

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

und

**dem Institut für Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf**

Einfluss des NO/cGMP-Signalwegs auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Oktay Koçgirli

Tierarzt

aus Düsseldorf

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4338

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Georg Kojda
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

bradykinin, receptorss, binding sites, stimulation, signal transduction, cardiovascular system, smooth muscle aorta

Tag der Promotion: 12.07.2022

Für meinen Vater Salih Koçgirli

20.02.1946 - 13.10.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 NO/cGMP Signalweg	2
2.1.1. Endogenes NO	2
2.1.2. Stickstoffmonoxid Synthase (NOS)	2
2.1.2.1. Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	4
2.1.2.2. Neuronale NO-Synthase (nNOS)	5
2.1.2.3. Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	5
2.1.3. Guanylylcyclase (GC)	8
2.1.3.1. Lösliche Guanylylcyclase (sGC)	9
2.1.4. Cyclisches Guanosinmonophosphat	10
2.1.4.1. Proteinkinasen	11
cGMP-abhängige Proteinkinase	11
cAMP-abhängige Proteinkinase	12
2.1.4.2. Zyklische Nukleotid-gesteuerte Kanäle	13
2.1.4.3. Phosphodiesterasen	13
2.2. Kallikrein-Kinin-System	14
Plasma-Kallikrein	14
Gewebs-Kallikrein	17
2.2.1 Bradykinin	17
2.2.2 Bradykinin Rezeptoren	18
2.2.3 Physiologische und pathophysiologische Funktionen von Bradykinin und Bradykinin Rezeptoren	18

3. Material und Methoden	21
3.1. Substanzen und Lösungen	21
3.2. Western-Blot	24
3.2.1. Lysierung der Organe	24
3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	24
3.2.3. Deglykosylierung	25
3.2.4. Allgemeines Western-Blot-Protokoll	25
3.3. Präparation und Analyse der RNA	28
3.3.1. RNA Isolierung	28
3.3.2. Konzentrationsbestimmung der RNA	29
3.3.3. RNA Analyse	29
3.3.4. Bradykinin Rezeptor Expressionsanalyse	30
3.4. Versuchstiere	30
3.4.1. Fütterungsversuche	31
3.4.1.1. Fütterungsversuch mit dem organischen Nitrat PETN	31
3.4.1.2. Fütterungsversuch mit L-Nitroarginin	31
3.4.2. Genotypisierung transgener Tiere	31
3.4.3. Präparation und Entnahme der Gewebe	34
3.5. Zellkultur	34
3.5.1. Isolierung der Schweine-Aorten-Endothelzellen	34
Methode 1	35
Methode 2	36
Methode 3	36
3.5.2. Isolierung der glatten Muskelzellen	37
Methode 1	37
Methode 2	38
3.5.3. Isolierung der humanen venösen Endothelzellen der Nabelschnüre	38

3.5.4. Aufreinigung der Zellen	38
3.5.5. Isolierung von DNA aus Zellkulturen	38
3.5.6. Geschlechtsspezifische PCR	39
3.5.7. Handhabung der Zellen	40
3.5.7.1. Fütterung der Zellen	40
3.5.7.2. Passagierung der Zellen	40
Trypsinieren	40
Schaben	41
3.5.7.3. Zellzahl Bestimmung	41
3.5.7.4. Lysierung der Zellen	41
3.5.7.5. Inkubation der Zellen	42
3.6. Immunzytochemie	42
3.7. Funktionelle Untersuchungen	43
3.7.1. Präparation der Schweinekoronarien	43
3.7.2. Präparation der Mauseiten	43
3.7.3. Entfernung des Endothels	43
3.7.4. Apparatur und Kalibrierung	44
3.7.5. Einhängen	45
3.7.6. Äquilibrierung	45
3.7.7. Kontraktionstest	45
3.7.8. Endothel Test	45
3.7.8.1 Endothel Test der Schweinekoronarien	45
3.7.8.2 Endothel Test der Mauseiten	46
3.7.9. Inkubationsversuch der Schweinekoronarien	46
3.8. Statistik	46
4. Ergebnisse	47
4.1. Evaluierung der gegen den Bradykinin B2-Rezeptor gerichteten Antikörper	47

4.1.1. Bradykinin B2-Rezeptorexpressionsanalyse mittels PCR	47
4.1.2. Die Bradykinin B2-Rezeptor Antikörper Auswahl	48
4.2. Transgene Tiere	50
4.2.1. Die Bradykinin B2-Rezeptor Antikörper Auswahl	50
eNOS ^{tg} Mäuse	50
eNOS defiziente Mäuse (eNOS ^{-/-})	50
4.2.2. Bradykinin B2-Rezeptorexpression in eNOS ^{tg} Mäusen	51
4.2.3. Bradykinin B2-Rezeptor Expression in eNOS defizienten Mäusen	51
4.2.4. Funktionalität der Bradykinin B2-Rezeptor in eNOS defizienten Mäusen	54
4.3. Fütterung mit PETN	54
4.4. Bradykinin B2-Rezeptorexpression in L-Nitroarginin behandelten Tieren	55
4.5. Einfluss von NO auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Zellen	56
4.5.1. SNAP Inkubation der PAECs	56
4.5.2. DETA/NO Inkubation der PAECs	57
4.5.3. L-NAME Inkubation der PAECs	58
4.5.4. SNAP Inkubation der PSMC	59
4.6. Einfluss von Moexipril und Bradykinin auf den Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Zellen	60
4.6.1 Einfluss von Moexipril und Bradykinin auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAEC	60
4.6.2 Einfluss von Moexipril und Bradykinin auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in HDBEC	62
4.7. Einfluss von Fibrinogen auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression	62
4.7.1. Fibrinogen Inkubation der HUVECs	63
4.7.2. Fibrinogen Inkubation der PAEC	64
4.7.3. Fibrinogen Inkubation der UDSCC 2	64

4.8. Einfluss von Fibrinogen auf die Aktivität der Bradykinin B2-Rezeptoren	66
4.9. Einfluss von Fibrinogen auf die Funktionalität der Koronararterien durch NO	68
5. Diskussion	69
5.1. Aktivierung des NO/cGMP-Signalweg <i>in-vivo</i>	69
5.1.1. Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges durch genetische Veränderung der eNOS in Mäusen	69
5.1.2. Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges durch Behandlung von Mäusen mit dem NO-Donator PETN	71
5.2. Hemmung des NO/cGMP-Signalweges <i>in-vivo</i>	73
5.2.1. Hemmung des NO/cGMP-Signalweges durch genetische Veränderung der eNOS in Mäusen	73
5.2.2. Einfluss der Deaktivierung des NO/cGMP-Signalweges auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression <i>in-vivo</i>	75
5.3. Einfluss des NO/cGMP-Signalweges auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression <i>in-vitro</i>	77
5.4. Einfluss von endogenem und exogenem Bradykinin auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression <i>in-vitro</i>	79
5.5. Einfluss von Fibrinogen auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression und –aktivität <i>in-vitro</i>	82
6. Zusammenfassung	85
7. Summary	87
8. Literaturverzeichnis	88
Publikationsverzeichnis	129
Danksagung	131
Finanzierungsquellen	132
Interessenskonflikt	133

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1:** Beispielbilder des Pfeilschwanzkrebses
- Abbildung 2.2:** Schema der NO-Synthese durch die NOS
- Abbildung 2.3:** Struktur der eNOS und das Schema der NOS enzymkatalysierten Reaktionen
- Abbildung 2.4:** Struktur und Aktivierung der sGC Domäne.
- Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung der PKG-Aktivität
- Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung der plasmatischen Synthese von Bradykinin auf der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen
- Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung der Proteolyse von Bradykinin
- Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung des Tie-2-eNOS-Plamids mit markierten Schnittstellen für ausgewählte Restriktionsenzyme
- Abbildung 3.2:** Ein Bild der Präparationsapparatur
- Abbildung 3.3:** Beispiel Bilder von ungereinigte Schweineaorta, gereinigte Schweineaorta, und Apparaturen zur Fixierung der Aortensegmente
- Abbildung 3.4:** Beispielbilder von verschließen der Arteriae intercostalis von Schweineaorten
- Abbildung 3.5:** Zellzahl-Bestimmungs-Formel
- Abbildung 3.6:** Beispielbilder von Organbad Apparaturen
- Abbildung 4.1:** Beispiel der Analyse der mRNA-Expression des Bradykinin B2-Rezeptors
- Abbildung 4.2:** Beispiel einer Analyse der mRNA-Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in PAEC und PSMC
- Abbildung 4.3:** Beispielbilder von die Western-Blots mit der Detektion der Bradykinin B2-Rezeptor Proteinexpression in Tumorzellen.
- Abbildung 4.4:** Beispielbild für die Genotypisierung-PCR der transgenen Mauslinie eNOS^{tg}
- Abbildung 4.5:** Beispielbild für die Genotypisierung-PCR der eNOS defiziente Mäuse
- Abbildung 4.6:** Darstellungen der Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in transgenen Mäusen
- Abbildung 4.7:** Darstellungen der Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in eNOS defizienten Mäusen
- Abbildung 4.8:** Darstellungen der Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in eNOS defizienten Mäusen
- Abbildung 4.9:** Auswirkung der Hemmung der Bildung von NO, von Prostaglandinen und von Prostaglandinen und NO auf die Bradykinin-induzierte Vasokonstriktion

- Abbildung 4.10:** Darstellungen der Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in NO-Donator gefütterten Mäuse.
- Abbildung 4.11:** Darstellungen der Effekt des NOS-Inhibitors L-NA auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression
- Abbildung 4.12:** Darstellungen der Effekt des NO-Donators SNAP auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAEC
- Abbildung 4.13:** Darstellung der Wirkung von DETA/NO auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAECs
- Abbildung 4.14:** Darstellung der Effekt des NOS-Inhibitors L-NAME auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAEC
- Abbildung 4.15:** Darstellungen der Effekt des NO-Donators SNAP auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren in PSMC
- Abbildung 4.16:** Darstellungen der Wirkung verschiedener Kombinationen von Moexipril und Bradykinin auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren in PAEC
- Abbildung 4.17:** Darstellung der Effekte von Moexipril und Bradykinin auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren in Endothelzellen aus menschlichen dermalen Blutgefäßen.
- Abbildung 4.18:** Darstellung der Effekte von 15 μ M Fibrinogen und 1 μ M Melagatran auf die Expression von Bradykinin B2-Rezeptoren in HUVEC
- Abbildung 4.19:** Darstellungen der Wirkung verschiedener Kombinationen von Fibrinogen und Melagatran auf die Expression von Bradykinin B2-Rezeptoren in PAEC
- Abbildung 4.20:** Darstellungen der Effekte von Fibrinogen ohne und mit Melagatran auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in UDSSC 2 Zellen
- Abbildung 4.21:** Darstellung der Effekte von Fibrinogen auf die Aktivität von Bradykinin in PAEC
- Abbildung 4.22:** Auswirkung von Fibrinogen auf die NO-induzierte Vasorelaxation isolierter porciner Koronararterien mit mechanisch entferntem Endothel.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Zusammensetzung der TAE-Puffer
Tabelle 2.2:	Zusammensetzung der TAE-Puffer
Tabelle 2.3:	Zusammensetzung der 10-fache TBE-Puffer
Tabelle 2.4:	Zusammensetzung der DNA-Auftragspuffer
Tabelle 2.5:	Zusammensetzung der Agarosegelpuffer
Tabelle 2.6:	Zusammensetzung der OD-Mess-Puffer
Tabelle 2.7:	Zusammensetzung der RIPA-Lysis-Puffer
Tabelle 2.8:	Zusammensetzung der Bradford-Reagenz
Tabelle 2.9:	Zusammensetzung der 4-fachTrenngelpuffer
Tabelle 2.10:	Zusammensetzung der Sammelgelpuffer
Tabelle 2.11:	Zusammensetzung der Lysispuffer für Proteinpräparationen (mit Phosphataseinhibitoren)
Tabelle 2.12:	Zusammensetzung der Krebs-HEPES Puffer
Tabelle 2.13:	Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Puffer
Tabelle 2.14:	Zusammensetzung der SDS-Probenpuffer
Tabelle 2.15:	Zusammensetzung der 10-fache- SDS-Laufpuffer
Tabelle 2.16:	Zusammensetzung der Transfer Puffer
Tabelle 2.17:	Zusammensetzung der TBST-Puffer
Tabelle 2.18:	Zusammensetzung der Strippingpuffer
Tabelle 2.19:	Zusammensetzung der Lysis-Puffer für Mausschwanzspitzen
Tabelle 2.20:	In Experimenten verwendete Antikörper
Tabelle 2.21:	Für die Inkubation der Zellen verwendete Substanzen.

Abkürzungsverzeichnis

xg -	fache Erdbeschleunigung
AAE	erworbenes Angioödem
Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APP	Aminopeptidase P
APS	Ammonium Persulfate
BH₄	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin (Tetrahydrobiopterin)
BK_{Ca}	Leitfähigkeit Kalzium
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
C57Bl/6	C57 Black 6 Mäuse
Ca²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CO₂	Kohlendioxid
CPN	Carboxypeptidase N
DETA/NO	Diethylentriamin/Stickstoffmonoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EDHF	endotheliale Hyperpolarisations-Faktor
EDRFs	Endothel stammende Relaxationsfaktoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Verbessertes grün fluoreszierende Protein
ELK	EAG-ähnliche (Eag-Like) Kalium Kanäle
eNOS	endogene Stickstoffmonoxid Synthase
eNOS^{-/-}	eNOS-defiziente Mäuse
eNOSⁿ	transgen negative Wurfgeschwister der eNOS ^{tg} Tiere
eNOS^{tg}	transgene Mäuse mit endothelspezifischer Überexpression der eNOS

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Guanylylcyclase
GFP	Grün-fluoreszierende Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HAE	hereditäres Angioödem
HCN	hyperpolarisationsaktivierte Kationenkanäle
HDBEC	menschliche dermale Blut-Endothelzellen
HEK293	menschliche embryonale Nierenzellen
HEL 299	Humane embryonale Fibroblasten aus der Lunge
HMWK	Hochmolekulares Kininogen
HSWP	humane Vorhaut Fibroblasten
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells (Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen)
IAE	idiopathisches Angioödem
IL-1	Interleukin-1
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IP₃	Inositoltrisphosphat
K⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KHP	Krebs-Hepes Puffer
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LMWK	niedermolekulares Kininogen
L-NA	NG-Nitro-L-arginin
L-NAME	N ^G -Nitro-L-argininmethylester
L-NIO	N-Iminoethyl-L-ornithin
L-NMMA	L-NMMA N ^G -Monomethyl-L-Arginin
MeOH	Methanol
mRNA	messenger-(Boten-)RNA
Na⁺	Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid Synthase

NO	Stickstoffmonoxid
NO₂	Stickstoffdioxid
NO₃	Stickstofftrioxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
PAE	pseudoallergisches Angioödem
PAEC	porcine Aorten-Endothelzellen
PBS	Phosphatpuffer Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDEs	Phosphodiesterasen
PEDN	Pentaerithryldinitrat
PEMN	Pentaerithrylmononitrat
PETN	Pentaerythritol-Tetranitrat
pg	picogramm
pGC	membrangebundene Guanylylcyclase
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PPIX	Protoporphyrin IX
PRCP	Prolylcarboxypeptidase
PSMC	porcine Aorten-glatte Muskelzellen
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAE	RAAS-induzierte Angioödem
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SHR	spontan hypertensive Ratten
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-Penicillamin
ST	bakterielle hitzestabile Enterotoxin
TBST	Tris-Buffered Saline plus Tween 20
TEMED	N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine
TNF-α	Tumornekrosefaktor
UDSCC 2	University Duesseldorf Squamous Carcinoma Cells 2
UDSCC 3	University Duesseldorf Squamous Carcinoma Cells 3
VASP	Vasodilatator-stimulierenden Phosphoprotein

VEGFR vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor

1. Einleitung

Weltweit tragen kardiovaskuläre Erkrankungen als signifikanter Risikofaktor zur hohen Morbidität und Mortalität bei. Die Anzahl der an Hypertonie Erkrankten liegt bei der Gesamtbevölkerung etwa zwischen 30 und 40 % (Mancia et al. 2013).

Der NO/cGMP Signalweg ist ein sehr wichtiger Regulator für die Funktion des Herz-Kreislauf-Systems. So ist bekannt, dass die Bioverfügbarkeit von NO (Stickstoffmonoxid) bei pathophysiologischen Zuständen wie Bluthochdruck, Diabetes Typ II und koronarer Herzerkrankungen abnimmt (Kojda und Harrison 1999). Diesbezüglich spielen Therapien mit ACE-Hemmern, die die Verfügbarkeit von NO verbessern können, eine wichtige Rolle für die Behandlung von Bluthochdruck, Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion, Diabetes und teilweise auch der koronaren Herzkrankheit. Sie haben eine sehr breite Wirkung: Sie reduzieren das Risiko für Mortalität, Schlaganfall, Herzinfarkt, Diabetes und Nierenfunktionsstörungen (White 2003).

In der Pathophysiologie des nicht allergischen Angioödems könnte der NO/cGMP Signalweg eine wesentliche Rolle spielen. Der erste Bericht von Angioödem durch ACE-Hemmer-Therapie stammt von Wilkin et al. im Jahr 1980 (Wilkin et al. 1980). Tierexperimentelle Befunde zeigten, dass ACE-Hemmer auch das Bradykinin-induzierte Fußsohlen-Ödem bei der Ratte verstärken (Jouquey et al. 1988).

Bei Patienten unter ACE-Hemmer-Therapie ist vermutlich die Bradykininkonzentration erhöht (Regoli und Barabe 1980; Bönner et al. 1990). Dennoch tritt ein Angioödem nur gelegentlich (0,1 bis 0,4 %) bei diesen Patienten auf (Vleeming et al. 1998). Daher müssen noch weitere Faktoren existieren, die die Bradykininwirkung beeinflussen oder möglicherweise unabhängig davon wirksam werden können. Bas et al. haben beispielsweise berichtet, dass Fibrinogen und C-reaktives Protein bei Patienten mit Angioödem signifikant erhöht waren (Bas et al. 2005).

In dieser Arbeit werden nun die Effekte des NO/cGMP-Signalweges und Fibrinogen auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression intensiver erforscht und eine mögliche Beteiligung des NO/cGMP-Signalweges überprüft.

2. Literaturübersicht

2.1 NO/cGMP-Signalweg

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des durch Stickstoffmonoxid übermittelten Signalweges, welcher letztlich zur Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt. Die Basis dieses Signalwegs ist, dass die Guanylylcyclase (GC) Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP umwandelt. Die Guanylylcyclase wird dabei durch NO, Peptidliganden und die Höhe der intrazellulären Ca^{+2} -Konzentration aktiviert.

2.1.1. Endogenes NO

Robert F. Furchgott fand 1980 heraus, dass Acetylcholin nur Blutgefäße mit intakter endothelialer Schicht dilatieren konnte (Furchgott und Zawadzki 1980). Es deutete auch einiges daraufhin, dass das Endothel eine Substanz freisetzte, welche für diese Wirkung zuständig ist. Er benannte diese Substanz Endothelium-derived relaxing factor (EDRF). Später konnten Robert Furchgott, Louis Ignarro und Salvador Moncada, unabhängig voneinander, EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) identifizieren (Vanhoutte et al. ;Palmer et al. 1987;Furchgott 1988;Ignarro 1988). Palmer und Moncada identifizierten später das verantwortliche Enzym als endogene Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Palmer und Moncada 1989). Endogenes NO ist an vielen verschiedenen Körperfunktionen beteiligt. Es hat Einfluss auf die Regulation des Vasotonus, den Tonus der glatten gastrointestinalen und urogenitalen Muskulatur, die Thrombozytenaggregation, Funktionen des Immunsystems und die neuronale Erregungsübertragung im zentralen und autonomen Nervensystem (Moncada und Higgs 1991;Snyder und Bredt 1992;Moncada und Higgs 1993;Forstermann et al. 1994;Nathan und Xie 1994).

2.1.2. Stickstoffmonoxid Synthase (NOS)

Stickstoffmonoxid Synthase (NOS) ist auch in den Hämozyten des amerikanischen Pfeilschwanzkrebse (Limulus Polyphemus) (**Abb. 2.1**) aufzufinden. Die Pfeilschwanzkrebse existieren seit 500 Millionen Jahren, dieser Umstand verdeutlicht, dass die NOS auch einen früheren evolutionären Ursprung besitzt (Radomski et al. 1991a).

A



B

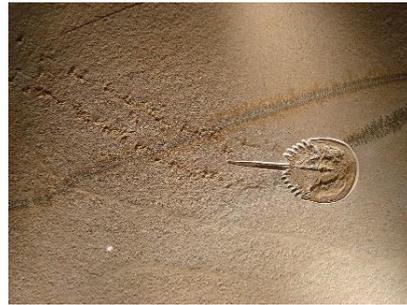


Abbildung 2.1: **A**, Beispielbild eines Pfeilschwanzkrebses (Von Shubham Chatterjee - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=27667459>). **B**, Bild eines Pfeilschwanzkrebs-Fossils (Von Ghedoghedo - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=11260866>).

Es sind bis zu diesem Zeitpunkt drei verschiedene Isoenzyme der NO-Synthase identifiziert worden. Die induzierbare (iNOS oder NOS II), die neuronale (nNOS oder NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS III). Wenn iNOS exprimiert wird, ist sie dauerhaft aktiv (konsekutiv). Die nNOS und eNOS dagegen werden konstitutiv exprimiert und ihre Aktivität ist dabei abhängig von der Ca^{2+} Konzentration und von Calmodulin (Forstermann et al. 1994).

Alle NO-Synthasen verwenden L-Arginin als Substrat, molekularen Sauerstoff sowie das reduzierte Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Co-Substrat. Cofaktoren aller Isoenzyme sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-Biopterin (BH_4). Sie fungieren auch als Oxygenasen und Reduktasen (Förstermann et al. 1991). Elektronen von NADPH in der Reduktase-Domäne werden durch die FAD und FMN zu dem Häm in die Oxygenase-Domäne transferiert. Die Oxygenase-Domäne bindet auch den essenziellen Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4), molekularen Sauerstoff und das Substrat L-Arginin (Crane et al. 1998; Alderton et al. 2001). Im Prinzip wird NO durch die NOS über zwei Stufen synthetisiert. In der ersten Stufe wird durch die NOS L-Arginin zu N^ω -hydroxy-L-Arginin hydroxyliert, die zweite Stufe stellt die Oxidation von N^ω -hydroxy-L-Arginin zu L-Citrullin und NO durch die NOS dar (Stuehr et al. 1991b; Noble et al. 1999; Stuehr et al. 2001) (**Abb. 2.2**). Das durch die NOS synthetisierte NO kann auf verschiedene Proteine und Enzyme wirken, aber der bedeutendste physiologische Signalweg ist dabei der NO/cGMP Signalweg.

