacother* 2022;148:112786.
  101. Leslie CC. Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:373-376.
  102. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1187-1205.
  103. Oates JA. The 1982 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Science* 1982;218:765-768.
  104. Goldblatt MW. A depressor substance in seminal fluid. *J Soc Chem Ind* 1933;52:1056-1057.
  105. von Euler US. Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes. *Klin Wschr* 1935;14:1182-1183.
  106. von Euler US. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol* 1936;88:213-234.
  107. Kelly RW. Prostaglandins in Semen - Their Occurrence and Possible Physiological Significance. *Int J Androl* 1978;1:188-200.
  108. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-1875.
  109. Bergstrom S, Samuelsson B. Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. *Prostaglandins and related factors*. 11. *J Biol Chem* 1962;237:3005-3006.
  110. Van Dorp DA, Beerthuis RK, Nugteren DH, Vonkeman H. Enzymatic conversion of all-cis-polyunsaturated fatty acids into prostaglandins. *Nature* 1964;203:839-841.
  111. Bergström S, Danielsson H, Samuelsson B. The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochim Biophys Acta* 1964;90:207-210.
  112. Johnson RA, Morton DR, Kinner JH, Gorman RR, McGuire JC, Sun FF, Whittaker N, Bunting S, Salmon J, Moncada S, Vane JR. The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 1976;12:915-928.
  113. Moncada S, Vane JR. Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1981;294:305-329.
  114. Nelson NA. Prostaglandin nomenclature. *J Med Chem* 1974;17:911-918.
  115. Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 2001;21:185-210.
  116. Samuelsson B, Hamberg M, Roberts LJ, 2nd, Oates JA, Nelson NA. Nomenclature for thromboxanes. *Prostaglandins* 1978;16:857-860.
  117. Oesterling TO, Morozowich W, Roseman TJ. Prostaglandins. *J Pharm Sci* 1972;61:1861-1895.
  118. Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell* 1999;97:349-360.

119. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 2011;111:6130-6185.
120. Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* 2006;45:487-510.
121. Hamberg M, Samuelsson B. Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:899-903.
122. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:3824-3828.
123. Van der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Nugteren DH, Van Dorp DA. Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim Biophys Acta* 1977;487:315-331.
124. Marshall PJ, Kulmacz RJ. Prostaglandin H synthase: distinct binding sites for cyclooxygenase and peroxidase substrates. *Arch Biochem Biophys* 1988;266:162-170.
125. Smith WL, Lands WE. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. *Biochemistry* 1972;11:3276-3285.
126. Habenicht AJ, Goerig M, Grulich J, Rothe D, Gronwald R, Loth U, Schettler G, Kommerell B, Ross R. Human platelet-derived growth factor stimulates prostaglandin synthesis by activation and by rapid de novo synthesis of cyclooxygenase. *J Clin Invest* 1985;75:1381-1387.
127. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
128. Zidar N, Odar K, Glavac D, Jerse M, Zupanc T, Stajer D. Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *J Cell Mol Med* 2009;13:3753-3763.
129. Schwab JM, Schluesener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet* 2003;361:981-982.
130. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 1996;3:927-933.
131. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-1226.
132. Ylikorkala O, Viinikka L. Measurement of 6-keto-prostaglandin F1 $\alpha$  in human plasma with radioimmunoassay: Effect of prostacyclin infusion. *Prostaglandins Med* 1981;6:427-436.
133. Sheikh MH, Solito E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *Int J Mol Sci* 2018;19:1045.
134. Chen C, Wang DW. CYP epoxygenase derived EETs: from cardiovascular protection to human cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2013;13:1454-1469.
135. Haeggstrom JZ. Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets. *J Clin Invest* 2018;128:2680-2690.
136. Schuster VL. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:633-647.

137. Pace-Asciak C. Letter: Isolation, structure, and biosynthesis of 6-ketoprostaglandin F1 alpha in the rat stomach. *J Am Chem Soc* 1976;98:2348-2349.
138. Ensor CM, Tai HH. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;12:313-319.
139. Nomura T, Lu R, Pucci ML, Schuster VL. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. *Mol Pharmacol* 2004;65:973-978.
140. Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* 1995;268:866-869.
141. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:986-1000.
142. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001;193:255-261.
143. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:661-690.
144. Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005;85:1159-1204.
145. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem* 2007;50:1425-1441.
146. Kanabar DJ. A clinical and safety review of paracetamol and ibuprofen in children. *Inflammopharmacology* 2017;25:1-9.
147. Solomon DH, Husni ME, Wolski KE, Wisniewski LM, Borer JS, Graham DY, Libby P, Lincoff AM, Luscher TF, Menon V, Yeomans ND, Wang Q, Bao W, Berger MF, Nissen SE, Investigators PT. Differences in Safety of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Patients With Osteoarthritis and Patients With Rheumatoid Arthritis: A Randomized Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:537-546.
148. Whitlock EP, Burda BU, Williams SB, Guirguis-Blake JM, Evans CV. Bleeding risks with Aspirin use for primary prevention in adults: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2016;164:826-835.
149. Takeuchi K, Kato S, Amagase K. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *J Pharmacol Sci* 2010;114:248-261.
150. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001;345:433-442.
151. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 2000;284:1247-1255.
152. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ, Group VS. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:1520-1528, 1522 p following 1528.



153. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanas A, Konstam MA, Baron JA, Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx Trial I. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352:1092-1102.
154. Sibbald B. Rofecoxib (Vioxx) voluntarily withdrawn from market. *CMAJ* 2004;171:1027-1028.
155. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:272-277.
156. Warner TD, Mitchell JA. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* 2008;371:270-273.
157. White WB, Faich G, Whelton A, Maurath C, Ridge NJ, Verburg KM, Geis GS, Lefkowitz JB. Comparison of thromboembolic events in patients treated with celecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, versus ibuprofen or diclofenac. *Am J Cardiol* 2002;89:425-430.
158. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:557-572.
159. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* 2016;6:603-621.
160. Lecocq FR, Mebane D, Madison LL. The Acute Effect of Hydrocortisone on Hepatic Glucose Output and Peripheral Glucose Utilization. *J Clin Invest* 1964;43:237-246.
161. Leung DY, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22; quiz 23.
162. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* 2017;17:233-247.
163. Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 1979;278:456-459.
164. Flower RJ. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 1988;94:987-1015.
165. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711-1723.
166. Heffler E, Madeira LNG, Ferrando M, Puggioni F, Racca F, Malvezzi L, Passalacqua G, Canonica GW. Inhaled Corticosteroids Safety and Adverse Effects in Patients with Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018;6:776-781.
167. Kostis WJ, Shetty M, Chowdhury YS, Kostis JB. ACE Inhibitor-Induced Angioedema: a Review. *Curr Hypertens Rep* 2018;20:55.
168. Kim SJ, Brooks JC, Sheikh J, Kaplan MS, Goldberg BJ. Angioedema deaths in the United States, 1979-2010. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014;113:630-634.
169. Iaboni A, Kanani A, Lacuesta G, Song C, Kan M, Betschel SD. Impact of lanadelumab in hereditary angioedema: a case series of 12 patients in Canada. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2021;17:78.
170. Bisha M, Dao VT, Gholamreza-Fahimi E, Vogt M, van Zandvoort M, Weber S, Bas M, Khosravani F, Kojda G, Suvorava T. The role of bradykinin receptor type 2 in

- spontaneous extravasation in mice skin: implications for non-allergic angio-oedema. *Br J Pharmacol* 2018;175:1607-1620.
171. Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995;83:483-492.
  172. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
  173. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
  174. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
  175. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195-203.
  176. Miles AA, Miles EM. Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pigs. *J Physiol* 1952;118:228-257.
  177. Yao L, Xue X, Yu P, Ni Y, Chen F. Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. *Contrast Media Mol Imaging* 2018;2018:7628037.
  178. Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp* 2013:e50062.
  179. Borlongan CV, Emerich DF. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull* 2003;60:297-306.
  180. Straub JA, Akiyama A, Parmar P, Musso GF. Chemical pathways of degradation of the bradykinin analog, RMP-7. *Pharm Res* 1995;12:305-308.
  181. Bovens S, Schulze Elfringhoff A, Kaptur M, Reinhardt D, Schafers M, Lehr M. 1-(5-Carboxyindol-1-yl)propan-2-one inhibitors of human cytosolic phospholipase A2alpha: effect of substituents in position 3 of the indole scaffold on inhibitory potency, metabolic stability, solubility, and bioavailability. *J Med Chem* 2010;53:8298-8308.
  182. Roebrock K, Wolf M, Bovens S, Lehr M, Sunderkotter C. Inhibition of benzalkonium chloride-induced skin inflammation in mice by an indol-1-ylpropan-2-one inhibitor of cytosolic phospholipase A2 alpha. *Br J Dermatol* 2012;166:306-316.
  183. Denk W, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW, Yuste R. Anatomical and Functional Imaging of Neurons Using 2-Photon Laser-Scanning Microscopy. *J Neurosci Meth* 1994;54:151-162.
  184. Fahimi E. Contribution of angiotensin converting enzyme to angiotensin receptor blocker induced angio-oedema. Institute for Pharmacology and Clinical Pharmacology. Düsseldorf: Heinrich Heine University Düsseldorf, 2021.
  185. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep* 2008;60:3-11.
  186. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 2015;72:4-15.

187. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006;7:3.
188. Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6230-6234.
189. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-738.
190. Pauling L, Corey RB. Specific Hydrogen-Bond Formation between Pyrimidines and Purines in Deoxyribonucleic Acids. *Arch Biochem Biophys* 1956;65:164-181.
191. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* 2020;21:630-644.
192. Beier V, Bauer A, Baum M, Hoheisel JD. Fluorescent sample labeling for DNA microarray analyses. *Methods Mol Biol* 2004;283:127-135.
193. Southern EM. DNA microarrays. History and overview. *Methods Mol Biol* 2001;170:1-15.
194. Radmark O, Samuelsson B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S40-45.
195. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996;78:415-423.
196. Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, Pelkonen O. Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Arch Toxicol* 2020;94:3671-3722.
197. Vane JR, Botting RM. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *Am J Cardiol* 1995;75:3A-10A.
198. Leslie CC. Cytosolic phospholipase A(2): physiological function and role in disease. *J Lipid Res* 2015;56:1386-1402.
199. Notman R, Noro M, O'Malley B, Anwar J. Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *J Am Chem Soc* 2006;128:13982-13983.
200. Traul KA, Driedger A, Ingle DL, Nakhasi D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem Toxicol* 2000;38:79-98.
201. Paragliola RM, Papi G, Pontecorvi A, Corsello SM. Treatment with Synthetic Glucocorticoids and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Int J Mol Sci* 2017;18:2201.
202. Dolan-O'Keefe M, Chow V, Monnier J, Visner GA, Nick HS. Transcriptional regulation and structural organization of the human cytosolic phospholipase A(2) gene. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L649-657.
203. Jiang X, Nicolls MR, Tian W, Rockson SG. Lymphatic Dysfunction, Leukotrienes, and Lymphedema. *Annu Rev Physiol* 2018;80:49-70.
204. Fleming I. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). *Pharmacol Res* 2004;49:525-533.
205. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:794-805.
206. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Jr., Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, Adam A. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H275-283.