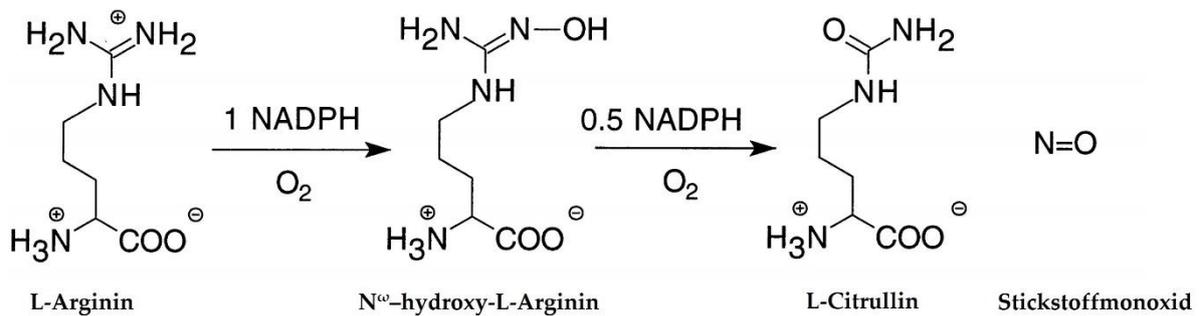


Abbildung 2.2: Schema der NO-Synthese durch die NOS. Enzymkatalysierte Reaktionen: Hydroxylierung des L-Arginin zu N^ω -hydroxy-L-Arginin und Oxidierung zu L-Citrullin und NO (Stuehr 1999).

2.1.2.1. Induzierbare NO-Synthase (iNOS)

In der Zelle wird die induzierbare NOS (iNOS) in der Regel nicht dauerhaft exprimiert, sondern durch bakterielle Lipopolysaccharide, Zytokine und andere Substanzen induziert. Ursprünglich wurde die induzierbare NO in Makrophagen identifiziert (Stuehr und Marletta 1985; Stuehr et al. 1991a). Nach Beginn der Expression ist die iNOS nicht von der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration abhängig und ist dauerhaft aktiv (Forstermann et al. 1994). Durch die iNOS produzieren Makrophagen große Mengen von NO, welches einen hohen antimikrobiellen Effekt aufweist (Nathan und Hibbs 1991). Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Reaktion kann NO auch direkt mit der DNA von Zielzellen interagieren und diese so schädigen. Auf diese Weise können z. B. auch Tumorzellen zerstört werden (Wink et al. 1991; Fehsel et al. 1993). Nicht nur Immunzellen, sondern auch andere Zellarten können die induzierbare NO bilden. Zum Beispiel nutzen Hepatozyten die induzierbare NO, um Malaria-Sporozoit zu bekämpfen und unschädlich zu machen (Green et al. 1990). Die hohe Menge von NO, produziert durch Immunzellen, ist nicht nur letal für Tumorzellen, Mikroben oder Parasiten, sondern auch für gesunde Zellen. Inflammationen und Autoimmunläsionen sind von aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten umgeben, welche hohe Mengen an NO produzieren. Dies führt zur Schädigung des Gewebes (Kröncke et al. 1991; Fehsel et al. 1993; Kröncke et al. 1993). Beim septischen Schock hat die Produktion von NO durch die iNOS ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Blutdruckregulation. Die hohe Menge des produzierten NO führt zur arteriellen Hypotonie, da NO die Vasodilatation induziert, ebenso kommt es durch das NO zu mikrovaskulären Schädigungen. Hauptgrund für die Entstehung der arteriellen Hypotonie ist also der Effekt von NO, welcher zur Vasodilatation führt (Macmicking et al. 1995; Lange et al. 2009).

2.1.2.2. Neuronale NO-Synthase (nNOS)

Ende der 80er-Jahre haben Forschungen gezeigt, dass in zerebralen Geweben und in neuronalen Zellen nach Stimulation mit Agonisten ein Wirkstoff freigesetzt wird, welcher die Guanylylcyclase stimuliert und NO ähnliche Eigenschaften aufweist (Garthwaite et al. 1988; Förstermann et al. 1989; Knowles et al. 1989; Bredt et al. 1990; Förstermann et al. 1990).

Die nNOS wird in spezifischen Neuronen konstitutiv exprimiert und durch die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration und durch Calmodulin reguliert. Dabei liegt sie in den zerebralen Zellen in löslicher und membrangebundener Form vor und befindet sich an verschiedenen subzellulären Lokalisationen (Zhou und Zhu 2009). Zusätzlich befindet sich die nNOS auch im Rückenmark, sympathischen Ganglien, Nebennieren, peripheren Nerven, in Epithelzellen verschiedener Organe, in Zellen der renalen Macula-Densa, Pankreas-Inselzellen und in vaskulären glatten Muskelzellen (Forstermann et al. 1994). In Bezug auf die Gewebemasse befindet sich mengenmäßig die meiste nNOS in der Skelettmuskulatur (Nakane et al. 1993).

Die nNOS spielt auch eine Rolle bei weiteren physiologischen Funktionen, so z. B. beim Lernen, der Erinnerung und der Neurogenese (Zhou und Zhu 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die NOS-Inhibition das Lernen beeinträchtigte und Amnesie in Tiermodellen verursachte (Hölscher und Rose 1992; Böhme et al. 1993).

NO, welches durch die nNOS im zentralen Nervensystem produziert wird, ist auch an der zentralen Blutdruckregulation beteiligt (Sakuma et al. 1992; Togashi et al. 1992; El Karib et al. 1993). Die Inhibition der nNOS-Aktivität in der Medulla oblongata und im Hypothalamus verursachte systemischen Bluthochdruck (Toda et al. 2009). nNOS und eNOS können *in vivo* auch verschiedene Rollen in der Regulation des humanen mikrovaskulären Tonus spielen (Melikian et al. 2009).

So konnte bereits gezeigt werden, dass die nNOS in vaskulären glatten Muskelzellen nur in sehr geringer Menge exprimiert wird. Ein Funktionsverlust der eNOS zeigt, dass diese geringe Menge jedoch einen gewissen Grad an Vasodilatation aufrechterhält. Die NO-Bildung der nNOS übt also eine kompensatorische Funktion aus, indem sie die NO-Bildung der fehlenden eNOS teilweise ersetzt (Schwarz et al. 1999).

2.1.2.3. Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Zwischen dem Blut und der Gefäßwand befindet sich eine Schicht aus Endothelzellen (Endothelium), welche das Gewebe mit dem Blut verbindet. Dabei wird die endotheliale NOS (eNOS) dauerhaft in den Endothelzellen exprimiert. Die eNOS besteht aus zwei identischen Monomeren und bildet somit ein Homodimer aus (**Abb. 2.3**). Häm ermöglicht dabei die Dimerisierung der Monomere (Klatt et al. 1996; List et al. 1997) und ist ebenfalls für den

Elektronentransfer von Flavinen zu dem gegenüberliegenden Häm-Monomer notwendig (Abu-Soud und Stuehr 1993; Brunner et al. 1998).

Durch die NOS wird L-Arginin in einer Redoxreaktion zu L-Citrullin umgewandelt (Palmer und Moncada 1989; Forstermann et al. 1994). Die endotheliale NOS wird dabei u. a. auch in Kardiomyozyten, Blutplättchen, bestimmten zerebralen Neuronen, im Epithelium der Plazenta (Synzytiotrophoblast) und in tubulären Epithelzellen der Schweineniere (LLC-PK1) exprimiert (Forstermann et al. 1994; Förstermann 2000).

Ca²⁺ aktiviertes Calmodulin ist wie bei der nNOS, auch für die eNOS-Aktivität essenziell. Die NO-Produktion der eNOS ist abhängig von der Ca²⁺-Konzentration in der Zelle (>100 nM) (Förstermann et al. 1991; Nathan und Xie 1994). Durch Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration wird die Aktivität der eNOS erhöht und es wird vermehrt NO gebildet. Ca²⁺ induziert ebenfalls die Bindung von Calmodulin an die NOS (Stuehr 1999).

Verschiedene weitere Proteine interagieren ebenfalls mit der eNOS und regulieren so ihre Aktivität, wie zum Beispiel das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) (García-Cardena et al. 1998). Auch kann die in Caveolae lokalisierte eNOS mit dem Caveolae Hüllprotein (Caveolin-1) interagieren. Dies führt zur Inhibition der eNOS. Diese Inhibition wurde von Drab et al. erstmals beschrieben. Sie haben in Blutgefäßen von Caveolin-1 defizienten Mäusen eine verbesserte endothelabhängige Relaxation, als Folge der fehlenden eNOS-Inhibition, durch das Caveolin-1 detektieren können (Drab et al. 2001).

Dass NO in vaskulären Endothelzellen ständig produziert wird, konnte durch den Mengenunterschied von cGMP in intaktem Endothelium und in von Endothelium befreiten Gefäßen ebenfalls gezeigt werden (Ignarro 1989). Spätere Studien mit Tieren zeigten außerdem, dass die Hemmung der NO-Produktion durch NO-Synthese-Inhibitoren eine direkte Blutdruckerhöhung zur Folge hat (Aisaka et al. 1989; Rees et al. 1989b; Vargas et al. 1991). Dazu passend konnte in eNOS defizienten Tieren ein konstant erhöhter Blutdruck gezeigt werden (Huang et al. 1995).

Durch Aktivierung der NOS kann eine Konzentration von circa 500 nM NO pro Zelle gemessen werden (Malinski und Taha 1992). Die basale NO-Produktion ist dabei auch abhängig von der Art des Gefäßes (Arterie/Vene) und ist selbst im gleichen Gefäß unterschiedlich hoch. Sie hängt vom Durchmesser des betrachteten Gefäßes ab. In bovinen Lungenarterien und Lungenvenen ist die basale NO-Bildung in schmalen Gefäßen größer, als in weiten Gefäßen (Ignarro 1989).

Die eNOS kann auch durch tangentielle Scherkraft oder Scherspannung, welche aus dem Blutfluss resultieren, aktiviert werden. Die Scherkraft auf der Endothelzelloberfläche löst dann die NO-Bildung in den Endothelzellen aus (Hintze und Vatner 1984; Holtz et al. 1984; Hull et al. 1986; Kaiser et al. 1986; Rubanyi et al. 1986; Buga et al. 1991). Diese Aktivierung wird durch

die Phosphorylierung der eNOS vermittelt (Fulton et al. 1999; Fleming und Busse 2003) (Dimmeler et al. 1999). Das eNOS-Protein wird dabei an verschiedenen Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) Resten phosphoryliert. Der Elektronenfluss wird durch die Phosphorylierung des Ser1177 stimuliert, auch die Ca^{2+} Empfindlichkeit der eNOS wird so gesteigert. Dies stellt auch einen zusätzlichen unabhängigen Mechanismus der eNOS Aktivierung dar (McCabe et al. 2000; Fleming und Busse 2003).

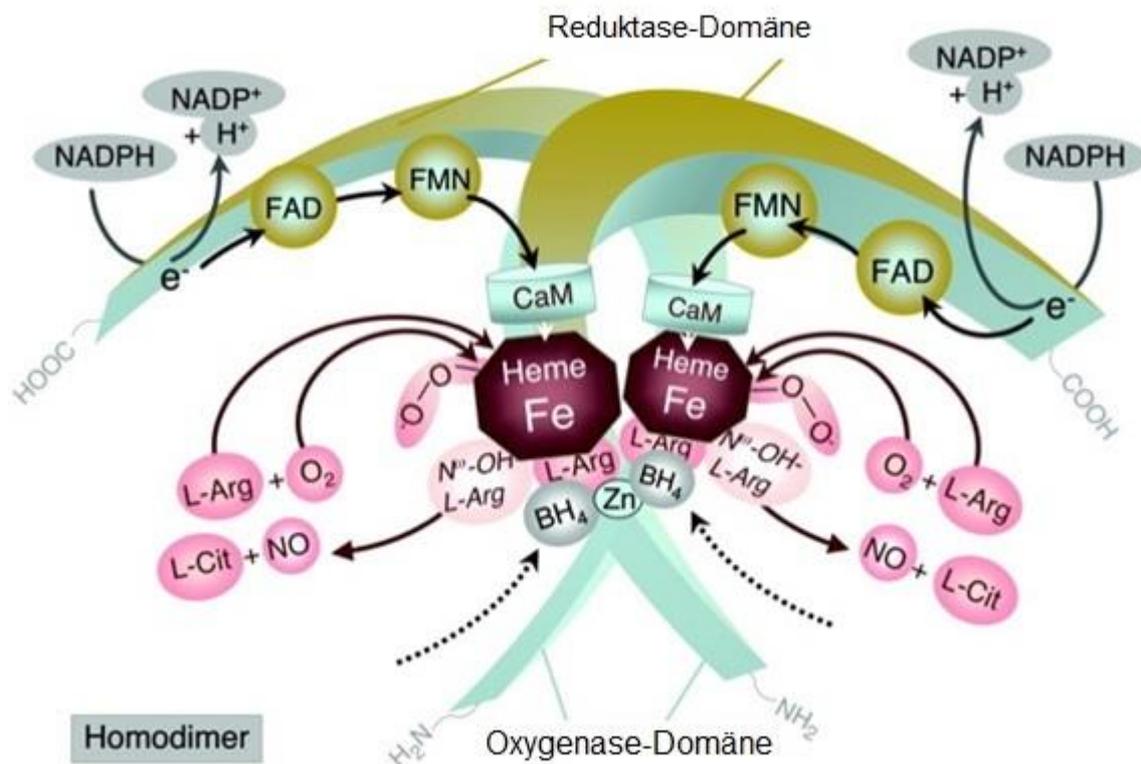


Abbildung 2.3: Struktur der eNOS und das Schema der NOS enzymkatalysierten Reaktionen (Abbildung aus Dissertationsschrift von Stephanie Han-Whei Pick (<https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-49326.xml>), modifiziert nach (Forstermann und Sessa 2012)).

Es wurde bereits diskutiert, ob vaskulärer oxidativer Stress ein weiterer pathophysiologischer Faktor ist, welcher kardiovaskuläre Erkrankungen fördert, ebenso wie z. B. die Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit, Bluthochdruck und Diabetes mellitus (Kojda und Harrison 1999; Ghiadoni et al. 2012). Risikofaktoren wie das Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, hohe Lipidwerte führen bekanntermaßen zur Superoxidbildung (Forstermann und Münzel 2006). Das gebildete Superoxid reagiert mit NO und bildet Peroxynitrit (Beckman und Koppenol 1996). Auf diese Weise wird die NO-Konzentration erniedrigt und zusätzlich Peroxynitrit gebildet, welches u. a. in der Lage ist BH₄ zu oxidieren. Dies führt zur eNOS-Entkopplung (Milstien und Katusic 1999; Laursen et al. 2001). So wird der

gewünschte vaskulär-protective Effekt der eNOS umgekehrt und vaskulärer Stress erzeugt. Mittels einer eNOS-Mutante, die zu einer Destabilisierung des Dimers, verminderter BH₄-Bindung, verminderter NO-Bildung sowie vermehrter Superoxidbildung führt, konnte jedoch in einem transgenen Tiermodell mit endothelspezifischer Expression dieser Mutante auf einem eNOS-defizienten Hintergrund gezeigt werden, dass der entstehende oxidative Stress nur einen geringfügigen Einfluss auf Blutgefäßschäden wie pathologisches vaskuläres Remodeling ausübt (Suvorava et al. 2015).

2.1.3. Guanylylcyclase (GC)

Guanylylcyclasen (GC) synthetisieren cGMP, induziert durch verschiedene Signale wie NO, Peptid-Liganden und intrazelluläre Kalzium-Durchflüsse. Die Aktivierung der GC durch diese Signale initiiert die Umwandlung des zytosolischen Purin-Nukleosid GTP zu cGMP. Intrazelluläres cGMP reguliert die zelluläre Physiologie durch Aktivierung von Proteinkinasen, direkte Steuerung spezieller Ionenkanäle oder durch Regulation von Phosphodiesterasen (PDEs). Dies führt zu Änderungen der zyklischen Nukleotid-Konzentration (Lucas et al. 2000). Es gibt zwei Arten der GC, die membrangebundene Guanylylcyclase (pGC) und die lösliche Guanylylcyclase (sGC).

Guanylylcyclasen werden auch durch atriales natriuretisches Peptid (ANP) aktiviert, welches die cGMP-Konzentration in Säugetiergeweben erhöht (Hamet et al. 1984; Waldman et al. 1984; Winquist et al. 1984). Die ersten geklonten pGCs aus Säugetiergewebe waren natriuretische Peptid Rezeptoren A (GC-A) und B (GC-B) (Chang et al. 1989; Lowe et al. 1989; Schulz et al. 1989). Danach wurde die DNA-Sequenzen der sGC α und β Untereinheiten und 5 pGC: Guanylylcyclase C (GC-C), Guanylylcyclase D (GC-D), Guanylylcyclase E (GC-E), Guanylylcyclase F (GC-F) und Guanylylcyclase G (GC-G) entdeckt bzw. dechiffriert (Harteneck et al. 1990; Yuen et al. 1990).

GC-C ist dabei der Rezeptor für das bakterielle hitzestabile Enterotoxin (ST) (Schulz et al. 1990; De Sauvage et al. 1991) und für die endogenen Peptide Guanylin und Uroguanylin (Currie et al. 1992; Hamra et al. 1993). Es wird in der Darmschleimhaut (Li und Goy 1993) und in der Leber (Laney et al. 1994) exprimiert. Das GC-D wird im olfaktorischen Neuroepithel exprimiert (Fülle et al. 1995). GC-E und GC-F werden in der Retina und die GC-E auch in der Zirbeldrüse exprimiert (Yang et al. 1995). GC-G kommt im Darm, der Niere, der Lunge und in der Skelettmuskulatur vor (Schulz et al. 1998).

2.1.3.1. Lösliche Guanylylcyclase (sGC)

Im Zytoplasma fast aller Säugetierzellen wird die sGC exprimiert. Sie vermittelt wichtige physiologische Funktionen, wie z. B. die Hemmung der Aggregation von Thrombozyten, Vasodilatation durch Relaxation glatter Muskelzellen, neuronale Signalübertragung und Immunmodulationen (Collier und Vallance 1989). Darüber hinaus weist NO auch antiadhäsive, antiproliferative, antioxidative und anti-apoptotische Eigenschaften auf (Gewaltig und Kojda 2002). Das Enzym selbst ist ein Heterodimer und besitzt eine α - und β -Untereinheit. Die Expression der beiden Untereinheiten ist notwendig für die katalytische Aktivität des Enzymes (Kamisaki et al. 1986; Harteneck et al. 1990; Buechler et al. 1991). sGC besitzt eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale katalytische Domäne (**Abb. 2.4**). Die sGC hat auch Sequenzhomologien mit den Domänen des pGC und der Adenylylcyclase (Chinkers et al. 1989; Krupinski et al. 1989; Thorpe und Morkin 1990). Die am weitesten verbreitetete Untereinheit der sGC ist die $\alpha 1\beta 1$ -Heterodimer-Isoform (Evgenov et al. 2006; Cerra und Pellegrino 2007; Tsai und Kass 2009; Montfort et al. 2017).

Funktionell können wir die sGC in drei verschiedene Domänen einteilen: Häm-bindende, dimerisierende und katalytische Domäne. Die Häm-bindende Domäne befindet sich am N-Terminus und ist notwendig für die Aktivierung der sGC durch NO (Gerzer et al. 1982; Ignarro et al. 1982; Ohlstein et al. 1982; Craven und Derubertis 1983).

Zur Bestimmung der Funktion der Untereinheiten wurden die Sequenzen der $\alpha 1$ -Untereinheit und der $\beta 1$ -Untereinheit entfernt. Nach Entfernung der $\beta 1$ -Untereinheit verlor die sGC ihre Sensibilität zu NO. Dieser Umstand verdeutlichte auch die Bedeutung von NO bei der Aktivierung der sGC. Die Entfernung der $\alpha 1$ -Untereinheit beeinflusste die NO-Sensibilität der sGC nicht (Foerster et al. 1996). Dennoch benötigt die sGC für ihre Funktion beide Untereinheiten, auch weil die $\alpha 1$ -Untereinheit das Häm koordiniert (Stone und Marletta 1994). Jedes Heterodimer der sGC beinhaltet ein Häm Molekül mit hoher Affinität zu NO (Gerzer et al. 1981a). Anders als Hämoglobin und Myoglobin bindet, auch in aeroben Umgebungen, sGC besser an NO als an Sauerstoff (Gerzer et al. 1981a; Gerzer et al. 1981b). Das NO aktiviert die sGC durch eine direkte Bindung an das Häm und bildet dabei einen Eisen-Nitrosyl-Häm-Komplex aus (**Abb. 2.4**). Dieser Eisen-Nitrosyl-Häm-Komplex hat dabei eine Halbwertszeit von 4 Minuten bis 3 Stunden bei 20°C (Sharma et al. 1978; Hille et al. 1979).

Kohlenmonoxid (CO) ist ein weiterer Aktivator der sGC (**Abb. 2.4**), hat aber eine schwächere Affinität als NO für sGC. Experimente mit gereinigten sGC Enzymen haben gezeigt, dass es durch NO 100 bis 200-fach und durch CO nur 4-fach aktiviert wird (Stone und Marletta 1994).

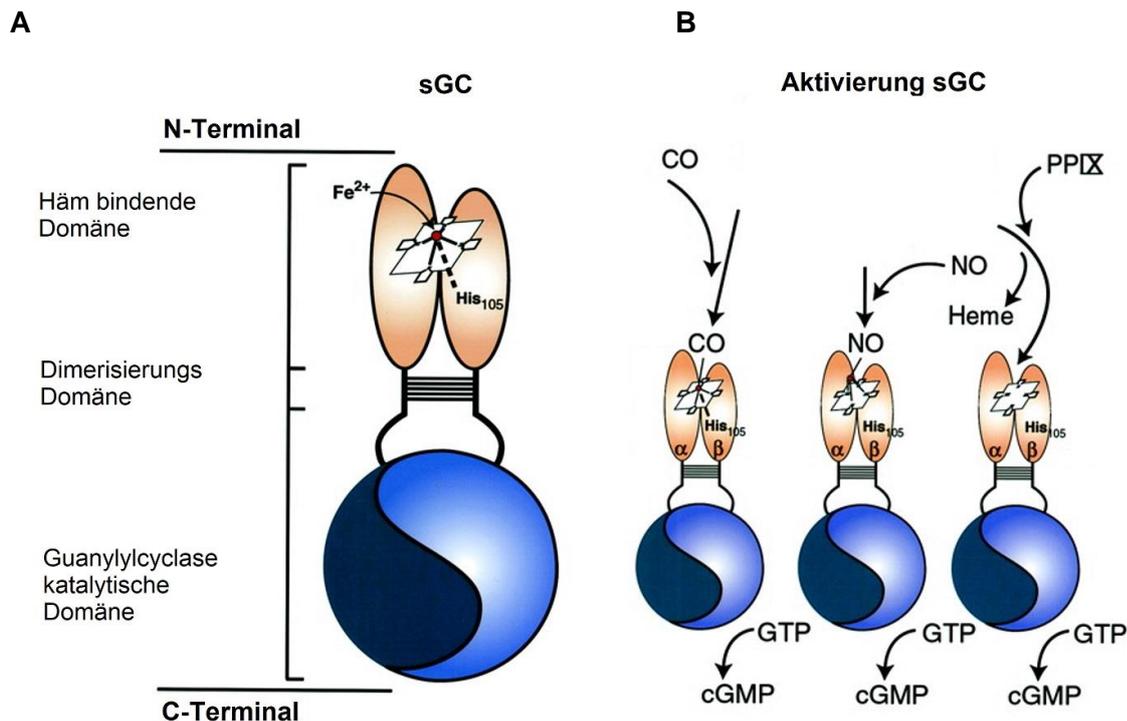


Abbildung 2.4: A, Struktur der sGC Domäne. B, Schema der sGC Aktivierung. sGC-Aktivierung durch Kohlenmonoxid, Stickstoffmonoxid und Protoporphyrin IX. (Lucas et al. 2000).

Protoporphyrin IX (PPIX) ist ein natürlich vorkommender Stoff und der Vorläufer des Häms. Es wird aus Glycin synthetisiert. PPIX aktiviert bei Häm-Mangel die Häm-freie und auch die Häm-enhaltende sGC Form, unabhängig von der Anwesenheit von Häm und NO (**Abb. 2.4**) (Ignarro et al. 1982; Wolin et al. 1982). sGC braucht für das Erreichen seiner maximalen Aktivität als Cofaktor auch Mn^{2+} und Mg^{2+} (Waldman und Murad 1987).

2.1.4. Cyclisches Guanosinmonophosphat

cGMP ist ein weit verbreiteter intrazellulärer sekundärer Botenstoff, der an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen wie dem Zellwachstum, der Apoptose, der Kontraktilität, der Leitfähigkeit von Ionenkanälen etc. beteiligt ist. Der cGMP-Signalweg ist für die Funktion des Herzmuskels, des Endothels und der glatten Muskeln lebenswichtig (Tsai und Kass 2009). So konnte gezeigt werden, dass sGC β 1-defiziente Mäuse wegen einer tödlichen gastrointestinalen Obstruktion nur eine Lebensspanne von 3-4 Wochen aufweisen (Friebe et al. 2007). Darüber hinaus zeigten diese transgenen Tiere nicht nur einen Bluthochdruck, sondern auch keine durch NO induzierte Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Es gibt mindestens zwei verschiedene cGMP Entstehungswege: durch NO und durch natriuretische Peptide (NPs) (Chinkers et al. 1989; Baxter 2004). Es gibt drei Effektorproteine,

die von cGMP aktiviert werden: Zyklisch-Nukleotid gesteuerte Ionenkanäle, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen (PDE) (**Abb. 2.5**) (Tsai und Kass 2009).

2.1.4.1. Proteinkinasen

Zwei verschiedene Proteinkinasen, cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) und cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), werden von cGMP aktiviert.

cGMP-abhängige Proteinkinase

PKG ist, intrazellulär, der primäre Mediator von cGMP. Es gibt eine PKG I mit zwei Isoformen ($I\alpha$ und $I\beta$) (Sandberg et al. 1989; Tamura et al. 1996) und eine PKG II (Orstavik et al. 1996). PKG I wird weit verbreitet in Säugetiergewebe, besonders in Blutplättchen, glatten Muskeln und im Kleinhirn exprimiert (Lohmann et al. 1997). PKG II ist nicht im kardiovaskulären System vorhanden, aber wird in Lungen, Gehirn, Nieren, Darm und in Knochen exprimiert (Uhler 1993; Jarchau et al. 1994; Lohmann et al. 1997). Beide PKG sind Homodimere und haben identische Strukturen. Sie besitzen drei funktionelle Domänen: eine N-Terminale Domäne, eine Regulatorische Domäne und eine Kinase-Domäne. Sobald cGMP an der regulatorischen Domäne von PKG bindet, beginnt die Aktivierung der Kinase-Domäne und diese katalysiert die Phosphorylierung von Serin/Threonin des Zielsubstratproteins (Tsai und Kass 2009).

Phosphorylierung des Inositoltrisphosphat (IP_3)-Rezeptors und Phospholambans durch PKG führt in glatten Muskelzellen zur Entspannung (Raeymaekers et al. 1990; Komalavilas und Lincoln 1996). Durch Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierenden Phosphoproteins (VASP) und Vimentins sind sie auch an der Aktivierung der Blutplättchen und Neutrophiler beteiligt (Pryzwansky et al. 1995; Aszódi et al. 1999). Aktivierung des G-Substrates, das in den Kleinhirn-Purkinje-Zellen stark exprimiert wird, wirken als Phosphatase-Hemmer (Endo et al. 1999). PKG-vermittelte Phosphorylierung hemmt die Aktivierung der Thromboxan A_2 Rezeptoren in Thrombozyten (Wang et al. 1998). PKG phosphoryliert ebenfalls Kalzium-Kanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}) so dass der extrazelluläre Kalzium-Durchfluss reduziert wird. Diese BK_{Ca} Aktivierung ist an der Entspannung verschiedener Arten von glatten Muskelzellen beteiligt (Peng et al. 1996; Carrier et al. 1997).

Wegener et al. zeigten durch Herz-spezifische PKG-I defiziente Mäuse, dass die cGMP-PKG Signalübertragung für die Herzkontraktilität sehr wichtig ist. (Wegener et al. 2002) Die cGMP-Modulation der Myozytenkontraktilität kann entweder durch NO oder natriuretisches Peptid (NP) eingeleitet werden (Kojda et al. 1996; Mohan et al. 1996; Kojda und Kottenberg 1999; Zhang et al. 2005).

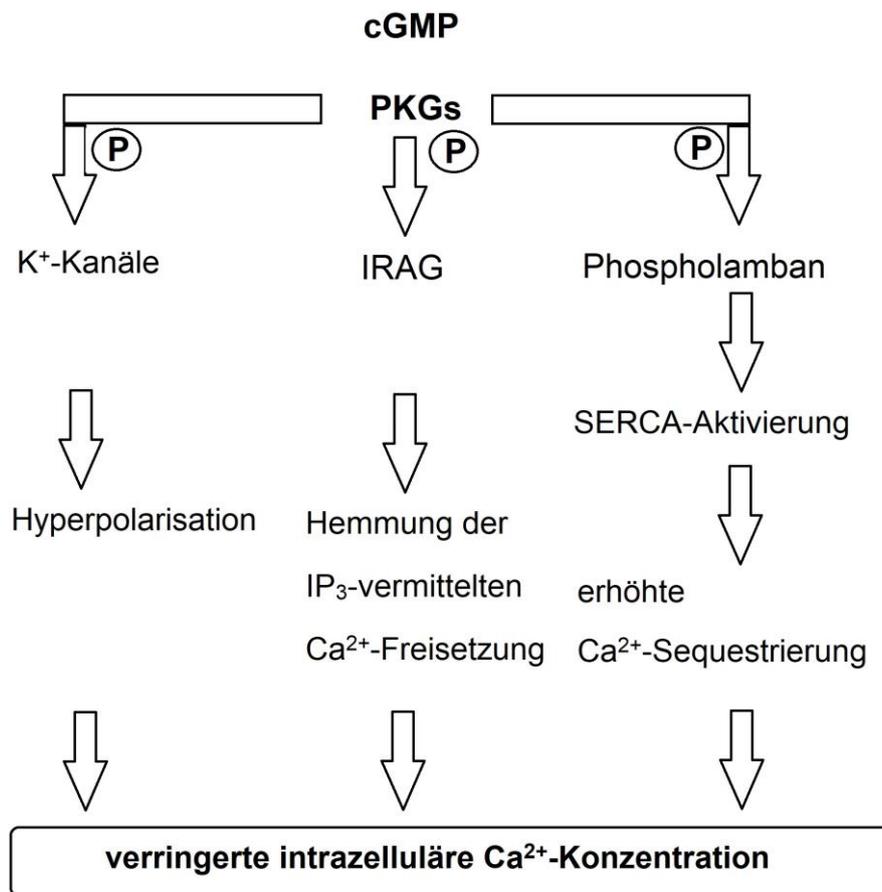


Abbildung 2.5: Eine schematische Darstellung der PKG-Aktivität. IRAG=IP₃-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat (Gewaltig und Kojda 2002).

cAMP-abhängige Proteinkinase

Die Nukleotidbindungs-Domäne der PKA hat eine bedeutsame signifikante Homologie zu der PKGs Nukleotidbindungs-Domänen. Dies ermöglicht auch die Aktivierung durch cGMP. Dies geschieht jedoch mit einer 50-fach niedrigeren Selektivität als cAMP (Pfeifer et al. 1999). PKG und PKA induzieren die Relaxation der Magenmuskelzellen von Kaninchen und Meerschweinchen durch Inhibition der IP₃ abhängigen Freisetzung von Ca⁺² (Murthy und Makhlof 1995). cGMP und cAMP hemmen die Blutplättchen-Aktivierung, relaxieren vaskuläre glatte Muskeln und regulieren Chlorid und Wasser-Sekretion im Darm bei Wirbeltieren. cAMP kreuzaktiviert PKG in verschiedenen vaskulären Geweben wie Rattenaorta und Schweinekoronararterien (Jiang et al. 1992; Eckly-Michel et al. 1997). Kreuz-Aktivierung von PKA durch cGMP, das von ST verursacht wird, vermittelt die Sekretion von Flüssigkeit in humanen Darmzellen (Forte et al. 1992; Chao et al. 1994).

2.1.4.2. Zyklische Nukleotid-gesteuerte Kanäle

Zyklische Nucleotid-gesteuerte (CNG) Kanäle sind Ionenkanäle, die durch Bindung von cGMP und cAMP aktiviert werden. CNG Kanäle sind Tetramere und haben vier Untereinheiten, die rundherum liegen und eine zentral lokalisierte Pore bilden (Higgins et al. 2002). Die Kanäle sind wichtige zelluläre Schalter, welche die intrazelluläre cGMP- oder cAMP-Konzentrationsveränderungen in ein Membranpotential und Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration umwandeln (Biel und Michalakakis 2009). CNG Kanäle gehören strukturell zur Familie der Porenschleifen-Kationenkanäle (Yu et al. 2005). Es wurden drei zyklische Nukleotid-bindende Domänen innerhalb der Kanäle identifiziert: Die CNG, die hyperpolarisationsaktivierten (HCN; hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) Kationenkanäle und EAG-ähnliche (ELK; Eag-Like) K^+ Kanäle (Kaupp und Seifert 2002; Hofmann et al. 2005; Craven und Zagotta 2006). CNG Kanäle leiten hauptsächlich Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Die Kanäle sind auch streng Liganden-gesteuert weil die Öffnung die Bindung von cGMP oder cAMP benötigt (Kaupp und Seifert 2002). Die cGMP-abhängige Regelung der HCN-Ströme wurde nur in einigen Arten von nativen Neuronen gezeigt (Pape und Mager 1992; Ingram und Williams 1996). CNG Kanäle wurden ausdrücklich in Photorezeptoren und in Geruchsrezeptor Neuronen exprimiert. Die Kanäle in diesen Zellen spielen eine grundlegende Rolle bei der Verarbeitung der Signale von Sinneswahrnehmungen. CNG Kanäle wurden auch in anderen Zellarten und Geweben identifiziert, wie in Nieren, Gehirn, endokrinem Gewebe und in Spermazellen (Kaupp und Seifert 2002).

2.1.4.3. Phosphodiesterasen

Elf Phosphodiesterase (PDE) Familien sind in Säugetieren Zellen vorhanden (PDE 1-11) (Conti und Beavo 2007; Francis et al. 2009). Diese spalten die Phosphodiesterbindungen von cGMP oder cAMP auf und bilden AMP oder GMP. Die Isoenzyme werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert und je nach Gewebetyp selektiv oder nicht selektiv. Sie werden auch durch diese aktiviert oder gehemmt. Fünf von elf PDEs (PDE1A, PDE1B, PDE5, PDE6 und PDE9) hydrolysieren ausdrücklich cGMP. PDE1C, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11 hydrolysieren cGMP und cAMP. cGMP reguliert die Aktivitäten von PDE2, PDE3, PDE5 und PDE9. PDE2, PDE3 und PDE5 werden in Herzmuskelzellen, in vaskulären Endothelzellen, PDE3 und PDE5 in vaskulären glatte Muskelzellen exprimiert (Pauvert et al. 2002; Maurice 2005; Netherton und Maurice 2005).

cGMP aktivierte PDE2 erhöht seine Aktivität für cAMP. Diese Doppelselektivität übermittelt ein negatives Crosstalk zwischen cGMP und cAMP (Martins et al. 1982). Durch PDE2-Aktivierung ist cGMP in der Lage, das Signal von cAMP zu reduzieren und die Herzfunktion zu beeinflussen (Vandecasteele et al. 2001; Fischmeister et al. 2005; Leroy et al. 2008). Wie PDE2

ist PDE3 auch ein Doppelsubstrat-Enzym und kann sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren. Im kardiovaskulären System ist PDE3 an der Regulierung der Kontraktilität von Herzmuskelzellen und glatten Gefäßmuskeln über L-Typ-Kalziumkanäle beteiligt (Malecot et al. 1986;Verde et al. 1999;Vandecasteele et al. 2001).

PDE5 kann in drei Varianten (PDE5A1-3) vorliegen. PDE5 wird meistens durch PKG aktiviert und hydrolysiert selektiv cGMP. Hierdurch wird die vaskuläre glatte Muskelkontraktion von PDE5 reguliert. PDE5 wird in der Lunge und im Schwellkörper in hohen Mengen exprimiert. Daher werden auch PDE5 Hemmer in der Therapie der pulmonalen Hypertonie und der erektilen Dysfunktion eingesetzt (Rosen und Kostis 2003;Croom und Curran 2008;Driscoll und Chakinala 2008). PDE 1, das cAMP und cGMP hydrolysiert, wird durch die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin aktiviert. Es degradiert das meiste cGMP in Herzmuskelzellen (Lukowski et al. 2010). PDE9 wird primär im Zentralnervensystem exprimiert und ist hochspezifisch für cGMP (Menniti et al. 2006). Die Aktivierung der PDE6 in der Retina führt zu einer Degradierung von cGMP und Schließung von CNG Kanäle. (Zhang et al. 2008).

2.2. Kallikrein-Kinin-System

Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) besteht aus 4 Komponenten: Kininogene, Kininogenasen, Kinine und Kinasen. Kininogene (Kallikrein-Substrate) sind die Vorläuferproteine der Kinine. Im Plasma gibt es zwei Hauptformen, niedermolekulares Kininogen (LMWK) und hochmolekulares Kininogen (HMWK) (Jacobsen 1966b;Jacobsen 1966a). Das HMWK ist an den frühen Phasen der oberflächen-aktivierten Koagulation beteiligt (Kluft et al. 1987). Kininogenasen sind Enzyme, die sich im Gewebe als Gewebs-Kallikrein und im Plasma als Plasma-Kallikrein befinden. Sie generieren Kinine durch Hydrolyse der Kininogene und die Kinine werden von Kininasen abgebaut.

Vaskuläre glatte Muskelzellen in Kultur geben sowohl Kallikrein als auch Kininogen ab (Oza et al. 1990). Sowohl vaskuläres Gewebe als auch glatte Muskelzellen in Zellkultur enthalten Kallikrein-mRNA (Nolly et al. 1985;Saed et al. 1990). Somit sind die Komponenten des KKS im vaskulären Gewebe vorhanden, wo sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßwiderstandes spielen könnten. Es gibt auch Hinweise darauf, dass das KKS sowohl im Herz-Kreislauf-System als auch in der Niere eine schützende Rolle spielt (Scicli und Carretero 1986).

Plasma-Kallikrein Plasma-Kallikrein wird hauptsächlich in Leber und Plasma exprimiert. Es liegt im Proenzym-Form als Präkallikrein vor, unterscheidet sich von Gewebs-Kallikrein und bildet hauptsächlich Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen (Fitzgerald-Faktor, HMWK).

Neben dem HMWK und dem Hageman-Faktor ist auch Plasma-Präkallikrein an der Blutgerinnung, der Fibrinolyse und der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt.

Kinine sind pharmakologisch aktive und nur kurzlebige Peptide, die durch Kallikreine aus Kininogenen abgespalten werden. Im Plasma erfolgt die Synthese von Bradykinin und Kallidin (lysyl-Bradykinin) durch Plasma-Kallikrein aus hochmolekularem Kininogen (HMWK) (Kaplan und Joseph 2014). Kallidin wird durch die Aminopeptidase N sehr schnell zu Bradykinin umgewandelt (Qadri und Bader 2018). An der Synthese von Bradykinin ist auch der Gerinnungsfaktor XII (Hageman Faktor) entscheidend beteiligt (**Abb. 2.6**).

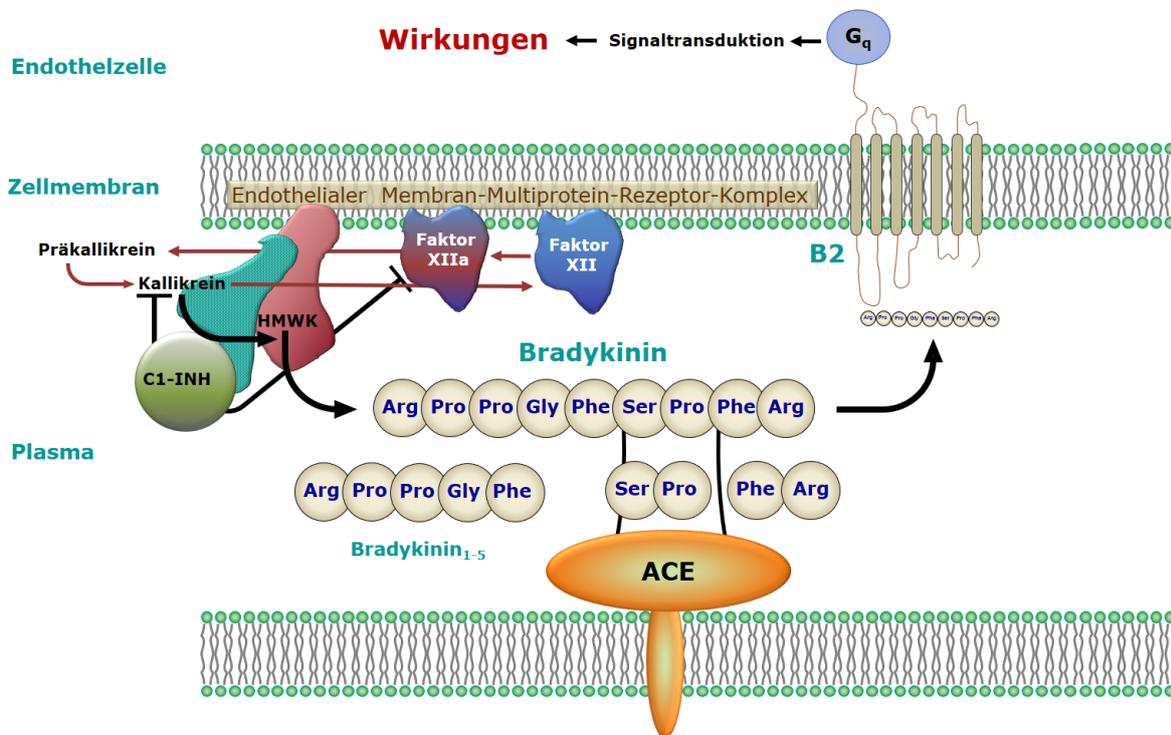


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der plasmatischen Synthese von Bradykinin auf der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen. Nach der initialen Aktivierung von Prä-Kallikrein zu Kallikrein, beispielsweise durch entzündliche Bedingungen, entwickelt sich eine Verstärkungsschleife mit starker Bildung von Bradykinin, denn Kallikrein aktiviert den Gerinnungsfaktor XII, welcher dann wieder Kallikrein aktiviert (rote Pfeile). Dies wird jedoch durch den Serin-Protease-Hemmer C1-INH, der Kallikrein und Faktor XIIa hemmt, gebremst (nicht dargestellt ist die Hemmung der Komplementproteine C1r und C1s, Plasmin sowie Faktor XIa). Deshalb führt ein Mangel an C1-INH zu einer Destabilisierung des Systems und dem Krankheitsbild hereditäres Angioödem. Gebildetes Bradykinin aktiviert den G-Protein gekoppelten (Gq) Bradykinin-Rezeptor Typ 2 (B2), der die zellulären Wirkungen von Bradykinin vermittelt. Viele Wirkungen von Bradykinin werden nach heutigem Verständnis hauptsächlich durch die Aktivierung von B2 auf Endothelzellen vermittelt, wodurch es zu einer Freisetzung von NO, PGI₂ und des endothelialen Hyperpolarisations-Faktor (EDHF) kommt (1Endothelialer Membran-Multiprotein-Rezeptor-Komplex: C1q Globular Head Receptor-Cytokeratin1-Complex, Cytokeratin1 und Urokinase-Plasminogen-Aktivator Receptor-Cytokeratin1-Complex, aus Kojda G. ACE-Hemmer induzierte nicht-allergische Angioödeme: <https://www2.hhu.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel.html#2019>).

Prä-Kallikrein und HMWK zirkulieren im Plasma als bi-molekularer Komplex und binden auf der Oberfläche von Endothelzellen an einen endothelialen Membran-Multiprotein-Rezeptor-Komplex. Nach der initialen Aktivierung von Prä-Kallikrein zu Kallikrein, beispielsweise durch entzündliche Bedingungen, entwickelt sich eine Verstärkungsschleife mit starker Bildung von Bradykinin (**Abb. 2.6**). Dies wird jedoch durch den Serin-Protease-Hemmer C1-INH gebremst. Das Kallikrein-Kinin-System ist eng mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) verbunden und antagonisiert teilweise dessen Wirkungen.

Die funktionelle Kopplung zwischen diesen beiden Systemen beruht auf der Aktivität von ACE (Bernstein et al. 2013) welches sowohl Angiotensin II bildet als auch das Kinin Bradykinin zu inaktiven Peptiden abbaut (Yang et al. 1970). Daneben können auch andere Proteasen Bradykinin abbauen (**Abb. 2.7**). Hierzu gehören hauptsächlich die neutrale Endopeptidase (Nepriylsin) sowie Aminopeptidase P und die Carboxypeptidase N (Qadri und Bader 2018).