207. Campbell DJ. Neprilysin Inhibitors and Bradykinin. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:257.
208. Byrd JB, Touzin K, Sile S, Gainer JV, Yu C, Nadeau J, Adam A, Brown NJ. Dipeptidyl peptidase IV in angiotensin-converting enzyme inhibitor associated angioedema. *Hypertension* 2008;51:141-147.
209. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;81:1-44.
210. Curry FR, Noll T. Spotlight on microvascular permeability. *Cardiovasc Res* 2010;87:195-197.
211. Claesson-Welsh L. Vascular permeability--the essentials. *Ups J Med Sci* 2015;120:135-143.
212. Nakamura T, Murata T. Regulation of vascular permeability in anaphylaxis. *Br J Pharmacol* 2018;175:2538-2542.
213. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006;86:279-367.
214. Ashina K, Tsubosaka Y, Nakamura T, Omori K, Kobayashi K, Hori M, Ozaki H, Murata T. Histamine Induces Vascular Hyperpermeability by Increasing Blood Flow and Endothelial Barrier Disruption In Vivo. *PLoS One* 2015;10:e0132367.
215. Chahl LA. Interactions of bradykinin, prostaglandin E1, 5-hydroxytryptamine, histamine and adenosine-5'-triphosphate on the dry leakage response in rat skin. *J Pharm Pharmacol* 1976;28:753-757.
216. Weisberg HF. Osmotic pressure of the serum proteins. *Ann Clin Lab Sci* 1978;8:155-164.
217. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE, De Carolis C, Drouet C, Duponchel C, Farkas H, Fay K, Fekete B, Fischer B, Fontana L, Fust G, Giacomelli R, Groner A, Hack CE, Harmat G, Jakenfelds J, Juers M, Kalmar L, Kaposi PN, Karadi I, Kitzinger A, Kollar T, Kreuz W, Lakatos P, Longhurst HJ, Lopez-Trascasa M, Martinez-Saguer I, Monnier N, Nagy I, Nemeth E, Nielsen EW, Nuijens JH, O'Grady C, Pappalardo E, Penna V, Perricone C, Perricone R, Rauch U, Roche O, Rusicke E, Spath PJ, Szendei G, Takacs E, Tordai A, Truedsson L, Varga L, Visy B, Williams K, Zanichelli A, Zingale L. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:S51-131.
218. Zuraw B, Yasothan U, Kirkpatrick P. Ecallantide. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:189-190.
219. Straka BT, Ramirez CE, Byrd JB, Stone E, Woodard-Grice A, Nian H, Yu C, Banerji A, Brown NJ. Effect of bradykinin receptor antagonism on ACE inhibitor-associated angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140:242-248 e242.
220. Sinert R, Levy P, Bernstein JA, Body R, Sivilotti MLA, Moellman J, Schranz J, Baptista J, Kimura A, Nothaft W, group Cs. Randomized Trial of Icatibant for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Induced Upper Airway Angioedema. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017;5:1402-1409 e1403.
221. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995;83:473-482.

222. Perrone MG, Scilimati A, Simone L, Vitale P. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. *Curr Med Chem* 2010;17:3769-3805.
223. Dallob A, Hawkey CJ, Greenberg H, Wight N, De Schepper P, Waldman S, Wong P, DeTora L, Gertz B, Agrawal N, Wagner J, Gottesdiener K. Characterization of etoricoxib, a novel, selective COX-2 inhibitor. *J Clin Pharmacol* 2003;43:573-585.
224. Ballou LR, Botting RM, Goorha S, Zhang J, Vane JR. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10272-10276.
225. Kämpfer H, Brautigam L, Geisslinger G, Pfeilschifter J, Frank S. Cyclooxygenase-1-coupled prostaglandin biosynthesis constitutes an essential prerequisite for skin repair. *J Invest Dermatol* 2003;120:880-890.
226. Griffoni C, Spisni E, Strillacci A, Toni M, Bachschmid MM, Tomasi V. Selective inhibition of prostacyclin synthase activity by rofecoxib. *J Cell Mol Med* 2007;11:327-338.
227. Rodriguez JA, De la Cerda P, Collyer E, Decap V, Vio CP, Velarde V. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in aortic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H30-36.
228. Bradbury DA, Newton R, Zhu YM, El-Haroun H, Corbett L, Knox AJ. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous prostaglandin E2, E-prostanoid 2 (EP2), and EP4 receptors. *J Biol Chem* 2003;278:49954-49964.
229. Salama RAM, El Gayar NH, Georgy SS, Hamza M. Equivalent intraperitoneal doses of ibuprofen supplemented in drinking water or in diet: a behavioral and biochemical assay using antinociceptive and thromboxane inhibitory dose-response curves in mice. *PeerJ* 2016;4:e2239.
230. Felipe SA, Rodrigues ES, Martin RP, Paiva AC, Pesquero JB, Shimuta SI. Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:649-655.
231. Khosravani F, Suvorava T, Dao VT, Brockmann N, Kocgirli O, Herbst FF, Valcaccia S, Kassack MU, Bas M, Kojda G. Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH. *Allergy* 2015;70:285-294.
232. Benjamin N, Cockcroft JR, Collier JG, Dollery CT, Ritter JM, Webb DJ. Local inhibition of converting enzyme and vascular responses to angiotensin and bradykinin in the human forearm. *J Physiol* 1989;412:543-555.
233. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Ritter JM. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on kinin-induced vasodilation in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol* 1994;38:307-310.
234. Honing ML, Smits P, Morrison PJ, Rabelink TJ. Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension* 2000;35:1314-1318.
235. Keppler D. Leukotrienes: biosynthesis, transport, inactivation, and analysis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1992;121:1-30.
236. Lam BK, Austen KF. Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:511-520.
237. Morwood K, Gillis D, Smith W, Kette F. Aspirin-sensitive asthma. *Intern Med J* 2005;35:240-246.