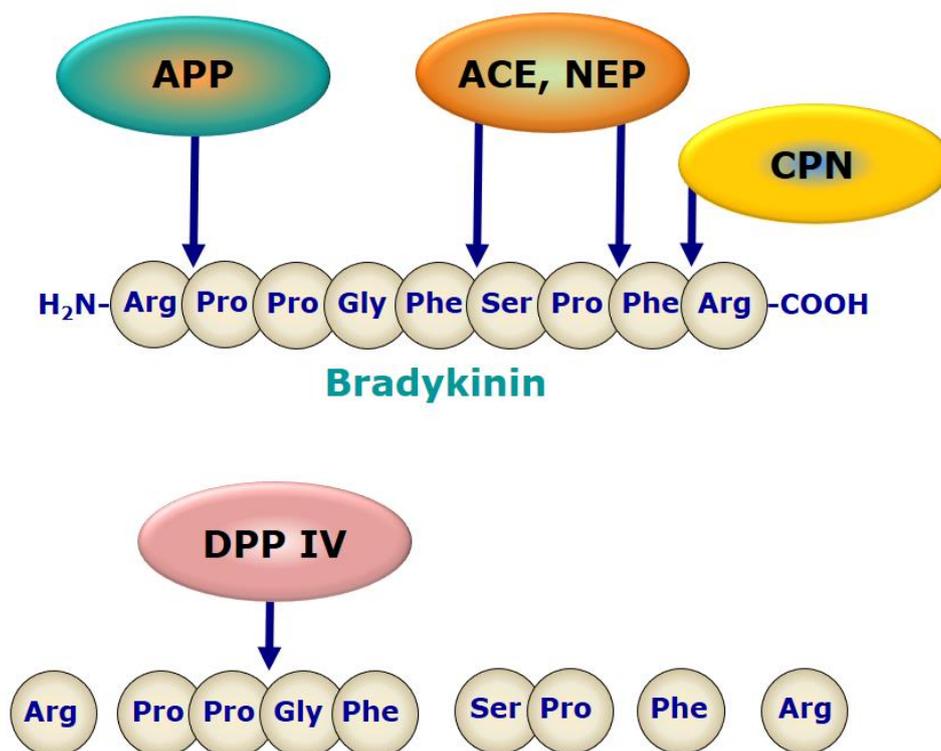


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Proteolyse von Bradykinin. Das Angiotensin Converting Enzym (ACE) und die neutrale Endopeptidase (NEP, auch Nepriylsin) sind die wichtigsten Bradykinin abbauenden Proteasen. Darüber hinaus können weitere Proteasen Bradykinin spalten. Hierzu gehören Aminopeptidase P (APP), und Carboxypeptidase N (CPN). Im Gegensatz dazu kann die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) wegen der Bindungseigenschaften an die Aminosäuren Bradykinin nicht direkt, sondern erst das nicht mehr aktive Restpeptid nach Abspaltung des N-terminalen Arg weiter hydrolysieren (Kato et al. 1978) aus Kojda G. ACE-Hemmer induzierte nicht-allergische Angioödem: <https://www2.hhu.de/kojda-pharmalehrbuch/FortbildungstelegrammPharmazie/Fortbildungsartikel.html#2019>).

Auch das Membranprotein Prolylcarboxypeptidase (PRCP) aktiviert Präkallikrein in Endothelzellen (Moreira et al. 2002;Shariat-Madar et al. 2002;Shariat-Madar et al. 2004) und verursacht anhaltende Entzündungsreaktionen auf Stimuli wie Lipopolysaccharid (Ngo et al. 2009). Wenn HMWK und Plasma-Präkallikrein an die Endothelzellmembran binden, wandelt PRCP Plasma-Präkallikrein rasch in Kallikrein um und setzt dabei Kinine frei (Shariat-Madar et al. 2004).

Gewebs-Kallikrein Kallikrein gehört zu einer Familie von Serinproteasen. Gewebs-Kallikrein kann Kinine aus LMWK und HMWK freisetzen. Das Kallikrein-Gen wird vor allem in der Unterkieferdrüse, der Bauchspeicheldrüse und der Niere exprimiert. Saed et al. haben kleine Mengen Kallikrein-mRNA im Herz, im Gefäßgewebe und in den Nebennieren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen (Saed et al. 1990;Nolly et al. 1993). Kallikrein und ähnliche Enzyme wurden im Gehirn und der Hypophyse (Chao et al. 1987), in den Arterien und Venen (Nolly et al. 1985), in den Blutzellen (Nolly et al. 1993), in der Milz (Chao et al. 1984), im Herz (Nolly et al. 1994) und in den Nebennieren (Scicli et al. 1989) nachgewiesen.

2.2.1 Bradykinin

In den 1940er-Jahren fallen die Kinine mit der Identifizierung von Bradykinin (BK) durch Rocha e Silva und seine Kollegen auf (Rocha et al. 1949). BK war in signifikanten Mengen aus Plasma isoliert worden (Elliott et al. 1961). Seine Primärstruktur wurde durch die Gruppen von Boissonnas und Elliott aufgeklärt (Boissonnas et al. 1960;Elliott et al. 1960b).

Kinine sind Oligopeptide, die die Sequenz von Bradykinin enthalten und hauptsächlich als lokale Hormone wirken, da sie in sehr niedrigen Konzentrationen (1-50 fmol/ml) zirkulieren und durch Kininasen schnell hydrolysiert werden. Die Kinin-Konzentrationen sind in Niere, Herz und Aorta höher (100-350 fmol/g) (Carbini et al. 1993), was die Hypothese weiter stützt, dass sie dort hauptsächlich als lokale Hormone wirken. Gleichzeitig wirken sie aber auch als Mediatoren von Entzündungen (Dela Cadena et al. 1991) bei Atherosklerose, Bluthochdruck und Organschäden (Rhaleb et al. 2011).

Kininasen sind Peptidasen, die im Blut und anderen Geweben vorkommen und Kinine und andere Peptide hydrolysieren. Als erste Kinase wurde in menschlichem Plasma die Carboxypeptidase N (Kinase I) dargestellt (Erdos und Sloane 1962). Die bekannteste Kinase ist das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) oder Kininase II, das Angiotensin I in II umwandelt und Kinin inaktiviert (Yang et al. 1971). Eine weitere wichtige Kininase ist die neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP-24.11), die auch als Neprilysin bekannt ist (Erdös und Skidgel 1988).

2.2.2 Bradykinin Rezeptoren

Mindestens zwei Subtypen von Kinin-Rezeptoren wurden unter Verwendung von Analoga von Bradykinin gut charakterisiert: B1 und B2 (Regoli 1986). Beide wurden geklont und gehören zur Familie der 7-Transmembran-Rezeptoren, die mit G-Proteinen in Verbindung stehen (Mceachern et al. 1991).

B1-Rezeptoren sind in normalem Gewebe in sehr geringer Menge (oder gar nicht) vorhanden, werden aber *de novo* bei Gewebeverletzungen, Entzündungen und der Verabreichung von Lipopolysacchariden wie Endotoxin exprimiert und synthetisiert. Ihre wichtigsten Agonisten sind das Arg9-Bradykinin und des-Arg10-Kallidin.

B2-Rezeptoren sind für die meisten Wirkungen von Bradykinin verantwortlich und sind die Hauptrezeptoren für Bradykinin und Kallidin (Lys-Bradykinin). Beim Menschen wird der B2-Rezeptor wie bereits erwähnt durch die Aktivität der Kallikreine und anderer Serinproteasen mit konsekutiver Bildung des Liganden-Bradykinins aktiviert. Diese Wirkung kann durch einen spezifischen Bradykinin B2-Rezeptor-Antagonisten (Icatibant) blockiert werden (Hecquet et al. 2000).

2.2.3 Physiologische und pathophysiologische Funktionen von Bradykinin und Bradykinin-Rezeptoren

Synthetisches BK, das in menschliches oder tierisches Gewebe injiziert wird, reproduziert die vier klassischen Hauptanzeichen einer Entzündung: Rötung, lokale Hitze, Schwellung und Schmerz (Elliott et al. 1960a).

Kinine spielen eine wichtige Rolle bei der lokalen Regulation des Blutflusses in Organen, die einen hohen TK-Wert aufweisen, wie die submandibuläre Drüse, der uteroplazentare Komplex und die Niere (Seino et al. 1982; Roman et al. 1988; Berg et al. 1989). Endogen erzeugte Kinine helfen, die Durchblutung der Skelettmuskulatur, der Gebärmutter und des Gehirns zu regulieren, entweder direkt oder durch die Freisetzung von Prostaglandinen (Rhaleb et al. 2011). Die zirkulierenden Kininkonzentrationen im Blut reichen von 5 bis 50 pg/ml Blut (Scioli et al. 1982). Diese Konzentrationen müssen auf mindestens 100 pg beim Menschen (Bönner et al. 1990) und 1000 pg bei Ratten (Salgado et al. 1986) erhöht werden, um den Blutdruck akut zu senken. Mäuse mit einem Mangel an B1, B2 oder beiden sowie Mäuse mit niedriger TK zeigten Blutdruckwerte, die denen von Wildtyp-Kontrollen ähnlich waren, was bestätigt, dass Kinine keine wichtige Determinante des Blutdrucks sind (Trabold et al. 2002).

Gainer et al. testeten Icatibant und stellten fest, dass die kurzfristigen Blutdruckwirkungen von ACE-Hemmern sowohl bei normotensiven als auch bei hypertensiven Probanden abgeschwächt wurden (Gainer et al. 1998), was darauf hindeutet, dass die akute Wirkung von

ACE-Hemmern zum Teil durch Kinine vermittelt wird, die entweder direkt oder durch Freisetzung von Prostaglandinen und NO den lokalen und peripheren Gefäßwiderstand beeinflussen.

Bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Koronararterien von Hunden wird die von Bradykinin hervorgerufene endothelabhängige Relaxation durch ACE-Hemmer verstärkt (Clozel 1991; Mombouli et al. 1992). Die Wirkung von ACE-Hemmern auf die lokale Verstärkung der Kinin-induzierten Vasodilatation scheint teilweise auf ihre Inhibition des Bradykinin-Abbaus und die erhöhte Produktion von aus dem Endothel stammende Relaxationsfaktoren (EDRFs) wie NO und Prostaglandinen zurückzuführen zu sein (Rhaleb et al. 2011).

Sowohl Human- als auch Tierstudien haben gezeigt, dass bei einer Ischämie Kinine aus dem Herzen freigesetzt werden (Hashimoto et al. 1978; Noda et al. 1993). Diese wirken auch über die Freisetzung von NO auf den B2-Rezeptor und spielen eine wichtige Rolle bei der kardioprotektiven Wirkung von ACE-Hemmern (Loke et al. 1999; Liu et al. 2002).

Wie bereits erwähnt (siehe **Abschnitt 1**), ist die erhöhte Bradykininkonzentration für die Entstehung von nicht-allergischen Angioödem verantwortlich. Das nicht-allergische Angioödem besteht aus fünf Subtypen: dem RAAS-induzierten Angioödem (RAE), dem hereditären Angioödem (HAE), dem erworbenen Angioödem (AAE), dem idiopathischen Angioödem (IAE) und dem pseudoallergische Angioödem (PAE) (Bas et al. 2007). Am häufigsten ist das RAAS induzierte Angioödem durch ACE-Hemmer oder AT1-Blocker Therapien (Hellebrand et al. 2005). Bei diesen Therapien tritt das Angioödem nicht nur am Anfang der Therapie auf, sondern kann es auch Jahre dauern, bis sich ein nicht-allergisches Angioödem entwickelt (Bas et al. 2004; Hellebrand et al. 2005). Die Entstehung vom Angioödem am Kopf-Hals-Bereich kann bei Lokalisation im Larynx zu einem lebensbedrohlichen Zustand führen (Bas et al. 2004).

Ursache für das hereditäre Angioödem (HAE) ist ein Mangel des C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH), der genetisch bedingt ist (Agostoni et al. 2004). Beim erworbenen Angioödem (AAE) liegt oft ein gesteigerter Verbrauch von C1-INH mit erniedrigter C1-INH-Plasmakonzentration zugrunde. Dies kann durch Autoantikörper, B-Zell-Lymphome (Markovic et al. 2000; Cicardi et al. 2003) oder durch Leberzellkarzinome und Leberzirrhose verursacht werden (Danielsson et al. 1990; Cohen et al. 1993). Das pseudoallergische Angioödem (PAE) ist ein u. a. durch Medikamente entstehendes Angioödem und kann z. B. nach Acetylsalicylsäure-Einnahme beobachtet werden (Morwood et al. 2005). Eine andere Form von Angioödem ist das idiopathische Angioödem (IAE). Der Auslöser vom IAE ist noch nicht bekannt.

Bei der Behandlung von nicht-allergischen Angioödem hat sich Icatibant als wirkungsvoll für die HAE-Fälle (Cicardi et al. 2010) und auch für die RAE-Fälle gezeigt (Bas et al. 2010; Bas et

al. 2015). Für die Behandlung von HAE wird darüber hinaus seit mehr als 30 Jahren ein C1-INH Konzentrat erfolgreich eingesetzt (Longhurst und Bork 2006;Bork et al. 2008).

3. Material und Methoden

3.1. Substanzen und Lösungen

Demineralisiertes und frisch und destilliertes Wasser wurde zur Herstellung der Puffer und der Lösungen benutzt. Die Chemikalien, deren Hersteller nicht spezifisch angegeben wird, wurden in bester verfügbarer Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

TAE-Puffer	40 mM Tris	10 mM EDTA
	0,1 % Essigsäure	pH 8,0

Tabelle 3.1

TE-Puffer	10 mM Tris	pH 8,0
	1 mM EDTA	

Tabelle 3.2

10 X TBE-Puffer	890 mM Tris	89 mM Borsäure
	20 mM EDTA	

Tabelle 3.3

DNA-Auftragspuffer	50 % Glycerin	50 mM EDTA
	0,1 % Bromphenolblau	10 % 10x TBE-Puffer

Tabelle 3.4

Agarosegel	TAE-Puffer	0,75 % bis 2 % Agarose
	0,5 µl/ml Ethidiumbromid	
	(Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst)	

Tabelle 3.5

OD-Mess-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5	1 mM EDTA pH 8,0
-----------------------	-----------------------	------------------

Tabelle 3.6

RIPA-Lysis-Puffer	150 mM NaCl	0,1 % NP-40 (Igepal)
	50 mM Tris	
	0,04 % Proteinase Inhibitor Coctail Set 3 (Calbiochem, Darmstadt)	

Tabelle 3.7

Bradford-Reagenz	5 % Ethanol	10 % Phosphosäure
	0,02 % Coomassie Blue G 250	

Tabelle 3.8

4X Trenngelpuffer	150 mM Tris/HCl	0,4 % SDS
	pH 8,8	

Tabelle 3.9

Sammelgelpuffer	250 mM Tris/HCl	0,2 % SDS
	pH 6,8	

Tabelle 3.10

Lysispuffer für Proteinpräparationen (mit Phosphataseinhibitoren)	5 mM Tris	1 mM EGTA
	1 mM EDTA	2,5 mM Na ₂ P ₂ O ₄
	1 mM Na ₃ VO ₄	1 mM PMSF
	5 mM NaF	pH 7,6
	Proteaseinhibitor Cocktail Tablete (Roche Biochemicals, Manheim)	Aprotinin, Leupeptin und Benzamidin

Tabelle 3.11

Krebs-HEPES Puffer	99 mM NaCl	1,87 mM CaCl ₂
	4,69 mM KCl	1,2 mM MgSO ₄
	25 mM NaHCO ₃	20 mM Na-HEPES
	1,03 mM K ₂ HPO ₄	11,1 mM Glucose
	pH 7,35	

Tabelle 3.12

Krebs-Henseleit Puffer (modifiziert) Ionenzusammensetzung	Hydrogencarbonat 25 mM	Sulfat 1,18 mM
	Natrium 145,85 mM	Kalzium 1,6 mM
	Chlorid 127,14 mM	Dihydrogenphosphat 1,18 mM
	Kalium 5,87 mM	Magnesium 1,18 mM
	pH 7,35	5,5 mM Glucose

Tabelle 3.13

SDS-Probenpuffer	50 mM Tris	10 % Glycerin
	2 % SDS	0,005% Bromphenolblau

Tabelle 3.14

10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris/HCl	1 % SDS
	1,92 M Glycin	pH 8,6

Tabelle 3.15

Transfer Puffer	25 mM Tris	20 % Methanol
	200 mM Glycin	pH 8,5

Tabelle 3.16

TBST-Puffer	20 mM Tris	0,1 % Tween 20
	150 mM NaCl	pH 7,6

Tabelle 3.17

Stripping-Puffer	5 mM Tris	2 % SDS
	0,75 % β -Mercaptoethanol	pH 7,6

Tabelle 3.18

Lysis-Puffer für Mausschwanzspitzen	50 mM Tris	100 mM EDTA
	100 mM NaCl	1 % SDS
	pH 8,0	

Tabelle 3.19

3.2. Western-Blot

3.2.1. Lysierung der Organe

Aus Lunge, Herz und Aorta der Spezies Maus und Schwein wurden Proteinfractionen isoliert (siehe **Abschnitt 3.4.3.**), um damit mittels Western-Blot die Proteinexpression untersuchen zu können. Die in Stickstoff gefrorenen Gewebe wurden mit einem ebenfalls in Stickstoff gefrorenen Metallmörser pulverisiert, schnellstens in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und direkt danach mit einer entsprechenden Menge eiskaltem Lysis-Puffer (**Tabelle 3.11**) versetzt. Größere Gewebeteile wie Herz, Lunge und Schweineaorta) wurden anschließend mittels eines Ultra-Turrax (T8, Ika Labortechnik, Staufen) auf höchster Stufe homogenisiert. Kleinere Gewebeteile wie Mauseorta und Koronararteriensegmente aus dem Schweineherz wurden auf Eis im Kühlraum für 10 Minuten bei 50 Hz einem Ultraschallgerät ausgesetzt (Labson 200, Bender & Hobins, Gera). Danach wurden die Homogenate bei 4 °C und 100 x g für 20 Minuten zentrifugiert (Heraeus Cryofuge 8500i, Thermo Scientific, Schwerte) und der Überstand in 2 bis 6 verschiedene Eppendorf-Gefäße aliquotiert.

3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Marion Bradford (Bradford 1976) verwendet. Die Methode basiert auf einer Absorptionsverschiebung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, München), von rotbrauner (ungebundener kationischer Zustand) bis blau (Komplexbildung mit Proteinen). Kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine werden von den Farbstoffen unspezifisch angebunden. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dadurch von 470 nm auf 595 nm. Die Proteinkonzentration in der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen (DU640 Spektrophotometer, Beckman, Krefeld). Vor jeder Messung wurde eine Kalibrierung mit einem

Standard-Protein durchgeführt. Hierzu wurde Serumalbumin vom Rind (BSA, Sigma, München) in Konzentrationen von 10 µg/ml bis 140 µg/ml in 5 mM Tris (pH 7,6) als Standard verwendet. Aus den Messwerten wurde mittels linearer Regression eine Kalibrationsgerade errechnet. Mithilfe der Steigung dieser Gerade war es dann möglich die Messwerte, die für die unterschiedlichen Verdünnungen der Proteinfractionen (1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400) ergaben, in die jeweilige Proteinkonzentration umzurechnen. Es wurden nur diejenigen Messwerte zur Berechnung verwendet, die sich im mittleren Bereich der Kalibrationsgerade befanden.

Für die Messungen wurden Standard-VIS-Küvetten (Sarsted, Nümbrecht) benutzt. Einer Mischung aus 100 µl Proteinlösung der Verdünnungsreihen werden 400 µl Bradford-Reagenz zugesetzt (**Tabelle 3.8**). Ein Blankwert mit 100 µl Tris und 400 µl Bradford-Reagenz wurde vor Beginn der Messreihe vermessen, um das Hintergrundrauschen zu Ausschließen.

3.2.3. Deglykosylierung

Einige Proben wurden mit N-Glucosidase F (PNGase F; Sigma-Aldrich, München) deglykosyliert. Dazu wurde ein Aliquot aus der Probe entnommen, das 50 µg Protein entsprach und mit destilliertem Wasser bis auf 35 µl aufgefüllt. Dann wurden 10 µl eines 250 mM Phosphat-Puffer (pH 7,5) und 2,5 µl einer Mischung von SDS (2 %) und β-Mercaptoethanol (1 M) zusammen pipettiert. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach dem Kühlen auf Eis wurden zusätzlich 2,5 µl Triton® X-100 (15%) und 2 µl N-Glucosidase F (0,5 Unit/µl) zugegeben. Es wurde mit der Hand geschüttelt, kurz zentrifugiert und für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Inkubat wurde dann für die Western-Blot-Analyse verwendet.

3.2.4. Allgemeines Western-Blot-Protokoll

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese (Laemmli 1970; Maizel et al. 1970). Die Proben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer (**Tabelle 3.14**) vermischt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert, um mögliche Fragmentierungen auszuschließen und allen Proteinen die gleiche negative Ladung zu geben. In allen Proben wurden die gleiche Proteinmenge (in µg) verwendet, um sie miteinander vergleichen zu können. Die Gelmatrix wurde zweigeteilt. Zuerst wurde ein Trenngel, je nach der untersuchten Proteingröße, mit 8 % bis 12 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Merck, Darmstadt) in Trenngel-Puffer (**Tabelle 3.9**) gegossen und mit 0,6 µl/ml TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (Merck, Darmstadt) und 0,8 µg/ml APS (Ammonium persulfat) (Sigma, München) polymerisiert. Nach Abschluss der Polymerisation wurde auf das Trenngel

ein Sammelgel mit 4,5 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in Sammelgel-Puffer (**Tabelle 3.10**) gegossen und mit 0,6 µl/ml TEMED und 0,8 µg/ml APS polymerisiert. Während der Polymerisation des Sammelgels sorgte ein oben eingesteckter Kamm dafür, dass die Einfülltaschen für die Proteinproben genau dieselbe Größe aufwiesen. Für die Gelherstellung und die Elektrophorese wurden Apparaturen von der Firma Bio-Rad, München, verwendet.