238. McGill KA, Busse WW. Zileuton. *Lancet* 1996;348:519-524.
239. König S, Pace S, Pein H, Heinekamp T, Kramer J, Romp E, Strassburger M, Troisi F, Proschak A, Dworschak J, Scherlach K, Rossi A, Sautebin L, Haeggstrom JZ, Hertweck C, Brakhage AA, Gerstmeier J, Proschak E, Werz O. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* Abrogates Leukotriene B<sub>4</sub> Formation through Inhibition of Leukotriene A<sub>4</sub> Hydrolase. *Cell Chem Biol* 2019;26:524-534 e525.
240. Duah E, Adapala RK, Al-Azzam N, Kondeti V, Gombedza F, Thodeti CK, Paruchuri S. Cysteinyl leukotrienes regulate endothelial cell inflammatory and proliferative signals through CysLT(2) and CysLT(1) receptors. *Sci Rep* 2013;3:3274.
241. Beller TC, Maekawa A, Friend DS, Austen KF, Kanaoka Y. Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Biol Chem* 2004;279:46129-46134.
242. Ni NC, Yan D, Ballantyne LL, Barajas-Espinosa A, St. Amand T, Pratt DA, Funk CD. A Selective Cysteinyl Leukotriene Receptor 2 Antagonist Blocks Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury and Vascular Permeability in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;339:768-778.
243. Garcia-Marcos L, Schuster A. Antileukotrienes in asthma: present situation. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:441-466.
244. Wong BN, Vadas P. Angioedema suppressed by a combination of anti-histamine and leukotriene modifier. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2017;13:28.
245. Proctor KG, Falck JR, Capdevila J. Intestinal vasodilation by epoxyeicosatrienoic acids: arachidonic acid metabolites produced by a cytochrome P450 monooxygenase. *Circ Res* 1987;60:50-59.
246. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol Rev* 2012;92:101-130.
247. Larsen BT, Miura H, Hatoum OA, Campbell WB, Hammock BD, Zeldin DC, Falck JR, Gutterman DD. Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H491-499.
248. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 1994;481 ( Pt 2):407-414.
249. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999;401:493-497.
250. Imig JD, Falck JR, Wei S, Capdevila JH. Epoxygenase metabolites contribute to nitric oxide-independent afferent arteriolar vasodilation in response to bradykinin. *J Vasc Res* 2001;38:247-255.
251. Wang X, Trottier G, Loutzenhiser R. Determinants of renal afferent arteriolar actions of bradykinin: evidence that multiple pathways mediate responses attributed to EDHF. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F540-549.
252. Caballero F, Gerez E, Batlle A, Vazquez E. Interaction of cimetidine with P450 in a mouse model of hepatocarcinogenesis initiation. *Br J Cancer* 2002;86:630-635.
253. Huang C, Liu W, Perry CN, Yitzhaki S, Lee Y, Yuan H, Tsukada YT, Hamacher-Brady A, Mentzer RM, Jr., Gottlieb RA. Autophagy and protein kinase C are required for cardioprotection by sulfaphenazole. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H570-579.

254. Seneca N, Zoghbi SS, Shetty HU, Tuan E, Kannan P, Taku A, Innis RB, Pike VW. Effects of ketoconazole on the biodistribution and metabolism of [<sup>11</sup>C]loperamide and [<sup>11</sup>C]N-desmethyl-loperamide in wild-type and P-gp knockout mice. *Nucl Med Biol* 2010;37:335-345.
255. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 2001;276:36059-36062.
256. Martínez C, Albet C, Agúndez JA, Herrero E, Carrillo JA, Márquez M, Benítez J, Ortiz JA. Comparative in vitro and in vivo inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A by H2-receptor antagonists. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:369-376.
257. Takeuchi K, Watanabe H, Tran QK, Ozeki M, Sumi D, Hayashi T, Iguchi A, Ignarro LJ, Ohashi K, Hayashi H. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I2 production and nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res* 2004;62:194-201.
258. Sauer SK, Schafer D, Kress M, Reeh PW. Stimulated prostaglandin E2 release from rat skin, in vitro. *Life Sci* 1998;62:2045-2055.
259. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004;103:147-166.
260. Sturino CF, O'Neill G, Lachance N, Boyd M, Berthelette C, Labelle M, Li L, Roy B, Scheigetz J, Tsou N, Aubin Y, Bateman KP, Chauret N, Day SH, Levesque JF, Seto C, Silva JH, Trimble LA, Carriere MC, Denis D, Greig G, Kargman S, Lamontagne S, Mathieu MC, Sawyer N, Slipetz D, Abraham WM, Jones T, McAuliffe M, Piechuta H, Nicoll-Griffith DA, Wang Z, Zamboni R, Young RN, Metters KM. Discovery of a potent and selective prostaglandin D2 receptor antagonist, [(3R)-4-(4-chlorobenzyl)-7-fluoro-5-(methylsulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydrocyclopent a[b]indol-3-yl]-acetic acid (MK-0524). *J Med Chem* 2007;50:794-806.
261. af Forselles KJ, Root J, Clarke T, Davey D, Aughton K, Dack K, Pullen N. In vitro and in vivo characterization of PF-04418948, a novel, potent and selective prostaglandin EP(2) receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2011;164:1847-1856.
262. Nakao K, Murase A, Ohshiro H, Okumura T, Taniguchi K, Murata Y, Masuda M, Kato T, Okumura Y, Takada J. CJ-023,423, a novel, potent and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:686-694.
263. Bley KR, Bhattacharya A, Daniels DV, Gever J, Jahangir A, O'Yang C, Smith S, Srinivasan D, Ford AP, Jett MF. RO1138452 and RO3244794: characterization of structurally distinct, potent and selective IP (prostacyclin) receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2006;147:335-345.
264. Kirkby NS, Lundberg MH, Harrington LS, Leadbeater PD, Milne GL, Potter CM, Al-Yamani M, Adeyemi O, Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:17597-17602.
265. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumiya S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997;388:678-682.
266. Neppl H, Neuhofer H, Afflerbach F, Llach Puig Neppl J, Berghofer A. Bradykinin-induced oedema formation proceeds from B2 receptor stimulation and is potentiated by concomitantly released prostaglandins. *Acta Physiol Scand* 1991;142:141-147.