Pro Gel wurde eine Tasche mit einem farbmarkierten Protein-Größenstandard (Page Ruler™ Fermentas, St. Leon-Rot) beladen. Die maximale Proteinmenge pro beladene Tasche durfte 100 µg nicht überschreiten, um eine ordnungsgemäße Trennung zu gewährleisten. Der Gellauf erfolgte mit SDS-Laufpuffer (**Tabelle 3.15**) bei 150 V für ca. 75 Minuten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die durch das Bromphenolblau markierte Startlinie der Proteinfractionen nicht aus dem Gel hinauslief. In einigen Fällen wurde jedoch zur besseren Trennung der Proteinfractionen solange gewartet, bis der Standardproteinmarker für 25 kD bis an das Ende des Gels migriert war. Vor dem vollendeten Gellauf wurden die Apparaturen (Bio-Rad, München) und der Transferpuffer (**Tabelle 3.16**) vorbereitet und der Puffer wurde kaltgestellt. Die PVDF-Membran (Polyvinylidene Fluoride) (Porengröße 0,45 µm; Millipore, Schwalbach) wurde kurz im MeOH (Methanol) (Merck, Darmstadt) aktiviert, anschließend 2 Minuten im destillierten Wasser gewaschen und danach für mindestens 5 Minuten im Transferpuffer inkubiert. Die aufgetrennten Proteine wurden vom Trenn-Gel auf die PVDF-Membran in die Blotting-Apparatur übertragen. Der Transfer erfolgte für 90 Minuten bei 100 V in gekühltem Transferpuffer, welcher mittels Akkus kalt blieb. Die Membran wurde nach dem Transfer getrocknet.

Um unspezifische Bindungen zu sättigen wurde die Membran mit 6 % Magermilchpulver (Sigma, München) in TBST (Tris-Buffered Saline plus Tween 20) (**Tabelle 3.17**) für 1 bis 3 Stunden oder mit 2 % ECL Advanced Blocking Agent (Amersham™ ECL Advance Western-Blotting Detection Kit; GE Healthcare, München) blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper, entweder suspendiert in 1 % Magermilchpulver oder 2 % ECL Advanced Blocking Agent mit TBST, für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4 °C über Nacht inkubiert. Hierfür wurden monoklonale Antikörper aus der Maus oder polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen verwendet (**Tabelle 3.20**). Nach der ersten Antikörperinkubation wurde die Membran erneut 4-mal 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem anti-IgG-Antikörper (1:5000) inkubiert. Für monoklonale Antikörper wurde hierfür Maus-IgG- (Bio-Rad, München) und für die polyklonalen Antikörper Kaninchen-IgG-Antikörper (Calbiochem, Darmstadt) verwendet.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran erneut 4 mal 5 Minuten mit TBST gewaschen, danach für 5 Minuten mit dem Lumi-Light Western-Blotting-Substrat (Roche Biochemicals, Mannheim) oder mit Lumigen™ TMA-6 (Amersham™ ECL Advance Western-Blotting Detection Kit; GE Healthcare, München) inkubiert. Durch die Peroxidase-Aktivität des

sekundären Antikörpers entstand ein Chemilumineszenz-Signal, welches durch Belichtung eines Röntgenfilms (HyperfilmTM ECL, Amersham, GE Healthcare, München) sichtbar gemacht werden konnte. Der Film wurde in unterschiedlicher Länge, von Sekunden bis Minuten, belichtet und danach entwickelt. Ein polyklonaler anti-Aktin-Antikörper wurde als Ladekontrolle benutzt. Um die Antikörperbindungen und Blockierungs-Reagenzien zu entfernen, wurde die Membran mit einem Stripping-Puffer (**Tabelle 3.18**) mit β -Mercaptoethanol bei 50 °C für 20 Minuten in 5-minütigen Abständen geschüttelt und anschließend 4-mal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Die Membran stand nach dieser Stripping-Prozedur für eine erneute Antikörperinkubation, beispielsweise den Antikörper gegen Aktin, zur Verfügung.

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Hersteller
anti-B2 Bradykinin Receptor	Kaninchen	1:1000	Affinity BioReagents, Bonn.
anti-B2 Bradykinin Receptor	Kaninchen	1:1000	Biozol, Eching
anti-B2 Bradykinin Receptor	Kaninchen	1:1000	Sigma, München
anti-B2 Bradykinin Receptor	Kaninchen	1:1000	Acris Antibodies, Hiddenhausen
anti-B2 Bradykinin Receptor	Maus	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
anti-B2 Bradykinin Receptor	Maus	1:200	R&D Systems, Minneapolis
anti-VASP	Kaninchen	1:1000	Alexis, Lössrach
Anti-P-Ser239-VASP	Maus	1:1000	Alexis, Lössrach
Anti-Aktin	Kaninchen	1:2500	Sigma, München

Tabelle 3.20: Verwendete Antikörper.

Mit Hilfe eines Densitometers (Gel Doc 1000, Bio-Rad, München) wurden die entwickelten Filme vermessen. Die Auswertung der optischen Dichte der Banden geschah mit der Herstellersoftware „Quantity One“ (Version 4.1.1). Nur die Banden desselben Blotes wurden vermessen und auf die jeweilige Kontrolle auf 100 % standardisiert.

3.3. Präparation und Analyse der RNA

3.3.1. RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte durch Hilfe des RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden). Die zu 80 bis 90 % konfluent kultivierten Zellen wurden mit PBS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen und mit 700 µl kaltem Lysispuffer, bestehend aus 693 µl RLT-Puffer® (Quiagen, Hilden) und 7 µl β-Mercaptoethanol (99 %), versetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber (Neolab, Heidelberg) abgeschabt und sofort in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Suspension wurde gut homogenisiert, um alle Zellklumpen zu lösen. Die komplette Zellsuspension wurde auf eine QIAshredler® (Quiagen, Hilden) Säule gegeben und 2 Minuten bei 15.000 x g (Heraeus Biofuge Pico, Heraeus) Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 700 µl 70 % Ethanol versetzt und gründlich suspendiert. Anschließend wurden 700 µl davon auf RNeasy® Säule (Quiagen, Hilden) gegeben und bei Raumtemperatur 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde der Durchlauf verworfen, die restliche Probe wurde auf die RNeasy-Säule gegeben, bei Raumtemperatur 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und erneut wurde der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde 350 µl RW1 Puffer® (Quiagen, Hilden) auf die Säule gegeben, bei Raumtemperatur 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf wurde verworfen. Ein DNase mix, der aus 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer® (RNase-Free DNase Set; Quiagen, Hilden) besteht, wurde vorher vorbereitet. Von diese DNase mix wurden 80 µl auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben, bei 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf wurde erneut verworfen. Die Säule wurde auf ein neues Auffanggefäß gegeben. Danach wurde 500 µl RPE Puffer® (Quiagen, Hilden) auf die Säule pipettiert, bei Raumtemperatur 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf wurde verworfen. Dieser Schritt wurde nochmals durchgeführt und zusätzlich noch bei Raumtemperatur 15.000 x g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gesetzt, 50 µl RNase freies Wasser (RNase-Free DNase Set; Quiagen, Hilden) hinzugegeben, bei Raumtemperatur 2 Minuten inkubiert und anschließend bei 15000 x g für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und bei 15.000 x g für eine Minute zentrifugiert. Letzter Schritt erfolgte zur Erhöhung der Ausbeute.

3.3.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Das Photometer (Eppendorf BioPhotometer; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) wurde auf RNA eingestellt (UV 260 und 280 nm). In einem 0,5 ml Eppendorf Gefäß wurden 45 µl OD-Messpuffer (**Tabelle 3.6**) vorgelegt und zusätzlich 5 µl von der Probe zugefügt. Ein Blankwert mit 50 µl OD-Messpuffer wurde vor Beginn der Messung vermessen. Der

Verdünnungsfaktor von 1:10 wurde im Photometer eingegeben und die Proben wurden dann gemessen.

3.3.3. RNA-Analyse

Eine Synthese der cDNA wurde für die Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Gene, benötigt. Für die cDNA-Synthese wurde ein Aliquot aus der Probe entnommen, das 2 µg RNA entsprach. Danach wurden 1 µl Random Hexamer Primer (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) zugefügt und mit DEPC behandelten Wasser (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) bis auf 12 µl aufgefüllt. Anschließend wurde es mit der Hand vorsichtig gemischt, für 3 bis 5 Sekunden zentrifugiert und bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe direkt auf Eis gelegt und erneut für 3 bis 5 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden 4 µl eines 5-fach Reaktionspuffers (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 µl dNTP mix (10 mM) (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) zusammengefügt. Anschließend wurde die Probe vorsichtig gemischt, für 3 bis 5 Sekunden zentrifugiert und bei 25 °C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden zusätzlich noch 1 µl RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) zugefügt. Diese Lösung wurde erst bei 25 °C für 10 Minuten und anschließend bei 42 °C für 60 Minuten inkubiert. Diese Reaktion wurde dann durch Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten gestoppt und die Probe auf Eis gekühlt.

3.3.4. Bradykinin-Rezeptor-Expressionsanalyse

Zur Bestimmung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression wurden die unten beschriebenen Primer für humane und porcine cDNA-Proben verwendet.

Human

1. Primer Sense 5' CAC ATC CCA CTC TGA GTC CA 3'
2. Primer Antisense 5' CAG CAC AAC CAG GAC TAG CA 3'

Programm für die PCR

Denaturierung: 94 °C 3'

Denaturierung: 94 °C 30''

Annealing: 60 °C 30''

Elongation: 72 °C 1'

Zyklen: 44

Porcin

1. Primer Sense: 5' GCC TCT TTT CCG CTT TCT TT 3'

2. Primer Antisense: 5' GTG TCC AGG AAG GTG CTG AT 3'

Programm für die PCR

Denaturierung: 94 °C 3'

Denaturierung: 94 °C 30''

Annealing: 63 °C 30''

Elongation: 72 °C 25''

Zyklen: 44

3.4. Versuchstiere

Die Gewebe der Tiere nach Fütterungsversuchen wurden von Dr. rer. nat. Marc Oppermann (PETN) (Oppermann et al., 2009; Oppermann et al., 2008) und Dr. rer. nat. Thao-Vi Dao (L-NA) (Dao et al., 2010) zur Verfügung gestellt. Diese Versuche wurden von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt (AZ 23.05-230-3-77/99, AZ 23.05-230-3-52.99, AZ 50.05-230-3-65/99, AZ 50.05-230-3-94/00, AZ 50.05-230-18/06). Alle anderen Versuche wurden mit Geweben von unbehandelten 3-6 Monate alten männlichen Mäusen verschiedener Stämme (siehe unten) durchgeführt. Die Zucht und Haltung dieser Tiere unter standardisierten Bedingungen (20°C Raumtemperatur, relative Luftfeuchtigkeit 55% +-5 %, 12 h-Tag-Nacht Rhythmus durch Kunstlicht) gewährleistete die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität unter der Leitung von Frau Dr. Annemarie Treiber bzw. ihres Nachfolgers Herrn PD Dr. med. vet. Martin Sager. Die Tiere erhielten keimfreies Trinkwasser und standen unter tierärztlicher Kontrolle. Für die Versuche wurden folgende Spezies und Linien verwendet: C57 Black 6 Mäuse (C57Bl/6), transgene Mäuse mit endothelspezifischer Überexpression der eNOS (eNOS^{tg}), eNOS-defiziente Mäuse (eNOS^{-/-}) sowie die jeweiligen transgen-negativen Geschwistertiere.

3.4.1. Fütterungsversuche

3.4.1.1. Fütterungsversuch mit dem organischen Nitrat PETN

Für die Fütterungsstudie mit PETN wurden männliche Mäuse des C57Bl/6-Stammes verwendet. Es erfolgte eine Einteilung in verschiedene Gruppen. Die Mäuse bekamen Standardfutter (PETN-0) oder Futter, das mit 6 mg (PETN-6) oder 60 mg (PETN-60) PETN (Actavis, Langenfeld) / Körpergewicht/ d versetzt war. Das Futter wurde von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) geliefert und basierte auf der „Global Diet 2016 for rodents“. Die entsprechenden Mengen von PETN wurden so homogenisiert, dass bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 g pro Maus, eine tägliche Futteraufnahme von 5 g angenommen wurde. Der Plasmakonzentration der PETN Metaboliten PETN-Dinitrat (PEDN) und -Mononitrat (PEMN) wurden in PETN-behandelten Mäusen gemessen. Die Konzentrationen der beiden Metaboliten nahmen mit steigender PETN-Dosis in direkt proportionaler Weise zu (Oppermann et al. 2008). Kojda et al. haben die NO-Freisetzung und die Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase durch PETN gezeigt und bestätigten reproduzierbar die Wirkung durch Vasorelaxations-Experimente (Kojda et al. 1998a).

3.4.1.2. Fütterungsversuch mit L-Nitroarginin

Eine Gruppe C57Bl/6 Mäuse erhielt eine Behandlung mit dem eNOS-Inhibitor N-Nitro-L-Arginin (L-NA, Sigma, München). Hierzu wurde im Trinkwasser der Mäuse eine Konzentration von 1,5 mg/ml L-NA eingestellt. Diese Dosierung entspricht ungefähr 100 mg/kg/d bei etwa 2 ml täglich aufgenommener Flüssigkeitsmenge (Kojda et al. 1999). Die Behandlung dauerte 3 Wochen und die Trinkwasser-Lösungen wurden jeden Tag erneuert. Die Effektivität der Behandlung wurde in verschiedenen Arbeiten unsere Arbeitsgruppe untersucht (Oppermann et al. 2011; Suvorava et al. 2015).

3.4.2. Genotypisierung transgener Tiere

Zur Untersuchung, ob endogen gebildetes NO einen Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors hat, wurden Gewebe von transgenen Tieren untersucht, die durch eine endothelspezifische Überexpression der eNOS charakterisiert sind. Dieser Tierstamm war im Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf bereits etabliert worden (Suvorava et al. 2005; Oppermann et al. 2011). Bovine eNOS DNA (4,1 kb) wurde zwischen dem murinen Tie-2-promotor und einem Tie-2-Intron Fragment (wird als Tie-2-Enhanced verwendet) kloniert, um spezifisch eine zusätzliche eNOS-Genexpression in arteriellem und venösem Gefäßgewebe zu erzielen (**Abb. 3.1**).

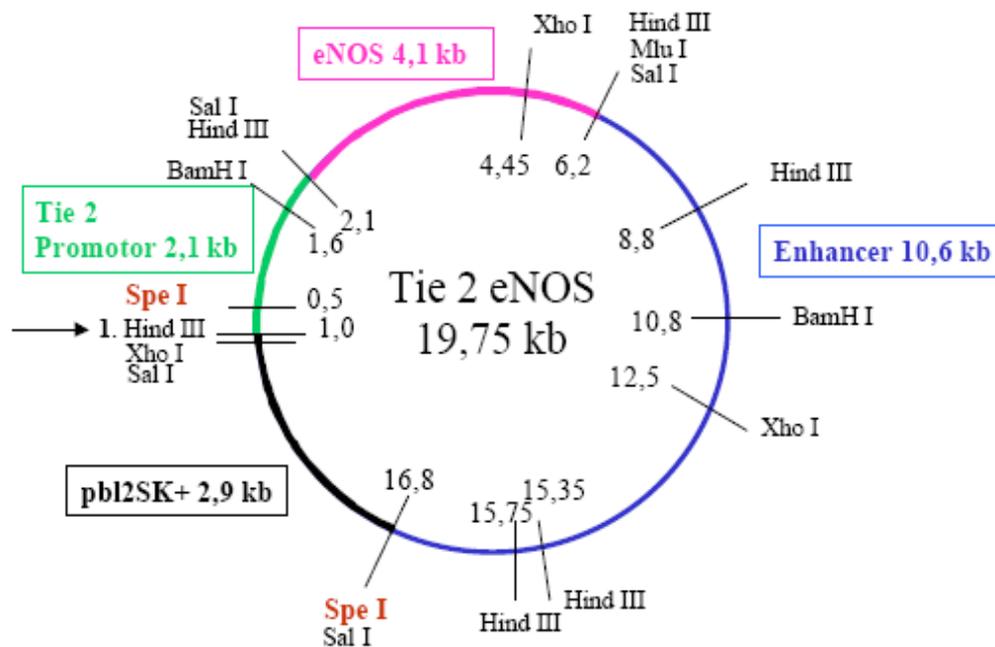


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Tie-2-eNOS-Plamids mit markierten Schnittstellen für ausgewählte Restriktionsenzyme (Abbildung aus Dissertationsschrift von Martina Weber) (<https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=2197>). (Weber et al. 2002).

Der genetische C57Bl/6-Hintergrund der eNOS^{tg}-Mäuse, wurde durch mehr als zehnmahlige Rückkreuzung mit C57Bl/6 Mäusen erhalten. Transgen-negative Geschwistertiere (eNOSⁿ), die genetisch grundsätzlich den C57Bl/6-Mäusen entsprechen, dienten für die Experimente als Kontrollen. Zur Untersuchung, ob der Verlust von NO einen Einfluss auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression hat, wurden eNOS defiziente Mäusen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene eNOS^{-/-}-Stämme benutzt. Der als eNOS-KO-S bezeichnete Stamm wurde von Shesely et al. generiert (Shesely et al. 1996), während der als eNOS-KO-G bezeichnete Stamm von Gödecke et al. etabliert wurde (Gödecke et al. 1998).

Die Schwanzspitzenbiopsien der Mäuse wurden im Alter von etwa 3 Wochen gewonnen und zur Präparation der genomischen DNA verwendet. Zu diesen Schwanzspitzenbiopsien wurden 750 µl eines Puffers bestehend aus 750 µl Lysis-Puffer (**Tabelle 3.19**) und 17,5 µl (0,5mg/ml) Proteinase K gegeben. Diese Proben wurden über Nacht bei 56 °C inkubiert und geschüttelt (Thermomixer; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Anschließend wurden die Proteine durch Aussalzen mit 250 µl NaCl-Lösung (6M) gefällt, für 5 Minuten geschüttelt und danach für 15 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert. Der größte Teil des Überstandes (710 µl) wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl eiskaltem Ethanol versetzt, einige

Male geschwenkt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand mit 750 µl kaltem 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 4 °C 15.000 x g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet, die Restflüssigkeit abpipettiert und das Pellet getrocknet. Zuletzt wurde in 100 µl TE-Puffer (**Tabelle 3.2**) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde als Template für die anschließende PCR verwendet.

Jede PCR-Probe enthielt 1-2 µl der DNA-haltigen Lösung, 2,5 µl Mastermix (Qiagen, Hilden) und 0,4 µM Primer. Die DNA wurde in Mastercycler (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) vervielfältigt. Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer (**Tabelle 3.4**) im Verhältnis 1:1 gemischt und in den Geltaschen der Agarose gel (**Tabelle 3.5**) mit positiven und negativen Kontrollen (DNA bereits charakterisierter Mäuse) aufgetragen und als Größenstandard eine 100-oder 1000-Basenpaarleiter (Invitrogen, Karlsruhe; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese in TAE Puffer (**Tabelle 3.1**) in einer Kammer von Bio-Rad (München) bei 90 V für etwa 30 min. die Auswertung wurde unter UV-Licht (254 nm) durchgeführt.

Der unten beschriebene Primer wurden für die PCR verwendet.

Genotypisierung der eNOS^{tg} Mäuse

1. Primer Sense: 5' GGG AAG TCG CAA AGT TGT GAG 3'
2. Primer Antisense: 5' GCT CCC AGT TCT TCA CGC CAG 3'

Programm für die PCR

Denaturierung: 95°C 3'

Denaturierung: 95 °C 1' 10''

Annealing: 54 °C 1' 15''

Elongation: 72 °C 2' 7'

Zyklen: 35

Genotypisierung der eNOS^{-/-} Mäuse

1. Primer: eNOS Mu Sense 5' CTC GAC GTT GTC ACT GAA GC 3'
2. Primer: eNOS Mu Antisense 5' TCA AGA AGG CGA TAG AAG GC 5'

3. Primer: Neo Sense 5' GCA TCA CCA GGA AGA AGA CC 3'
4. Primer: Neo Antisense 5' GAG CCA TAC AGA TGG TTG CC 3'

Programm für die PCR:

- Denaturierung: 95°C 3'
- Denaturierung: 94 °C 1' 10''
- Annealing: 55 °C 1' 15''
- Elongation: 72 °C 1' 7''
- Zyklen: 35 Zyklen

3.4.3. Präparation und Entnahme der Gewebe

Die Mäuse wurden mittels CO₂-Inhalation euthanasiert und anschließend auf eine Präparationsapparatur (**Abb. 3.2**) fixiert. Für die anschließende Präparation wurde Krebs-Hepes-Puffer (**Tabelle 3.12**) verwendet. Das Fell wurde entfernt und mit Hilfe einer Schere wurden seitlich der Rippen eingeschnitten. Das Diaphragma wurde vom Brustkorb entfernt. So gelang es, den thorakalen Bereich freizulegen. Die Lungen, das Herz und die thorakale Aorta wurden sorgfältig entfernt und mit Krebs-Hepes-Puffer (KHP) gewaschen. Beim Präparieren der Aorta wurde darauf geachtet, dass diese nicht zu stark gedehnt oder zusammengedrückt wurde, sodass die Endothelzellen unbeschädigt blieben. Das Durchspülen der Aorta mit KHP erfolgte langsam und mit wenig Druck noch in-situ nach Punction des linken Ventrikels im Bereich des Apex. Das Schockgefrieren erfolgte in flüssigem Stickstoff und die anschließende Einlagerung der Gewebeprobe erfolgte bei -80 °C.

3.5. Zellkultur

3.5.1. Isolierung der Schweine-Aorten-Endothelzellen

Die Aorten frisch geschlachteter Schweine, die zur Präparation der Endothelzellen benötigt wurden, stammten aus dem Duisburger Schlachthof „Frische Kontor GmbH“. Zur Vermeidung der Kontamination mit Mikroorganismen wurden die Aorten in autoklavierten Kunststoffbeuteln (VWR, Langenfeld) auf Eis transportiert. Im Gegensatz zu der üblichen Transportweise in gekühltem PBS oder Nährmedium kam es deutlich seltener zu einer Kontamination der Primärkulturen der Endothelzellen. Die Methode zur Isolierung und Anzucht der Endothelzellen der Schweineaorten wurden zunächst anhand der Zell-Ausbeute evaluiert. Hierzu wurden 3 verschiedene Methoden miteinander verglichen und die effektivste Methode ausgewählt.



Abbildung 3.2: Ein Bild der Präparationsapparatur.

Methode 1:

Zu Beginn der Präparation wurden die Aorten von allem anhängenden Gewebe mit Hilfe einer Schere gereinigt (**Abb. 3.3-A, B**). Die äußeren Teile der Aorta wurden danach mit 80 % Alkohol desinfiziert. Aus der Aorta wurden unter dem „Laminar Air-Flow“ auf der sterilen Arbeitsfläche in viereckige Stücke präpariert, die dann zur weiteren Bearbeitung in speziell angefertigten Präparationsapparat gespannt wurden (**Abb. 3.3-C+D**). Nur auf diese Weise ließen sich die Aortenstücke sorgfältig in dem Apparat platzieren und befestigen. Anschließend wurden 2 ml Dispase-Lösung (55 Unit/ml, Roche Biochemicals, Mannheim) gleichmäßig auf die endotheliale Oberfläche der Aortenstücke verteilt und für 15 Minuten in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur weiteren Isolierung erfolgte die Zugabe von 8 ml Nährmedium (siehe **Abschnitt 3.5.7.1**) und das Absaugen der gesamten Flüssigkeit in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon-RöhrchenTM, BD, Heidelberg). Nach einer Zentrifugation bei 200 x g für 5 Minuten wurde der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt und erneut 14 ml Nährmedium zugefügt und in eine 75 cm² Zellkulturflasche (BD, Heidelberg) abpipettiert. Die Lagerung der Flaschen erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Nach 24 h wurde das Nährmedium gewechselt.