267. Jones VC, Birrell MA, Maher SA, Griffiths M, Grace M, O'Donnell VB, Clark SR, Belvisi MG. Role of EP2 and EP4 receptors in airway microvascular leak induced by prostaglandin E2. *Br J Pharmacol* 2016;173:992-1004.
268. Abdel-Ghany Rea. Blockade of PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> receptors confers protection against prepatent *Schistosomias mansoni* in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 2015;45:511-520.
269. Omori K, Kida T, Hori M, Ozaki H, Murata T. Multiple roles of the PGE2 -EP receptor signal in vascular permeability. *Br J Pharmacol* 2014;171:4879-4889.
270. Williams TJ, Morley J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature* 1973;246:215-217.
271. Williams TJ, Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* 1977;270:530-532.
272. Konya V, Ullen A, Kampitsch N, Theiler A, Philipose S, Parzmair GP, Marsche G, Peskar BA, Schuligoi R, Sattler W, Heinemann A. Endothelial E-type prostanoid 4 receptors promote barrier function and inhibit neutrophil trafficking. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:532-540 e531-532.
273. Omori K, Kida T, Hori M, Ozaki H, Murata T. Multiple roles of the PGE2 -EP receptor signal in vascular permeability. *Br J Pharmacol* 2014;171:4879-4889.
274. Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carriere M, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N, Metters KM. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta* 2000;1483:285-293.
275. Bas M, Storck K, Strassen U. Potential Biomarkers for the Diagnosis of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Induced Angioedema. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2017;79:85-92.
276. Wu KK, Liou JY. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:45-52.
277. Jones RL, Giembycz MA, Woodward DF. Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. *Br J Pharmacol* 2009;158:104-145.
278. Bhala N, Emberson J, Merhi A, Abramson S, Arber N, Baron JA, Bombardier C, Cannon C, Farkouh ME, FitzGerald GA, Goss P, Halls H, Hawk E, Hawkey C, Hennekens C, Hochberg M, Holland LE, Kearney PM, Laine L, Lanus A, Lance P, Laupacis A, Oates J, Patrono C, Schnitzer TJ, Solomon S, Tugwell P, Wilson K, Wittes J, Baigent C. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2013;382:769-779.
279. Spector AA, Kim HY. Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res* 2015;56:11-21.
280. Gironi B, Kahveci Z, McGill B, Lechner BD, Pagliara S, Metz J, Morresi A, Palombo F, Sassi P, Petrov PG. Effect of DMSO on the Mechanical and Structural Properties of Model and Biological Membranes. *Biophys J* 2020;119:274-286.
281. Kaneda T, Sasaki N, Urakawa N, Shimizu K. Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilator Effects of Dimethyl Sulfoxide in Rat Aorta. *Pharmacology* 2016;97:171-176.
282. Alam SS, Layman DL. Dimethyl sulfoxide inhibition of prostacyclin production in cultured aortic endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1983;411:318-320.



283. Grewal T, Wason SJ, Enrich C, Rentero C. Annexins - insights from knockout mice. *Biol Chem* 2016;397:1031-1053.
284. Kim S, Ko J, Kim JH, Choi EC, Na DS. Differential effects of annexins I, II, III, and V on cytosolic phospholipase A2 activity: specific interaction model. *FEBS Lett* 2001;489:243-248.
285. Kim KM, Kim DK, Park YM, Kim CK, Na DS. Annexin-I inhibits phospholipase A2 by specific interaction, not by substrate depletion. *FEBS Lett* 1994;343:251-255.
286. Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, Roviezzo F, Yona S, Paul-Clark MJ, Gavins FN, Perretti M, Morris JF, Buckingham JC, Flower RJ. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J* 2003;17:253-255.
287. Cirino G, Flower RJ, Browning JL, Sinclair LK, Pepinsky RB. Recombinant human lipocortin 1 inhibits thromboxane release from guinea-pig isolated perfused lung. *Nature* 1987;328:270-272.
288. Cloix JF, Colard O, Rothhut B, Russo-Marie F. Characterization and partial purification of 'renocortins': two polypeptides formed in renal cells causing the anti-phospholipase-like action of glucocorticoids. *Br J Pharmacol* 1983;79:313-321.
289. Dos Santos N, Novaes LS, Dragunas G, Rodrigues JR, Brandao W, Camarini R, Peron JPS, Munhoz CD. High dose of dexamethasone protects against EAE-induced motor deficits but impairs learning/memory in C57BL/6 mice. *Sci Rep* 2019;9:6673.
290. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23-43.
291. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, Rebsamen MC, Hsieh CM, Chui DS, Thomas KL, Prorock AJ, Laubach VE, Moskowitz MA, French BA, Ley K, Liao JK. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2002;8:473-479.
292. Inagaki N, Miura T, Nagai H, Ono Y, Koda A. Inhibition of vascular permeability increase in mice. An additional anti-allergic mechanism of glucocorticoids. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;87:254-259.
293. Ahluwalia A, Peers SH, Flower RJ. Steroid inhibition of oedema formation in the rat skin. *Br J Pharmacol* 1992;106:628-631.
294. Björk J, Goldschmidt T, Smedegard G, Arfors KE. Methylprednisolone acts at the endothelial cell level reducing inflammatory responses. *Acta Physiol Scand* 1985;123:221-224.
295. Tsurufuji S, Sugio K, Takemasa F. The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. *Nature* 1979;280:408-410.
296. Foty RA, Corbett SA, Schwarzbauer JE, Steinberg MS. Dexamethasone up-regulates cadherin expression and cohesion of HT-1080 human fibrosarcoma cells. *Cancer Res* 1998;58:3586-3589.
297. Pisu M, James N, Sampsel S, Saag KG. The cost of glucocorticoid-associated adverse events in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:781-788.
298. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci* 2019;20:1811.
299. Mora-Martinez C. Expression pattern determines regulatory logic. *PLoS One* 2021;16:e0244864.

300. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. A Novel Arachidonic Acid-Selective Cytosolic Pla2 Contains a Ca<sup>2+</sup>-Dependent Translocation Domain with Homology to Pkc and Gap. *Cell* 1991;65:1043-1051.
301. Inoue H, Umesono K, Nishimori T, Hirata Y, Tanabe T. Glucocorticoid-mediated suppression of the promoter activity of the cyclooxygenase-2 gene is modulated by expression of its receptor in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:292-298.
302. Kim SR, Bae SK, Park HJ, Kim MK, Kim K, Park SY, Jang HO, Yun I, Kim YJ, Yoo MA, Bae MK. Thromboxane A<sub>2</sub> increases endothelial permeability through upregulation of interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;397:413-419.
303. Nakahata N. Thromboxane A<sub>2</sub>: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2008;118:18-35.
304. Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Arthritis Res Ther* 2005;7:114-117.
305. Negri J, Early SB, Steinke JW, Borish L. Corticosteroids as inhibitors of cysteinyl leukotriene metabolic and signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1232-1237.
306. Qu W, Bradbury JA, Tsao CC, Maronpot R, Harry GJ, Parker CE, Davis LS, Breyer MD, Waalkes MP, Falck JR, Chen J, Rosenberg RL, Zeldin DC. Cytochrome P450 CYP2J9, a new mouse arachidonic acid omega-1 hydroxylase predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 2001;276:25467-25479.
307. Oakley RH, Revollo J, Cidlowski JA. Glucocorticoids regulate arrestin gene expression and redirect the signaling profile of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:17591-17596.
308. Fishel RS, Eisenberg S, Shai SY, Redden RA, Bernstein KE, Berk BC. Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1995;25:343-349.
309. Ryan US, Ryan JW, Whitaker C, Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell* 1976;8:125-145.
310. Dasarathy Y, Lanzillo JJ, Fanburg BL. Stimulation of bovine pulmonary artery endothelial cell ACE by dexamethasone: involvement of steroid receptors. *Am J Physiol* 1992;263:L645-649.
311. Krulewicz AH, Baur WE, Fanburg BL. Hormonal influence on endothelial cell angiotensin-converting enzyme activity. *Am J Physiol* 1984;247:C163-168.
312. Mendelsohn FA, Lloyd CJ, Kachel C, Funder JW. Induction by glucocorticoids of angiotensin converting enzyme production from bovine endothelial cells in culture and rat lung in vivo. *J Clin Invest* 1982;70:684-692.
313. Diaz-Jimenez D, Petrillo MG, Busada JT, Hermoso MA, Cidlowski JA. Glucocorticoids mobilize macrophages by transcriptionally up-regulating the exopeptidase DPP4. *J Biol Chem* 2020;295:3213-3227.
314. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004;84:869-901.
315. Duong CN, Nottebaum AF, Butz S, Volkery S, Zeuschner D, Stehling M, Vestweber D. Interference With ESAM (Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule) Plus Vascular Endothelial-Cadherin Causes Immediate Lethality and Lung-Specific Blood Coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40:378-393.

316. Blecharz KG, Drenckhahn D, Forster CY. Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:1139-1149.
317. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1992;118:1511-1522.
318. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9815-9820.
319. Frye M, Dierkes M, Kuppers V, Vockel M, Tomm J, Zeuschner D, Rossaint J, Zarbock A, Koh GY, Peters K, Nottebaum AF, Vestweber D. Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J Exp Med* 2015;212:2267-2287.
320. Bouillet L, Mannic T, Arboleas M, Subileau M, Massot C, Drouet C, Huber P, Vilgrain I. Hereditary angioedema: key role for kallikrein and bradykinin in vascular endothelial-cadherin cleavage and edema formation. *J Allergy Clin Immunol* 2011;128:232-234.
321. Gavard J. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett* 2009;583:1-6.
322. Michaelis UR, Falck JR, Schmidt R, Busse R, Fleming I. Cytochrome P450C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:321-326.

# Anhang

## Anhang 1: Auflistung weiterer mittels Microarray-Genexpressions-analyse untersuchter Gene (P > 0,05)

### Protein

guanine nucleotide binding protein, alpha 12  
 guanine nucleotide binding protein, alpha 13  
 guanine nucleotide binding protein, alpha 14  
 guanine nucleotide binding protein, alpha 15  
 guanine nucleotide binding protein, alpha O  
 guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide  
 phospholipase C, beta 2  
 phospholipase C, beta 3  
 phospholipase C, beta 4  
 protein kinase C, beta  
 protein kinase C, delta  
 protein kinase C, delta binding protein  
 protein kinase C, epsilon  
 protein kinase C, eta  
 protein kinase C, gamma  
 protein kinase C, iota  
 protein kinase C, theta  
 protein kinase C, zeta  
 calmodulin 2  
 calmodulin 3  
 calmodulin 4  
 calmodulin 5  
 nitric oxide synthase 1, neuronal  
 nitric oxide synthase 2, inducible  
 guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3; microRNA 7010  
 guanylate cyclase 1, soluble, beta 2  
 guanylate cyclase 1, soluble, beta 3  
 guanylate cyclase 2c  
 guanylate cyclase 2d  
 guanylate cyclase 2e  
 guanylate cyclase 2f  
 guanylate cyclase 2g  
 protein kinase, cGMP-dependent, type II  
 adenylate cyclase 2  
 adenylate cyclase 3  
 adenylate cyclase 4  
 adenylate cyclase 5  
 adenylate cyclase 6  
 adenylate cyclase 7

### Gen

Gna12  
 Gna13  
 Gna14  
 Gna15  
 Gnao1  
 Gnaq  
 Plcb2  
 Plcb3  
 Plcb4  
 Prkcb  
 Prkcd  
 Prkcdbp  
 Prkce  
 Prkch  
 Prkcg  
 Prkci  
 Prkcq  
 Prkcz  
 Calm2  
 Calm3  
 Calm4  
 Calm5  
 Nos1  
 Nos2  
 Gucy1a3; Mir7010  
 Gucy1b2  
 Gucy1b3  
 Gucy2c  
 Gucy2d  
 Gucy2e  
 Gucy2f  
 Gucy2g  
 Prkg2  
 Adcy2  
 Adcy3  
 Adcy4  
 Adcy5  
 Adcy6  
 Adcy7