A



B



C



D

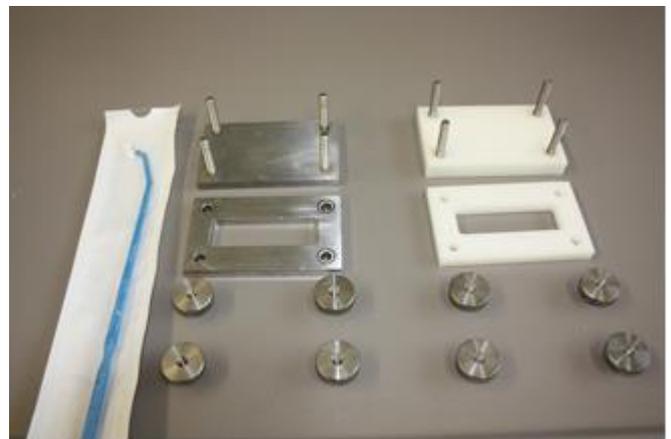


Abbildung 3.3: Beispiel Bilder **A)** Ungereinigte Schweineaorta, **B)** Gereinigte Schweineaorta (Abbildung aus Dissertationsschrift von Sawzan Agouri, <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=34363>) **C+D)** Apparaturen zur Fixierung der Aortensegmente.

Methode 2:

Die äußeren Seiten der Aorta wurden mit 80 % Alkohol desinfiziert. Mit einer sterilen Schere wurde die Aorta durchgeschnitten und mit einem sterilen Wattestäbchen Abstriche genommen und in eine Zellkulturschale vorsichtig übertragen. Es wurden danach 20 ml Nährmedium zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 24 h inkubiert. Nach einem weiteren Nährmedium-Wechsel wurde bis zur Konfluenz des Zellwachstums gewartet, wobei alle 2 Tage ein Wechsel des Nährmediums erfolgte.

Methode 3:

Alle Ausgänge und Verzweigungen der Arteria intercostalis wurden mit Hilfe von Klammern (**Abb. 3.4-B**) oder Nähmaterials (**Abb. 3.4-A**) verschlossen. In den vorderen Teil der Aorta wurde ein steriler Mikrosauger (1,0 x 60 mm, Spiggle&Theis, Overath) geklemmt. Dann wurde

mit 20 ml PBS durchgespült und das andere Ende der Aorta mit einer Klemme verschlossen, 10 ml Dispase-Lösung eingespritzt und für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen und zusätzlich noch mit 20 ml Nährmedium nachgespült. Dieses Gefäß wurde mit 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde mit 15 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche pipettiert. Nach Auswertungen der Zellausbeute wurde diese Methode für die weiteren Zellisolierungen ausgewählt.

A



B



Abbildung 3.4: Beispielbilder von Schweineaorten **A)** Arteriae intercostalis mit Nähmaterial verschlossen, **B)** Arteriae intercostalis mit Klammern verschlossen (Abbildung aus Dissertationsschrift von Sawson Agouri, <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=34363>).

3.5.2. Isolierung der glatten Muskelzellen

Auch für die Etablierung der Isolierung glatter Muskelzellen aus der Schweineaorta sind verschiedene Methoden durchgeführt worden, um die effektivste diese Methoden auswählen zu können.

Methode 1:

Die Aorten wurden mit dem im Kapitel 3.5.1.1. vorgestellten Apparat fixiert (**Abb. 3.3 C, D**). Um die Endothelzellen zu entfernen wurde die Aorta mit einem Skalpell abgekratzt und mit PBS durchgespült. Dieses Verfahren wurde 2-mal wiederholt.

Danach wurde mit 2 ml Dispase-Lösung 20 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Nährmedium zusätzlich zugefügt und alles in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 15 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde hiernach in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt.

Methode 2:

Die Aorten wurden fixiert, abgekratzt und anschließend gewaschen (siehe **Abschnitt 3.5.2.1**). Aus den Aorten wurden mit Hilfe eines Skalpell's kleine Stückchen entnommen und in eine Schale gleichmäßig platziert. Danach wurde 20 ml Nährmedium vorsichtig zugefügt und für eine Woche inkubiert. Nach Auswertungen der Zellausbeute wurde diese Methode für die weiteren Zellisolierungen ausgewählt.

3.5.3. Isolierung der humanen venösen Endothelzellen der Nabelschnüre

Die Nabelschnüre wurden mit Alkohol äußerlich desinfiziert. Anschließend wurde der Mikrosauger in die Vene eingeführt und mit Hilfe einer Klemme befestigt. Es wurde 2-mal mit PBS durchgespült und das andere Ende von der Nabelschnur eingeklemmt. Danach wurde 10 ml Dispaeselösung eingespritzt und für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen und mit 20 ml Nährmedium das Gefäß nachgespült. Anschließend mit 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, mit 15 ml Nährmedium das Pellet suspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt.

3.5.4. Aufreinigung der Zellen

Nach der Isolierung der Zellen wurde vor der Fütterung unter einem Mikroskop (Phase-Kontrast, Nikon) kontrolliert, ob eine Kontamination mit anderen Zellen vorliegt. Die kontaminierten Zellkulturflaschen wurden 2-mal mit PBS gewaschen. Unter einem Mikroskop wurden die gewünschten Zellen (z. B. Endothelzellen) mit einem Zellschaber (Neolab, Heidelberg) abgeschabt. Anschließend wurden 10 ml Nährmedium zugefügt und abschließend wieder abgesaugt und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.5.5 Isolierung von DNA aus Zellkulturen

Aus der Zellkulturflasche oder -schale wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen und Trypsin zugegeben. Das Trypsin (Gibco, Karlsruhe) wurde mit dem Nährmedium inaktiviert, anschließend mit einer 5 ml Pipette suspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen eingeführt. Anschließend wurde es bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, mit 10 ml PBS das Pellet suspendiert und 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und mit 200 µl PBS in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Anschließend wurde 20 µl Quiagen Protease oder Proteinase K und zusätzlich noch 200 µl Puffer AL (QIAamp® Mini Kit, Qiagen, Hilden) zugefügt, danach für 10 Minuten bei

56 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 96 bis 100 %iger Ethanol zugegeben, für 15 Sekunden mit einem Vortex geschüttelt und kurz zentrifugiert. Das Lysat wurde zentral auf die QIAamp® Mini Spinsäule, die in einem Auffanggefäß war, pipettiert, ohne die Membran zu berühren und bei 6000 x g für eine Minute zentrifugiert die Säule wurde in ein frisches Auffanggefäß gestellt, danach ohne die Ringe nass zu machen 500 µl Puffer AW1 (Qiagen, Hilden) zugegeben und bei 6000 x g für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde erneut in ein frisches Auffanggefäß gestellt, anschließend, ohne die Ringe nass zu machen 500 µl Puffer AW2 (Qiagen, Hilden) zugegeben und bei 15000 g für 3 Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde erneut in ein frisches Gefäß gestellt, bei 15000 g für eine Minute zentrifugiert und danach in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäße gestellt. Anschließend wurde 200 µl Puffer AE, oder RNA- und DNA-freies destilliertes Wasser (Qiagen, Hilden) auf die Säule gegeben für 2 Minuten inkubiert und für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Eluat im Eppendorf-Gefäß eingefroren.

3.5.6. Geschlechtsspezifische PCR

Für die Experimente wurden männliche Schweine benutzt, um geschlechtsspezifische Phänomene auszuschließen. Amylogeninein ist ein gewebespezifisches Protein, das im Zahnschmelz-Epithel der Zähne zu finden ist (Ikawa et al. 2005). Es wird durch zwei Gene codiert, Amel X und Amel Y. Diese unterscheiden sich in ihrer Sequenz im 5-UTR. Die auf den X- oder Y- Chromosom des Amylogenin-Gens bindenden Primerpaare wurden entworfen, um das Geschlecht der Tiere herauszufinden. Die Amel Y Fragmentgröße betrug 277 bp und die Amel X 245 bp.

1. Y-Chromosom Primerpaar:

Sense: 5'- ACCACAGCTGATGGCAAAGC -3'

Antisense: 5'- CCGGGAACCTTTTGAGAGTCC -3'

2. X-Chromosom Primerpaare:

Sense: 5'- TGGGCAACATTAGTACGACACG -3'

Antisense: 5'- GCTGTGATTAGTCCATGCAGTTTG -3'

Aus den porcinen Aorten-, Endothel- oder Muskelzellen wurde die DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.5.5). Danach wurden DNA, Mastermix, Sense und Antisense Primer zusammen gemixt und in Mastercycler vervielfältigt.

1. Denaturierung: 94 °C 3 min
 2. Denaturierung: 94 °C 30 sec
 3. Annealing: 63°C 30 sec
 4. Elongation: 72 °C 30 sec
- Zyklen: 44

3.5.7. Handhabung der Zellen

3.5.7.1. Fütterung der Zellen

Für die Fütterung der Zellen wurden zu 500 ml Medium 50 ml FCS Gold (PAA, Cölbe) und 5,5 ml 100-fachen Penicilline Streptomycin (PAA, Cölbe) zugefügt. Für die Fütterung der porcinen Aorten-Endothelzellen (PAEC) und porcinen Aorten-glatten Muskelzellen (PSMC)) wurde Medium M199 und für die Tumor-Zellen Medium MEM (PAA, Cölbe) verwendet. Für die Fütterung der primären menschlichen dermalen Blut-Endothelzellen (HDBEC) (Promocell, Heidelberg) wurden zu Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell, Heidelberg) mitgelieferte Supplement-Mix zugefügt. Vor der Fütterung der Zellen wurde dieses Gemisch mithilfe eines Wasserbades (GFL, Burgwedel) auf 37 °C erwärmt. Das Medium in der Zellkulturflasche oder -schale wurde abgesaugt und eine entsprechend große Menge frisches Medium zugefügt.

3.5.7.2. Passagierung der Zellen

Trypsinieren: Das Medium wurde abgesaugt, mit PBS gewaschen und danach eine entsprechende Menge Trypsin zugefügt (für d100 Petrischale 1 ml, 75cm² Zellkulturflasche 2 ml und 175 cm² Flasche 4 ml). Unter einem Mikroskop wurden die Zellen beobachtet und nach der Zusammenziehung und Auflösung des Zellverbandes wurde das Trypsin mit dem Nährmedium inaktiviert, anschließend mit einer 5 ml Pipette suspendiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.

Bei den Endothelzellen dauerte diese Trypsininkubation ungefähr 3 bis 5 Minuten und bei den Tumor-Zellen dauerte es 5 bis 15 Minuten. Um die Zellen zu lösen klopfen wir nach der Inkubationszeit an der Flasche.

Die Zellsuspension wurde bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und mit Nährmedium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in gewünschte Mengen von Flaschen oder Schalen geteilt und noch reichlich Nährmedium zugefügt.

Schaben: Das Medium wurde abgesaugt und mit PBS gewaschen, danach entsprechende Menge PBS zugefügt (für d100 Petrischale 2 ml, 75cm² Zellkulturflasche 4 ml und 175 cm² Flasche 8 ml) und anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit einer 5 ml Pipette pipettiert und suspendiert und dem noch frischen Nährmedium zugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension in gewünschte Mengen in Flaschen oder Schalen verteilt und noch reichlich Nährmedium zugefügt.

3.5.7.3. Zellzahl-Bestimmung

Das Nährmedium aus der Zellkulturschale oder -flasche wurde abgesaugt und 2-mal mit PBS gewaschen. Mit Trypsin wurden die Zellen abgelöst, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abpipettiert und mit der 7-fachen Menge Nährmedium inaktiviert. Die Vereinzelnung der Zellen wurde durch Re-Suspendierung der Lösung erzielt. Das Röhrchen wurde bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml PBS gelöst. Von dieser Suspension wurde 50 µl abgenommen und mit 50 µl Trypanblue stain versetzt. Dieses Gemisch wurde in der Neubauer Zählkammer verwendet. Auf dem Zählfeldern wurden alle vier großen Quadrate (je 1 mm²) ausgezählt und mit der Formel (siehe **Abbildung 2.5**) berechnet. Die Zellzahl wurde auch mit einem Zellzählgerät (CountesTM; Invitrogen, Darmstadt) bestimmt.

Abbildung 3.5: Zellzahl-Bestimmungs-Formel (der Verdünnungsfaktor bei einer 1:1 Verdünnung beträgt z. B. 2).

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} * 10000 * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

3.5.7.4. Lysierung der Zellen

Das Nährmedium wurde aus der Flasche abgesaugt und 2-mal mit PBS gewaschen, anschließend eine entsprechende Menge Ripalysispuffer (**Tabelle 3.7**) auf die Zellen pipettiert und mit einem Zellschaber abgeschabt. Das Proteinlysate wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und aufs Eis gelegt. Zusätzlich wurde es 15 Minuten bei 4 °C im Ultraschallbad beschallt. Danach wurde es bei 100 x g zentrifugiert und den Überstand in mehrere 0,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt. Dies wurde dann in -80 °C gelagert. Zur Aufbewahrung wurden die Eppendorf-Gefäße langsam auf -80 °C abgekühlt.

2.5.7.5. Inkubation der Zellen

Nach Erreichen einer 80 % Konfluenz, wurden die Zellen mit den aufgeführten Substanzen zu festgelegten Zeiten und Konzentrationen (**Tabelle 3.21**) inkubiert. Die Substanzen wurden für jede Charge gleichzeitig mit einer Kontrolle, die das Lösungsmittel (PBS, DMSO) in der die Substanz aufgelöst war darstellte, behandelt.

Nach der Inkubation wurden die Schalen oder Flaschen 2-mal mit PBS gewaschen und entsprechende Menge (d100 Petrischale und 75 cm² 150 µl, 175 cm² 250 µl) Ripalysispuffer auf die Zellen pipettiert und anschließend mit einem Zellschaber geschabt (siehe **Abschnitt 3.5.7.4.**).

Inkubationszeiten	5 min	1 h	3 h	6 h	12 h
SNAP		10 µM	1-100 µM	10 µM	
Deta-NO		100 µM	100 µM	100 µM	100 µM
L-NAME		10 µM	10 µM	10 µM	-
Kalzium Ionophor		5 µM	5 µM	5 µM	
Fibrinogen	15µM	10-15 µM	10-15 µM	10-15 µM	15 µM
Melagatran	1µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
Moexipril			1-10 µM		
Bradykinin			100nM- 100µM		

Tabelle 3.21: Inkubation der Zellen mit verschiedenen Substanzen.

Die Freisetzung der NO aus den NO-Donatoren wurde von Kojda et al. gemessen (Kojda et al. 1998b) und die Wirkungen wurden durch verschiedene Experimente gezeigt (bestätigt) (Oppermann et al. 2008;Oppermann et al. 2011;Suvorava et al. 2015;Dao et al. 2016) DETA-NO hat eine Halbwertszeit von etwa 20 Stunden (Mooradian et al. 1995).

3.6. Immunzytochemie

Die Zellen aus der Zellkulturflasche wurden gelöst und die Zellzahl der Zellsuspension wurde mittels eines Zellzählgerätes bestimmt. Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser wurden in eine 12 Well Kultur Platte (Greiner Bio-one, Frickenhausen) platziert. Die Zellen wurden auf die Glasplättchen so verteilt, dass je Glasplättchen 100k Zellen hatten. Am nächsten Tag wurden die Zellen inkubiert und danach mit PBS 3-mal gewaschen. Die Zellen wurden unter dem

Abzug für 15 Minuten mit der 4%igen phosphatgepufferte Formaldehydlösung (ROTI®Histofix 4 %, Carl Roth, Karlsruhe) unter Lichtschutz fixiert. Nach 3-fach Waschung mit PBS je 5 Minuten wurden die Zellen für 30 Minuten mit 5 % BSA in PBS inkubiert. Nach 3-fach Waschung mit PBS je 5 Minuten wurden die Zellen mit dem ersten Antikörper (1:100) (**Tabelle 3.20**) in 2,5 % BSA PBS-Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS 4-mal je 5 Minuten gewaschen und wurde für die nächste Schritte unter Lichtschutz gearbeitet. Die Zellen wurden für eine Stunde mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrome) markierten anti-IgG-Antikörper (Alexa Fluor® 568, Abcam, Berlin) (1:1000) in PBS inkubiert. Nach 3-maligen je 5 Minuten waschen wurde für die Kernfärbung Hoechst 33342 (1:1000) (Fisher Scientific, Schwerte) in PBS für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Auf dem Objektträger wurde 20 µl Eindeckmittel (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame) pipettiert, anschließend darauf die Glasplättchen platziert und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Imager M2, ZEISS, Oberkochen) mikroskopiert. Für die Bearbeitung wurde die Software Zen Blue (Zeiss, Oberkochen) benutzt.

3.7. Funktionelle Untersuchungen

3.7.1. Präparation der Schweinekoronarien

Nach dem Entfernen des Fettgewebes aus der Umgebung des Sulcus Coronarius erfolgte die Präparation der ersten größeren Abgänge. Gemäß der Bestimmung des Gefäßdurchmessers wurde der Abgang ausgewählt, der in dem Versuch verwendet wurde. Dieser Teil der Arterie wurde in eine Petrischale, die mit KHP gefüllt war, hineingelegt. Die Feinpräparation wurde im KHP durchgeführt.

3.7.2. Präparation der Mauseorten

Nach der Entnahme der Aorta aus dem Brustkorb wurde es im KHP mit Pinzette und Schere von anhaftendem Gewebe befreit.

3.7.3. Entfernung des Endothels

Das Endothel wurde mechanisch mit Hilfe eines Holzstäbchens von einem Durchmesser von ca. 0,5 mm durchgeführt. Dies wurde vorsichtig in das Gefäßlumen eingeführt und anschließend vor und zurückgezogen. Das Wichtigste war eine größtmögliche Schonung der glatten Muskulatur. Dies wurde durch Kontraktionstests überprüft.

3.7.4. Apparatur und Kalibrierung

Die Organbad-Messapparatur bestand aus sechs 11 ml fassenden doppelwandigen Glasgefäßen (**Abb. 3.6-A**). Die Gefäße wurden mit 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer (**Tabelle 3.13**) gefüllt und mit Hilfe der Glasfritten strömte Carbogengas (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid; Linde, Pullach) in den Puffer. Die Puffertemperatur wurde bei 37 °C mit Hilfe einer Umwälzthermostat-Wasserbadkombination (Haake Kies NB22) konstant gehalten. In dieser Apparatur wurde zusätzlich ein 1 l Glasbehälter mit Krebs-Henseleit-Puffer konstant bei 37 °C gehalten und begast. Es diente als Reservoir für den vorgewärmten Puffer.

An einem Verstärker (Abbildung 2.6-B) waren Kraftaufnehmer (Gould Statham®, Elk. Grove, USA) (**Abb. 3.6-C**) angeschlossen, die die Kontraktionen registrierten. Mittels eines Schreibers (Linear Corder mark V; Watanabe. Instruments, Tokyo, Japan) (**Abb. 3.6-D**) wurden die weitergeleiteten Daten registriert.

Eine Kalibrierung der Messapparatur erfolgte vor jedem Versuch mit Standardgewichten (1 g und 2 g). Bei den Schweinekoronarien entsprach der Nullwert einer Gewichtskraft von 2 g und jeweils 2 Gramm wurden für die weiteren Belastungen verwendet. Bei den Mausearten wurde für den Nullwert 1 g und für die weitere Belastungen je 1 g benutzt.

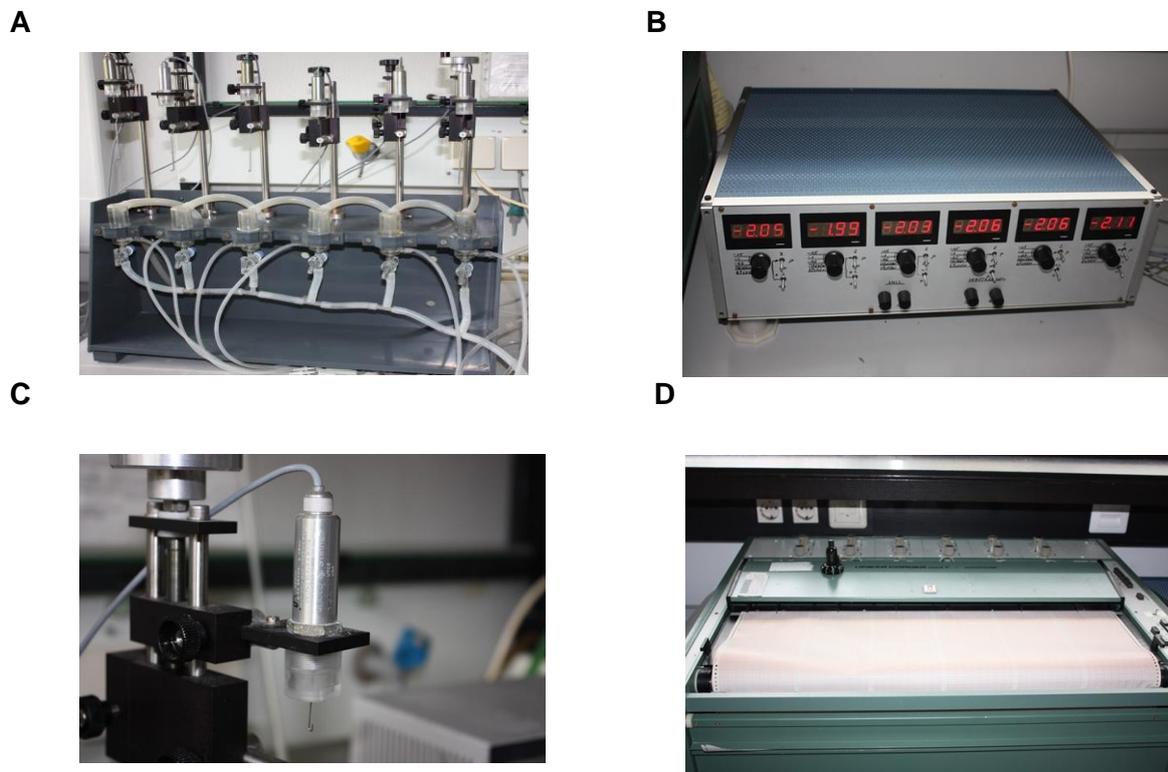


Abbildung 3.6: Beispielbilder von **A)** Organbad, **B)** Verstärker (im Haus gefertigt), **C)** Kraftaufnehmer, **D)** Schreiber.

3.7.5. Einhängen

Die Schweinekoronarringe und die Mauseortenringe wurden zwischen zwei dreieckig geformten und gebogenen Drähten (Durchmesser bei Schweinekoronarringen 0,2 mm und bei Mauseortenringe 0,1 mm) aus Edelstahl eingespannt, ohne das Endothel zu beschädigen. Das untere Dreieck befestigte ich an einer Halterung, das obere dagegen an einen Kraftaufnehmer mittels Polyesterfaden. Dabei war zu beachten, dass die Dreiecke nicht ineinander verhaken.

3.7.6. Äquilibrierung

Diese Phase dauerte 60 bis 120 Minuten. Nach Einbringen der Gefäße in das mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Organbad, wurde (alle 15 Minuten) der Puffer gewechselt. Der Spannungsaufnehmer wurde vorgedreht, um eine optimale Vorspannung zu erhalten. Diese Nulllinie bezog sich auf die vorhergegangene Kalibrierung. Bei konstanter Vorspannung wurden weitere Versuchsschritte durchgeführt.

3.7.7. Kontraktionstest

Um die glatten Muskelzellen zu kontrahieren, wurde KCl (Endkonzentration 80 mM) zugefügt. Nach positivem Kontraktionstest wurde erneut äquilibriert und die Vorspannung wiedereingestellt. Danach wurde nochmals KCl hinzugefügt (Endkonzentration 80 mM) und mehrmals mit Krebs-Henseleit-Puffer ausgewaschen, dies war notwendig, um zur vollständigen Relaxation der Arterien und zur Einstellung der optimalen Vorspannung zu gelangen.

3.7.8. Endothel-Test

Die Intaktheit des Gefäßendothels zeigt das Ausmaß der endothelabhängigen Relaxation und ermöglicht dadurch eine quantitative Aussage über eventuelle Funktionsveränderungen. Durch eine cGMP-Produktion über verschiedene Signalwege wurde die Vasodilatation ermittelt. Substanz P und Acetylcholin induziert über die Aktivierung der eNOS eine endogene NO-Produktion.

3.7.8.1 Endothel-Test der Schweinekoronarien

Der Endotheltest begann mit der Vorkontraktion der Gefäße durch Zugabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (5 μ M Endkonzentration). Die Relaxation erfolgte endothelabhängig nach Zugabe von Substanz P (3 nM Endkonzentration). Nach Erreichen des Plateaus erfolgte erneut eine Äquilibrierungsphase, zur Wiedereinstellung der Vorspannung.

3.7.8.2 Endothel-Test der Mausarten

Die Gefäße wurden durch Zugabe von Phenylephrin (10 μ M Endkonzentration) vor kontrahiert und nach Zugabe von Acetylcholin (10 nM Endkonzentration) relaxiert. Nach Erreichen des Plateaus erfolgte erneut eine Äquilibrierungsphase, zur Wiedereinstellung der Vorspannung.

3.7.9. Inkubationsversuch der Schweinekoronarien

Für den Inkubationsversuch wurde Fibrinogen aus Rinderplasma (Fluka, München) verwendet. Eine Stammlösung (35 μ M) wurde in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37 °C geschüttelt. Aufgrund der starken Schaumentwicklung im Organbad, wurde zum Entschäumen Pluronic F68 (0,8 mg/ml) (Sigma, München) und Dimeticon 100 (12 μ M) (Caelo, Hilden) benutzt. Nach Vorinkubation mit Fibrinogen wurden die Gefäße mit 5 μ M Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorkontrahiert, und eine kumulative Dosierung von SNAP (1 nM bis 10 μ M) zugefügt. So wurde die Sensitivität gegen NO überprüft.

3.8. Statistik

Die Statistik-Software GraphPad Prism (Version 6, GraphPad Software, San Diego) ermöglichte uns, die Ergebnisse statistisch und grafisch auszuwerten. Die Einzelergebnisse wurden als arithmetisches Mittel \pm S.E.M dargestellt. Mit dem ungepaarten Student`s t-Test wurden zwei Gruppen verglichen. Eine Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls-Test wurde zum Vergleich der Mittelwerte mit mehr als zwei Gruppen benutzt. Für die Prüfung signifikanter Unterschiede zwischen Dosis-Wirkungskurven wurde eine Two-way ANOVA verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde als P angegeben und ein $P < 0,05$ als signifikanter Unterschied festgelegt (*).

4. Ergebnisse

Die zentrale Fragestellung der Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob die endotheliale Bildung von NO die Expression des Bradykinin-B2-Rezeptors beeinflussen kann. Hierfür wurden Expressionsanalysen des Bradykinin-B2-Rezeptors mittels Western-Blot in verschiedenen endothelialen und glattmuskulären Zellkulturen nach Inkubation mit dem NO-Donator SNAP und dem eNOS-Inhibitor L-Nitroarginin-Methylester (L-NAME), in Geweben aus transgenen Mäusen mit veränderter eNOS-Expression sowie in Wildtypmäusen nach Fütterung mit dem NO-Donator PETN und dem eNOS-Inhibitor L-Nitroarginin (L-NA) durchgeführt.

4.1. Evaluierung der gegen den Bradykinin B2-Rezeptor gerichteten Antikörper

4.1.1. Bradykinin B2-Rezeptorexpressionsanalyse mittels PCR

Die Evaluierung der Spezifität und Sensitivität verschiedener gegen den Bradykinin B2-Rezeptor gerichteten Antikörper erfolgte zunächst mittels verschiedener Tumorzelllinien, die von Frau Dr. Vera Balz aus der hiesigen Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde zur Verfügung gestellt wurden. Ziel der Expressionsanalyse war die Identifizierung einer Zelllinie, die keine nachweisbare mRNA für den Bradykinin-B2-Rezeptor exprimiert. Die Tumorzellen wurden wie in **Abschnitt 3.3** beschrieben behandelt und die PCR wurde mit der cDNA und Primern, die die Erkennungsstelle für den humanen Bradykinin B2-Rezeptor enthält, durchgeführt. Mehrere Tumor-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereiches wurden nach der Bradykinin B2-Rezeptorexpression untersucht. Von diesen zeigten die Plattenepithel-Karzinomzellen UDSCC 2 (University Duesseldorf Squamous Carcinoma Cells 2) eine Bradykinin B2-Rezeptorexpression, während die UDSCC 3 (University Duesseldorf Squamous Carcinoma Cells 3) keine Bradykinin B2-Rezeptorexpression aufwies (**Abb. 4.1**). Daher wurden diese beiden Zelllinien zur Evaluierung der Antikörper ausgewählt. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde derselbe experimentelle Ansatz auch an Endothelzellen und glatten Muskelzellen aus Schweineaorten durchgeführt. Diese Zellen wurden wie in **Abschnitt 3.3** beschrieben behandelt und die PCR wurde mit der cDNA und Primern, die die Erkennungsstelle für den Bradykinin B2-Rezeptor des Schweins enthält, durchgeführt. Das Ergebnis zeigt erwartungsgemäß in beiden Zelltypen eine nachweisbare Expression des Bradykinin B2-Rezeptors (**Abb. 4.2**).

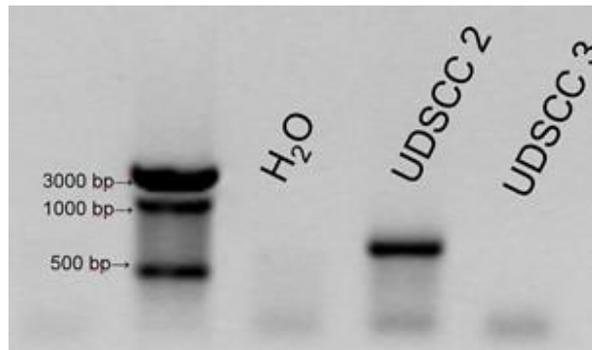


Abbildung 4.1: Beispiel einer Analyse der mRNA-Expression des Bradykinin B2-Rezeptors. Das zu erwartende 848 bp großes PCR-Fragment konnte nur in UDSCC 2 jedoch nicht in UDSCC 3 nachgewiesen werden. Dargestellt ist die Fluoreszenzlösung der DNA-Banden im 1 %-igen Agarosegel unter UV-Licht.

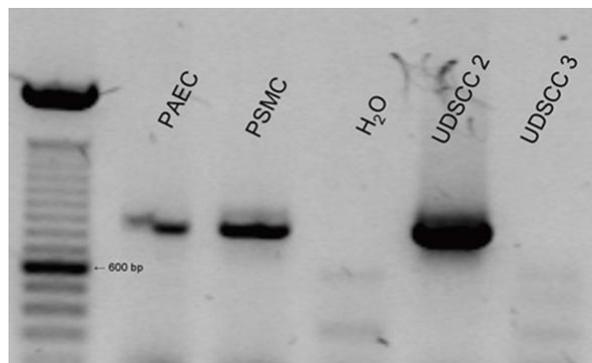


Abbildung 4.2: Beispiel einer Analyse der mRNA-Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in porcinen Aorten-Endothelzellen (PAEC) und in porcinen glatten Muskelzellen (PSMC) im Vergleich zu den beiden Tumorzell-Linien. Das zu erwartende 750 bp große PCR-Fragment konnte in beiden porcinen Zelllinien nachgewiesen werden. Dargestellt ist die Fluoreszenzlösung der DNA-Banden im 2 %-igen Agarosegel unter UV-Licht.

4.1.2. Die Bradykinin B2-Rezeptor Antikörper Auswahl

Die nicht deglykosylierten Proteinfractionen der UDSCC 2 Zellen zeigten mit allen polyklonalen Antikörpern (siehe **Abschnitt 4.2.4, Tabelle 3.20**) verschiedene nicht spezifische Signale mit Molekulargewichten zwischen 37 kD – 70 kD, wie an den Doppelbanden in den Ausschnitten der SDS-Gele beispielhaft zu sehen ist (**Abb. 4.3A**). Im Vergleich dazu zeigte der monoklonale Antikörper ein spezifisches Signal. Für die Trennung der Signale wurden die SDS-Konzentrationen von 7,5 % bis 12 % verändert. Die beste Trennung ergab sich bei der 12 %-igen Veränderung. Bei den weiteren Versuchen fiel auf, dass die deglykosylierten Proteinfractionen der UDSCC 2 Zellen nur ein spezifisches Signal bei 48 kD mit allen polyklonalen Antikörpern (**Abb. 4.3B**) und nur ein spezifisches Signal bei 42 kD mit dem monoklonalen Antikörper (**Abb. 4.3C**) zeigten.

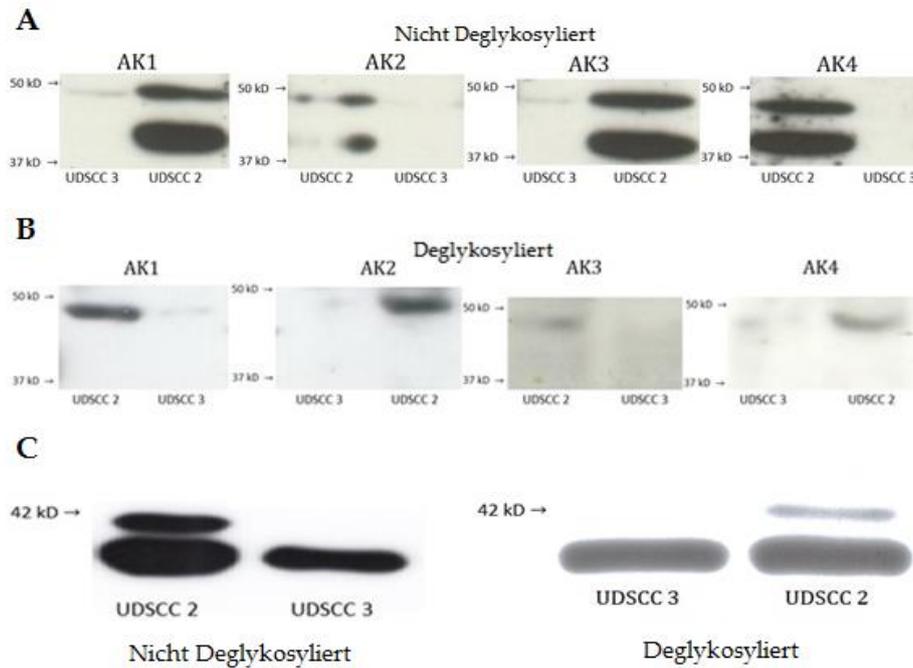


Abbildung 4.3: Dargestellt sind Beispiele von den Western-Blots mit der Detektion der Bradykinin-B2-Rezeptor-Proteinexpression in Tumorzellen. Die Experimente wurden mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. **A**, die nicht deglykosylierten Proben zeigten mehrere Signale in Western-Blots mit den polyklonalen Antikörpern (AK1, Acris Antibodies; AK2, Sigma; AK3, Affinity BioReagents; AK4, Biozol (siehe **Abschnitt 3.2.4, Tabelle 3.20**)). **B**, die deglykosylierten Proben zeigten nur ein Signal im Western-Blot mit den polyklonalen Antikörpern. **C**, der monoklonale Antikörper (BD Transduction Laboratories (siehe **Abschnitt 3.2.4, Tabelle 3.20**)) zeigte im Western-Blot bei der deglykosylierten und nicht deglykosylierten Proben ein spezifisches Signal bei ca. 42 kD sowie ein unspezifisches Signal bei ca. 37 kD.

Diese Signale waren in allen Proteinfractionen der UDSCC 3 Zellen nicht zu sehen, was auf die Bradykinin-B2-Rezeptor Spezifität dieser Signale hindeutet. In dieser Arbeit wurde für die Bradykinin B2-Rezeptor-Analyse der monoklonale Antikörper ausgewählt. Die damit erzielten Ergebnisse konnten später mit einem weiteren monoklonalen Antikörper der Firma ABCAM bestätigt und werden (Khosravani et al. 2015). Mit diesem Antikörper kann auch der glykosylierte Bradykinin-B2-Rezeptor sicher und spezifisch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zu dessen Evaluierung sind in den ergänzenden Informationen der Veröffentlichung detailliert beschrieben. So ließen sich in Gewebeproben aus Lungen von der eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) unspezifische Signale detektieren, welche aber in anderen Lungen der Mausproben-Analysen nicht vorkamen (siehe **Abschnitt 4.2.3**). Beide Antikörper zeigten in Bradykinin B2^{-/-} Lungenproben stark reduzierte bis nicht mehr nachweisbare Signale. Dies belegt eine große, aber nicht vollständige Spezifität der beiden geprüften monoklonalen Antikörper (Khosravani et al. 2015).

4.2. Transgene Tiere

4.2.1. Die Bradykinin B2-Rezeptor Antikörper Auswahl

eNOS^{tg} Mäuse: Die Primer amplifizieren nur das transgene Konstrukt, sodass Wildtyp DNA nicht vervielfältigt wird (**Abb. 4.4**). Die mit Schwanzspitzen-DNA durchgeführten Genotypisierung-PCRs, zeigten bei transgenpositiven Mäusen die erwartete Bande bei 351 Basenpaaren und bei transgennegativen Mäusen keine Bande (**Abb. 4.4**). Die Genotypisierung-PCR diente der Einordnung der Mäuse in die Gruppen eNOS^{tg} und eNOSⁿ.

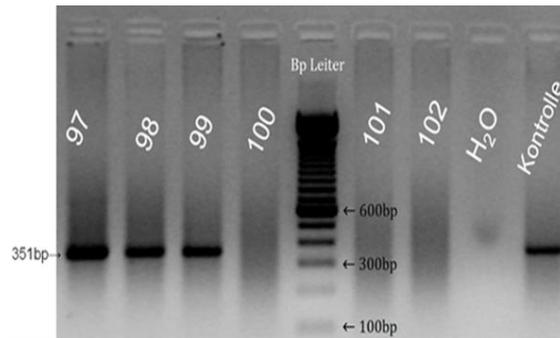


Abbildung 4.4: Beispiel für die Genotypisierung-PCR der transgenen Mauslinie eNOS^{tg}. Die Visualisierung der 351 Basenpaare großen PCR-Fragmente in 2 %-igem Agarosegel unter UV-Licht. Dargestellt ist der Vergleich von eNOS^{tg} (97-99) mit eNOSⁿ (100-102), bei welchen die PCR kein Signal ergibt.

eNOS defiziente Mäuse (eNOS^{-/-}): Mit der DNA, die man aus den Mausschwanzspitzen gewonnen hat (siehe **Abschnitt 3.4.2**), wurde ebenfalls eine Genotypisierung-PCR durchgeführt. Die Primer-paare erfassen ein Teil der murinen eNOS (256 bp) und das Neomycin-Resistenz-Gen (542 bp), welcher Bestandteil des inkorporierten Plasmids ist. Als Kontrolle diente die Amplifizierung beider Gene aus einer DNA-Präparation einer vorher identifizierten heterozygoten Maus (**Abb. 4.5**).

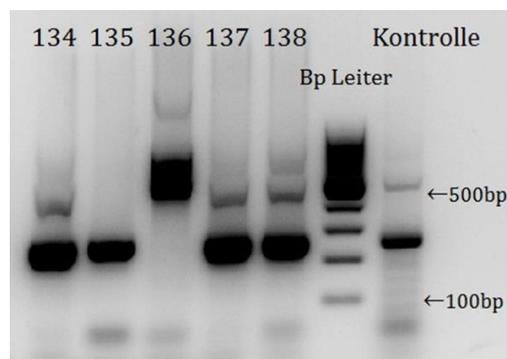


Abbildung 4.5: Ausschnitt aus einem Agarosegel mit Genotypisierung-PCR Produkten von fünf Mäusen und einer vorher bereits genotypisierten heterozygoten Kontroll-Maus. Die heterozygoten Mäuse 134, 137 und 138 zeigen beide PCR-Produkte, während bei den Wildtyp-Mäusen 135 nur das 256 bp Fragment und bei der homozygoten Maus 136 nur das 542 bp Fragment amplifiziert wird.

4.2.2. Bradykinin B2-Rezeptorexpression in eNOS^{tg} Mäusen

Die hier verwendeten eNOS^{tg} sind durch eine etwa 3,5-fache endothelspezifische Überexpression der eNOS charakterisiert (Kolonie 2)(Oppermann et al. 2011). Die transgenen Mäuse weisen gegenüber den Wildtyp-Mäusen einen deutlich niedrigeren Blutdruck auf und dieser Unterschied kann durch den eNOS-Inhibitor L-NA vollständig aufgehoben werden. Somit bilden diese Tiere deutlich mehr vaskuläres NO. Die Bradykinin B2-Rezeptorexpression wurde in Homogenaten aus Lungen- und Herzgewebe der eNOS^{tg} Mäuse mittels Western-Blot mit jeweils 80 µg Gesamtproteinen pro Spur untersucht. Die densitometrischen Auswertungen der Western-Blots ergaben, dass die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in den eNOS^{tg} Mäusen keine signifikante Veränderung aufweist. Für die Expression in der Lunge ergaben sich Werte von $101,2 \pm 12,14 \%$ ($n=9$, $P>0,05$) (**Abb. 4.6A**) und im Herz $106,7 \pm 13,7 \%$ ($n=4$, $P>0,05$) (**Abb. 4.6B**) im Vergleich zur Kontrolle (100 %). Eine Überprüfung dieses Befundes zeigte dann, dass die 42 kD Bande in den Homogenaten der Gewebe aus eNOS^{tg} nicht mehr zu sehen war, wenn der Blot nicht mit dem Anti-B2 Antikörper inkubiert wurde (nicht dargestellt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die vermehrte Bildung von endothelialem NO in-vivo keinen Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors aufwies.

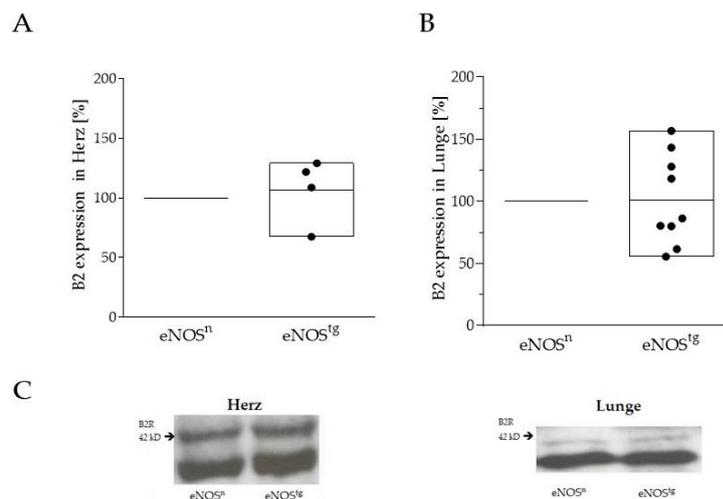


Abbildung 4.6: Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in transgenen Mäusen mit einer endothelspezifischen Überexpression der eNOS (eNOS^{tg}) im **A**, Ventrikelgewebe und **B**, im Lungengewebe des der eNOS^{tg} Mäuse im Vergleich zu den transgen negativen Geschwistertieren (eNOSⁿ, 100 %, dargestellt als horizontale Linie). **C**, repräsentative Western-Blot Beispiele der Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Herz und Lungen. In beiden Fällen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($P>0,05$, Herz $n=4$, Lunge $n=8$, two tailed Student's t-test).

4.2.3. Bradykinin B2-Rezeptor Expression in eNOS-defizienten Mäusen

Die Expression der Bradykinin-B2-Rezeptoren wurde zunächst in Homogenaten von Aorta, Lunge und Herz von transgenen eNOS-defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) untersucht, die kein vaskuläres NO bilden und durch eine deutliche Erhöhung des Blutdrucks charakterisiert sind

(Shesely et al. 1996). Die Bradykinin B2-Rezeptorexpression war in diesen Geweben signifikant erhöht. Aufgetragen wurden 50 µg Gesamtproteine aus Aortenhomogenat bzw. 80 µg Gesamtproteine aus Herz- oder Lungenhomogenaten. In der Aorta ließ sich eine Erhöhung auf $297,5 \pm 67,6$ % gegenüber C57BL/6 Wildtyp-Mäuse feststellen ($n=5$, $P<0,05$). In den Lungen und Herzen war die Expression nicht so stark erhöht. In der Lunge waren $132,7 \pm 7,7$ % ($n=6$, $P<0,05$) und in dem Herz $174,3 \pm 24,2$ % messbar ($n=5$, $P<0,05$) (**Abb. 4.7**).