**Protein**

adenylate cyclase 8  
 adenylate cyclase 9  
 adenylate cyclase 10  
 protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I beta  
 protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha  
 protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha  
 protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta  
 protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta  
 claudin 2  
 claudin 3  
 claudin 4  
 claudin 6  
 claudin 7  
 claudin 8  
 claudin 9  
 claudin 10  
 claudin 11  
 claudin 12  
 claudin 13  
 claudin 14  
 claudin 15  
 claudin 16  
 claudin 17  
 claudin 18  
 claudin 19  
 claudin 20  
 claudin 22  
 claudin 23  
 claudin 24  
 claudin 34, pseudogene  
 claudin 34A  
 claudin 34B1  
 claudin 34B2  
 claudin 34B3  
 claudin 34B4  
 claudin 34C1  
 claudin 34C2  
 claudin 34C3  
 claudin 34C4  
 claudin 34D  
 tetraspanin 2  
 tetraspanin 3  
 tetraspanin 4  
 tetraspanin 5  
 tetraspanin 6  
 tetraspanin 7  
 tetraspanin 7 pseudogene

**Gen**

Adcy8  
 Adcy9  
 Adcy10  
 Prkar1b  
 Prkar1a  
 Prkar2a  
 Prkar2b  
 Prkacb  
 Cldn2  
 Cldn3  
 Cldn4  
 Cldn6  
 Cldn7  
 Cldn8  
 Cldn9  
 Cldn10  
 Cldn11  
 Cldn12  
 Cldn13  
 Cldn14  
 Cldn15  
 Cldn16  
 Cldn17  
 Cldn18  
 Cldn19  
 Cldn20  
 Cldn22  
 Cldn23  
 Cldn24  
 Cldn34-ps  
 Cldn34a  
 Cldn34b1  
 Cldn34b2  
 Cldn34b3  
 Cldn34b4  
 Cldn34c1  
 Cldn34c2  
 Cldn34c3  
 Cldn34c4  
 Cldn34d  
 Tspan2  
 Tspan3  
 Tspan4  
 Tspan5  
 Tspan6  
 Tspan7  
 Gm5334

**Protein**

tetraspanin 8  
 tetraspanin 9  
 tetraspanin 10  
 tetraspanin 11  
 tetraspanin 12  
 tetraspanin 13  
 tetraspanin 14  
 tetraspanin 15  
 tetraspanin 17  
 tetraspanin 18  
 tetraspanin 31  
 tetraspanin 32  
 tetraspanin 33  
 junction adhesion molecule 2  
 junction adhesion molecule 3  
 tight junction protein 2  
 tight junction protein 3  
 catenin (cadherin associated protein), alpha 1  
 catenin (cadherin associated protein), alpha 2  
 catenin (cadherin associated protein), alpha 3  
 catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1  
 catenin (cadherin associated protein), delta 1  
 catenin (cadherin associated protein), delta 2  
 cadherin 1  
 cadherin 2  
 cadherin 3  
 cadherin 4  
 cadherin 6  
 cadherin 7, type 2  
 cadherin 8  
 cadherin 9  
 cadherin 10  
 cadherin 11  
 cadherin 11 pseudogene  
 cadherin 11 pseudogene  
 cadherin 12  
 cadherin 13  
 cadherin 15  
 cadherin 16  
 cadherin 17  
 cadherin 18  
 cadherin 19, type 2  
 cadherin 20  
 cadherin 22  
 cadherin 23 (otocadherin)

**Gen**

Tspan8  
 Tspan9  
 Tspan10  
 Tspan11  
 Tspan12  
 Tspan13  
 Tspan14  
 Tspan15  
 Tspan17  
 Tspan18  
 Tspan31  
 Tspan32  
 Tspan33  
 Jam2  
 Jam3  
 Tjp2  
 Tjp3  
 Ctnna1  
 Ctnna2  
 Ctnna3  
 Ctnnal1  
 Ctnnd1  
 Ctnnd2  
 Cdh1  
 Cdh2  
 Cdh3  
 Cdh4  
 Cdh6  
 Cdh7  
 Cdh8  
 Cdh9  
 Cdh10  
 Cdh11  
 6820431F20Rik; 2610005L07Rik  
 2610005L07Rik  
 Cdh12  
 Cdh13  
 Cdh15  
 Cdh16  
 Cdh17  
 Cdh18  
 Cdh19  
 Cdh20  
 Cdh22  
 Cdh23

## Publikationen

### Originalarbeiten

Krybus M, Sieradzki M, Fahimi E, Metry S, Nüsing R, Geisslinger G, Steiner I, Daldrup T, Lehr M, Kojda G. *Contribution of cyclooxygenase-1-dependent prostacyclin synthesis to bradykinin-induced dermal extravasation*. Biomed Pharmacother. 2022;148:112786.

Daten der Abbildungen 21 bis 30, 31B und 33 bis 35 dieser Dissertation sind Bestandteil der oben genannten Originalarbeit oder im dazugehörigen Supplement integriert und wurden bei Einführung der Abbildungen als solche kenntlich gemacht.

Beitrag zur Publikation: Miles Assays, ELISAs, Sammlung, Zusammenstellung und Analyse der Daten, Verfassen des Manuskripts

Gholamreza-Fahimi E, Bisha M, Hahn J, Straßen U, Krybus M, Khosravani F, Hoffmann TK, Hohlfeld T, Greve J, Bas M, Twarock S, Kojda G. *Cyclooxygenase activity in bradykinin-induced dermal extravasation. A study in mice and humans*. Biomed Pharmacother. 2020;123:109797.

Beitrag zur Publikation: Miles Assays

## Kongressbeiträge

Krybus M, Sieradzki M, Fahimi E, Metry S, Nüsing R, Geisslinger G, Steiner I, Daldrup T, Lehr M, Kojda G. *Determination of COX-1-derived prostacyclin as a key mediator in bradykinin-induced dermal extravasation*. Posterpräsentation auf der 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 7.-10. März 2022, Digital. Publiziert in: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2022;395(Suppl 1):1-80. Seite 3, Poster 29.

Metry S, Krybus M, Kocgirli O, Suvorava T, Kojda G. *Differential signalling of endothelial B2 receptors in small blood vessels and aorta*. Posterpräsentation auf der 88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 7.-10. März 2022, Digital. Publiziert in: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2022;395(Suppl 1):1-80. Seite 42, Poster 199.

Krybus M, Gholamreza-Fahimi E, Khosravani F, Bisha M, Kojda G. *Specific COX-dependent signaling of bradykinin in small dermal blood vessels of mice*. Posterpräsentation auf der 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 1.-3. März 2021, Digital. Publiziert in: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2021;394(Suppl 1):S1-S61. Seite S26, Poster P01.

Krybus M, Gholamreza-Fahimi E, Khosravani F, Bisha M, Kojda G. *Relative importance of NO and prostaglandins as mediators of bradykinin-induced skin edema in mice*. Posterpräsentation auf der 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 2.-5. März 2020, Leipzig. Publiziert in: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2020;393(Suppl 1):S1-S97. Seite S65, Poster P151.

Gholamreza-Fahimi E, Krybus M, Bisha M, Kurz T, Hansen FK, Kojda G. *AT2 activation reduces ACE activity*. . Posterpräsentation auf der 86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 2.-5. März 2020, Leipzig. Publiziert in: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2020;393(Suppl 1):S1-S97. Seite S64, Poster P150.

Krybus M, Gholamreza-Fahimi E, Khosravani F, Bisha M, Kojda G. *Role of prostaglandins in bradykinin-induced skin edema in mice*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPHG), 1.-4. September 2019, Heidelberg.



Gholamreza-Fahimi E, Bisha M, Hahn J, Straßen U, Krybus M, Khosravani F, Hoffmann T, Hohlfeld T, Greve J, Bas M, Twarock S, Kojda G. *A bradykinin in skin edema trial (ABRASE) – implications for non-allergic angioedema*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 1.-4. September 2019, Heidelberg.

Gholamreza-Fahimi E, Bisha M, Krybus M, Kurz T, Hansen FK, Kojda G. *Activation of AT2 potentiates bradykinin-induced extravasation – role of ACE*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 1.-4. September 2019, Heidelberg.

## Übersichtsarbeiten

Krybus M. *Stellenwert der Prostanoiden für (Patho-) Physiologie und Pharmakotherapie*. Fortbildungstelegramm Pharmazie. 2021;15(4):198-232.

Krybus M, Gholamreza-Fahimi E. *ACE – Schlüsselenzym kardiovaskulärer Regulation*. Fortbildungstelegramm Pharmazie. 2019;13(4):165-184.

# Lebenslauf

## Persönliches

Name	Michael Thomas Krybus
Geburtsdatum	20. August 1990
Geburtsort	Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

## Promotion

11/2018 – 01/2022	Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Georg Kojda  Thema: „Rolle der Prostanoiden bei der Entstehung Bradykinin-induzierter Angioödeme“
-------------------	--

## Studium

11/2017	Erteilung der Approbation als Apotheker
11/2015 – 05/2017	Philipps-Universität Marburg, Chemie, Master of Science
10/2011 – 10/2015	Philipps-Universität Marburg, Pharmazie, Staatsexamen

## Zivildienst

09/2010 – 09/2011	Deutsches Rotes Kreuz, Kreisverband Dinslaken-Voerde-Hünxe e.V.
-------------------	---

## Schule

2001 – 2010	Kopernikus-Gymnasium Walsum, Duisburg
-------------	---------------------------------------

Düsseldorf, 22.07.2022

## Finanzierung und Danksagung

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG-Projekt Nummer 408212167) sowie durch weitere Mittel des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Jens Fischer.

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Georg Kojda danken, der durch seine ungebrochene Neugier und Begeisterung für die Wissenschaft die erforderlichen Drittmittel für dieses spannende Projekt eingeworben und mir das Vertrauen geschenkt hat, an diesem zu arbeiten und fachlich sowie persönlich zu wachsen. Die regelmäßigen und konstruktiven Gespräche haben stets neue Denkansätze und Sichtweisen ermöglicht und maßgeblich zum Erfolg dieses Projekts beigetragen.

Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Rolf Nüsing und Prof. Dr. Gerd Geisslinger für die Bereitstellung der COX-1-defizienten Mauslinie, ohne die entscheidende Erkenntnisse dieser Arbeit weiterhin im Dunkeln geblieben wären. Gleiches gilt auch für Prof. Dr. Matthias Lehr sowie Dr. Stefanie Bovens, die den cPLA<sub>2</sub>α-Inhibitor SB296 synthetisiert bzw. großzügig zur Verfügung gestellt haben.

Zudem bin ich sehr dankbar für die zum Schluss erfolgreiche Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf um Prof. Dr. Thomas Daldrup, Irina Steiner und Maximilian Dröge, deren Expertise auf dem Gebiet der LC-MS/MS dabei geholfen hat, entscheidende Ergebnisse dieser Arbeit zu festigen.

Ich möchte ebenfalls allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts danken, die mir in der Zeit der Promotion mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Insbesondere danke ich Ehsan Fahimi und Oktay Kocgirli, die mich von Beginn an begleitet haben, für die professionelle Einarbeitung und die bis zum Ende gute und erfolgreiche Zeit im Labor und Büro. Zudem danke ich Sara Metry, Marc Sieradzki, Luzhou Wang und Heba Zabri, die im Laufe meiner Promotion dazu gestoßen sind, für die professionelle und soziale Unterstützung insbesondere am Ende der Promotionszeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meiner Freundin danken, die mich über viele Jahre unterstützt und so alles erst ermöglicht haben.

## Eidesstattliche Erklärung

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

Ich bestätige ferner, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch in keinem anderen Prüfungsverfahren und nur an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingereicht wurde.

A handwritten signature in black ink, enclosed in a light gray rectangular box. The signature is stylized and appears to read 'Michael Krybus'.

Michael Krybus

Düsseldorf, 22.07.2022