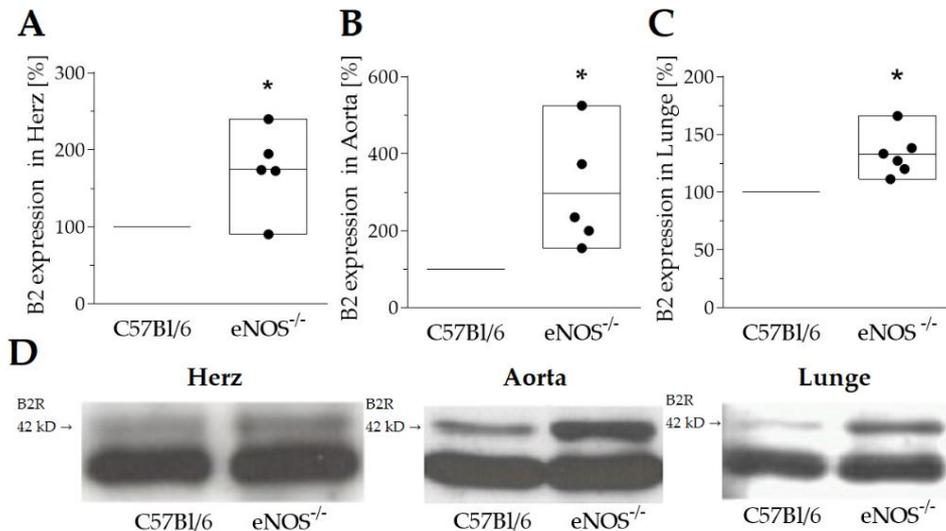


Abbildung 4.7: **A**, quantitative Evaluierung der Western-Blots zeigt eine signifikante erhöhte Bradykinin B2-Rezeptorexpression in **A**, Herz- (* $P<0,05$, $n=5$, two tailed Student's t-test), **B**, Aorten- (* $P<0,05$, $n=6$, two tailed Student's t-test) und **C**, Lungenhomogenate (* $P<0,05$, $n=5$, two tailed Student's t-test) der eNOS^{-/-}-Mäuse (Shesely et al. 1996) (* signifikanter Unterschied zur Kontrolle)(Linie am Mittelwert). **D**, repräsentative Western-Blot Beispiele für die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in eNOS^{-/-} Maus.

Eine weitere Überprüfung dieses eher überraschenden Befundes zeigte dann, dass die 42 kD Bande in den Homogenaten der Gewebe aus eNOS^{-/-} auch dann zu sehen war, wenn der Blot nicht mit dem Anti-B2 Antikörper inkubiert wurde (nicht dargestellt). Das deutet auf ein Artefakt hin, das möglicherweise eine Folge der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen von Mäusen beruhen könnte, die für die Etablierung der transgenen eNOS^{-/-}-Mäuse erforderlich war. Um diesen Umstand weiter zu untersuchen, wurden die Experimente an Gewebekomplexen eines anderen Stamms von eNOS^{-/-}-Mäusen wiederholt, die von Axel Gödecke an der hiesigen Universität generiert wurden (Gödecke et al. 1998).

Die Western-Blot-Untersuchungen an diesem Stamm von eNOS^{-/-} Mäusen zeigten ganz ähnliche signifikante Erhöhungen in den Homogenaten aus Lungengewebe ($182,6 \pm 23,86$ %, $P<0,05$) und Aortengewebe ($254,9 \pm 61,5$ %, $P<0,05$) (**Abb. 4.8**), während die Homogenate aus Herzgewebe keine signifikante Erhöhung aufwiesen ($104,7 \pm 16,7$ %, $P>0,05$, **Abb. 4.8**).

Auch hier zeigten Kontrollexperimente in Homogenaten aus Lungen- und Aortengewebe ohne Vorinkubation der Blots mit dem Anti-B2 Antikörper eine deutliche unspezifische Bande bei 42 kD (nicht dargestellt).

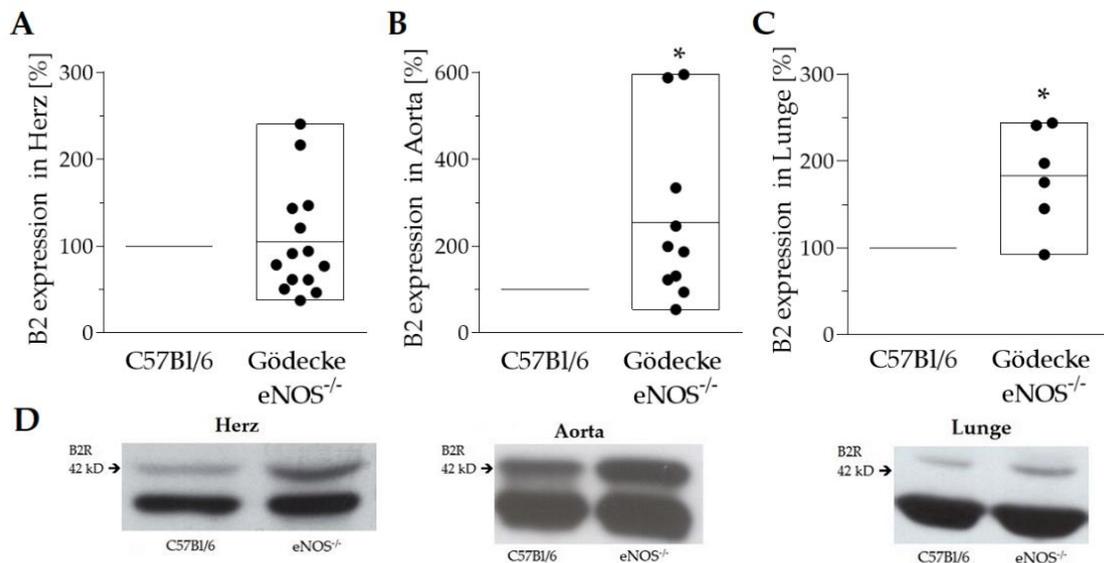


Abbildung 4.8: **A**, die Ergebnisse der Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Herz- ($P > 0,05$, $n = 14$, two tailed Student's t-test), **B**, Aorten- ($*P < 0,05$, $n = 10$, two tailed Student's t-test) und **C**, Lungenhomogenate ($*P < 0,05$, $n = 6$, two tailed Student's t-test) der eNOS^{-/-}-Mäusen (Gödecke et al. 1998) zeigten nur in Herzhomogenaten keine signifikante Erhöhung ($*$ signifikanter Unterschied zur Kontrolle) (Linie am Mittelwert). **D**, Beispiel für Western-Blots mit Detektion der Bradykinin B2-Rezeptorexpression.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde aus Homogenaten des zuerst verwendeten eNOS^{-/-}-Stamms und lassen ebenfalls vermuten, dass es sich bei der unspezifischen Bande wahrscheinlich um IgG-Protein handelt, welches offenbar infolge der homologen Rekombination detektiert wurde. Daher werden die in diesen eNOS^{-/-}-Mäusen erzielten Ergebnisse als Artefakt eingestuft. Später durchgeführte Untersuchungen mit einem weiteren monoklonalen Anti- B2 Antikörper der Firma ABCAM (Cambridge, UK), der zurzeit der Untersuchungen dieser Dissertation noch nicht zur Verfügung stand und der den glykosylierten Bradykinin-B2-Rezeptor mit einer Bande bei 78 kD detektiert, bestätigten diese Schlussfolgerung. Mit diesem Antikörper wurden in Homogenaten aus Lungen-, Haut- oder Herzgewebe keine Veränderung der Expression des Bradykinin-B2-Rezeptors beobachtet (Khosravani et al. 2015).

4.2.4. Funktionalität der Bradykinin B2-Rezeptor in eNOS defizienten Mäusen

Bradykinin bewirkt nach Stimulation des Bradykinin B2-Rezeptors nicht nur die Bildung von NO, sondern führt auch zu einer Freisetzung von Prostaglandinen und EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor). Um den jeweiligen Effekt einer Blockade der Bildung von NO sowie von Prostaglandinen zu untersuchen, wurden Organbadversuche mit Aorten-Ringen von C57Bl/6 und eNOS^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Die Vorinkubation mit Diclofenac hemmt die Cyclooxygenase und damit die Bildung von Prostaglandinen. Es zeigte sich, dass Bradykinin in der Aorta der Maus eine Vasokonstriktion auslöst, die durch die gleichzeitige Bildung von NO durch die eNOS abgeschwächt wird (**Abb. 4.9**). Darüber hinaus ist aber die Konstriktion selbst direkt abhängig von der Bildung eines vasokonstriktorischen Prostaglandins, welches bislang nicht identifiziert wurde.

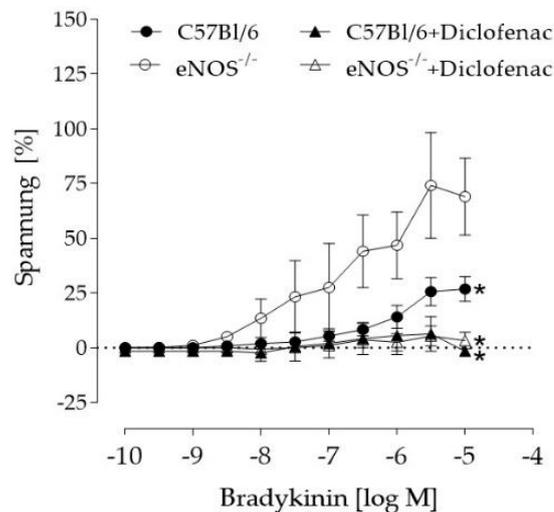


Abbildung 4.9: Auswirkung der Hemmung der Bildung von NO (eNOS^{-/-}), von Prostaglandinen (C57Bl/6+Diclofenac) und von Prostaglandinen und NO (eNOS^{-/-}+Diclofenac) auf die Bradykinin-induzierte Vasokonstriktion isolierter muriner Aorten mit Endothel. Während die Blockade der NO-Bildung die Vasokonstriktion deutlich verstärkte, wurde durch Blockade der Prostaglandin-Bildung die Vasokonstriktion durch Bradykinin vollständig gehemmt (n=3, P<0,0001, Two-Way ANOVA, *P<0,0001 vs. eNOS^{-/-}, Tukey's multiple comparison test).

4.3. Fütterung mit PETN

Ein weiterer experimenteller Ansatz, den Einfluss von NO auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors zu bestimmen, bestand darin Gewebe von Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, die für 4 Wochen mit dem NO-Donator PETN gefüttert wurden. Die täglich verwendeten Dosierungen betragen 6 mg/kg (PETN-6) oder 60 mg/kg Körpergewicht (PETN-60). Die densitometrische Bestimmung des Bradykinin B2-Rezeptors in den Herzhomogenaten zeigte, dass dessen Expression in der PETN-6 (99,6 ± 11,8 %) und PETN-60 (96 ± 15,2 %) sich nicht

von der in der Kontrollgruppe PETN-0 unterschied. Auch die Expression in der Lunge war nicht signifikant verschieden in den beiden Gruppen (PETN-6 $107,0 \pm 5,7$ %; PETN-60 $115,2 \pm 15,8$ %) (**Abb. 4.10**). Aufgetragen worden war jeweils 80 μ g Gesamtprotein. Somit ergab dieses Experiment, dass auch eine pharmakologisch induzierte eine Erhöhung der vaskulären Bildung von NO keinen Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors hatte.

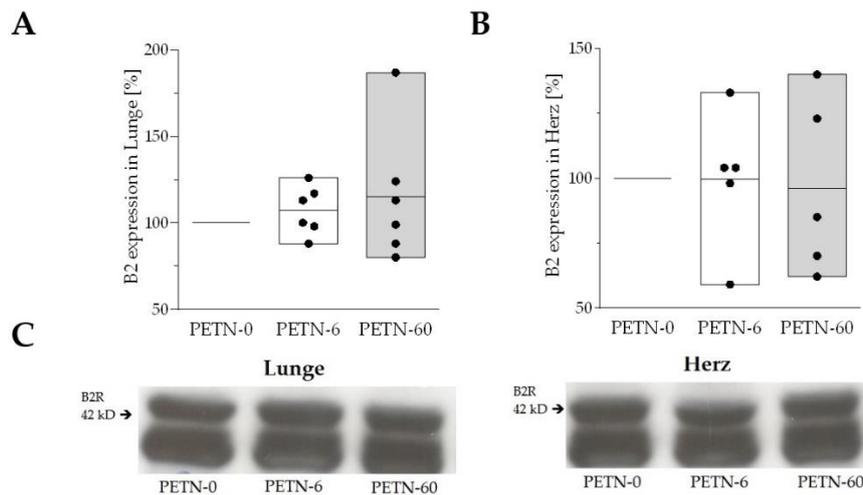


Abbildung 4.10: Expression des Bradykinin-B2-Rezeptors in Geweben von Wildtyp-Mäusen die für 4 Wochen mit dem NO-Donator PETN in den Dosierungen 6 mg/kg (PETN-6) oder 60 mg/kg Körpergewicht (PETN-60) gefüttert wurden. **A**, Quantitative Auswertung der Western-Blots im Lungengewebe und **B**, im Herzgewebe im Vergleich zur Kontrolle (PETN-0). Weder im Lungengewebe ($P > 0,05$; PETN-6 $n=6$, $P > 0,05$; PETN-60 $n=5$) noch im Herzgewebe ($P > 0,05$; PETN-6 $n=5$; $P > 0,05$; PETN-60 $n=5$) konnte ein Unterschied beobachtet werden (One-way ANOVA) (Linie am Mittelwert). **C**, Repräsentative Western-Blots für die Bradykinin B2-Rezeptorexpression im Lungengewebe (links) und im Herzgewebe (rechts).

4.4. Bradykinin B2-Rezeptorexpression in L-Nitroarginin behandelten Tieren

Um zu untersuchen, ob eine pharmakologische Hemmung der eNOS möglicherweise einen Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors hat, wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse für 3 Wochen oral mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt. Zur Untersuchung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression wurden Aorten, Lungen und Herzhomogenate der L-Nitroarginin behandelten Mäuse verwendet. Im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren lagen die Werte bei den Lungen $82,7 \pm 15,5$ %, bei der Aorta $94,9 \pm 21$ % und bei den Herzen $109,7 \pm 19,4$ % (**Abb. 4.11**). Die Ergebnisse zeigten somit keine signifikante Veränderung und bestätigen

daher die in den eNOS^{-/-}-Mäusen mit dem ABCAM-Anti-B2 Antikörper erzielten Befunde (siehe **Abschnitt 4.2.3**).

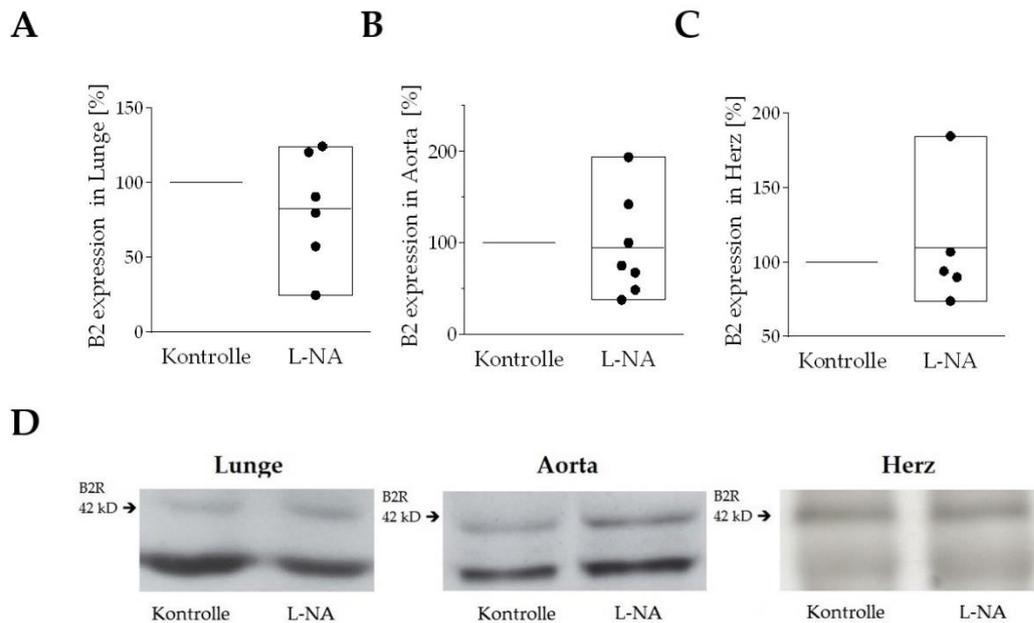


Abbildung 4.11: Effekt des NOS-Inhibitors L-NA auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression *in vivo*. **A**, Quantitative Evaluierung der Expression des Bradykinin B2-Rezeptors mittels Western-Blot in den verschiedenen angegebenen Geweben der C57Bl/6 Mäuse. Weder im Lungengewebe ($P > 0,05$, $n = 6$, two tailed Student's t-test), **B**, im Aortengewebe ($P > 0,05$, je $n = 7$, two tailed Student's t-test) noch **C**, im Herzgewebe ($P > 0,05$, je $n = 5$, two tailed Student's t-test) ließen sich signifikante Unterschiede gegenüber den nicht behandelten C57BL/6 Kontrollmäusen beobachten (Linie am Mittelwert). **D**, repräsentative Western-Blots der Bradykinin B2-Rezeptor Proteinexpression in den angegebenen Geweben.

4.5. Einfluss von NO auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Zellen

Da die *In-vivo*-Untersuchungen in Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen keinerlei Hinweise dafür erbracht haben, dass NO einen Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors hat, wurden Untersuchungen an Endothelzellkulturen verschiedener Spezies durchgeführt. Hintergrund dieser Untersuchungen war die Frage, ob sich die Befunde an Mäusen auch bei anderen Säugerspezies bestätigen lassen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen gibt. Hierfür wurden Endothelzellen und glatte Muskelzellen aus Schweineaorta isoliert und kultiviert.

4.5.1. SNAP Inkubation der PAECs

Um die Effekte von NO auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren zu studieren, wurde der spontane NO-Donator SNAP verwendet. Die Zellen wurden mit 10 μM für eine, 3 und 6 Stunden oder mit 100 μM SNAP für 3 Stunden inkubiert. Die Bradykinin

B2-Rezeptorexpression wurde mittels Western-Blot untersucht. Die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren nach der Inkubation mit 10 μ M SNAP gegenüber der Kontrolle (100 %) zeigte keine Veränderung. Nach 1 Stunde Inkubation wurden $87,5 \pm 7,6$ %; nach 3 Stunden Inkubation $104 \pm 15,1$ % und 6 Stunden Inkubation $116,4 \pm 13,4$ % gemessen ($P > 0,05$). Auch die Inkubation mit 100 μ M SNAP für 3 Stunden, die einen Wert von $104,1 \pm 10,6$ % ergab, zeigte keinen signifikanten Unterschied (**Abb. 4.12**).

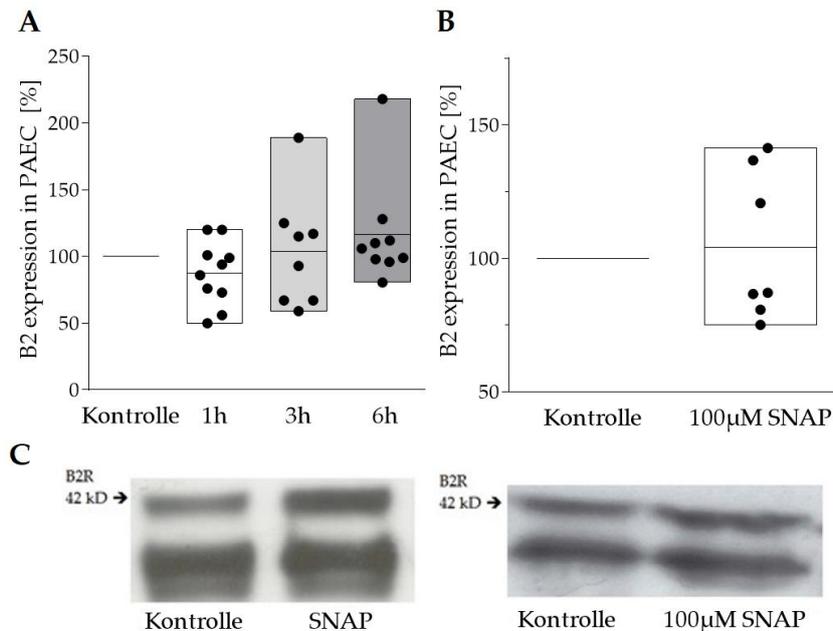


Abbildung 4.12: Effekt des NO-Donators SNAP auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAEC in vitro. **A**, Quantitative Evaluierung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression nach Inkubation mit 10 μ M SNAP für eine Stunde ($P > 0,05$; $n=10$), drei Stunden ($P > 0,05$; $n=8$) und sechs Stunden ($P > 0,05$; $n=9$, jeweils One-way ANOVA,) und **B**, nach Inkubation mit 100 μ M SNAP für drei Stunden ($P > 0,05$, $n=7$, two tailed Student's t-test) (Linie am Mittelwert). **C**; repräsentative Western-Blots der Bradykinin B2-Rezeptor Proteinexpression in PAEC.

4.5.2. DETA/NO Inkubation der PAECs

Um die Langzeitwirkung von NO zu untersuchen wurde eine 12-stündige Inkubation mit dem NO-Donator DETA/NO ausgewählt, welcher NO über 20 Stunden kontinuierlich freisetzt (Mooradian et al. 1995). Die Zellen wurden, wie im **Abschnitt 3.5.7.5** beschrieben, mit 100 μ M DETA/NO für 1, 3, 6 und 12 Stunden inkubiert. Je 50 μ g Protein der Zellhomogenate, wurden mittels Western-Blot untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei einer Stunde ($111,6 \pm 26,1$ %, $n=7$), bei 3 Stunden ($110,2 \pm 15$ %, $n=8$), bei 6 Stunden ($106,5 \pm 17$ %, $n=8$) und 12 Stunden ($105,8 \pm 9,8$ %, $n=5$) Inkubationen keinen signifikanten Unterschied in Bradykinin B2-Rezeptorexpression (**Abb. 4.13**).

4.5.3. L-NAME Inkubation der PAECs

Um eventuelle Effekte der stimulierten endogenen NO-Bildung in den Endothelzellen auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors zu untersuchen, ließ sich die Verwendung des NO-Synthase-Hemmers L-NAME nutzen. Gleichzeitig erfolgte die Stimulation der NO-Synthase durch den Calcium-Ionophor A23187, welcher einen vermehrten Einstrom von extrazellulärem Kalzium in das Zytosol induziert und auf diese Weise die NO-Bildung durch die NO-Synthase deutlich steigert. Die Zellen wurden mit L-NAME (10 μ M), und Calcium-Ionophor (5 μ M) inkubiert, während die alleinige Inkubation der Zellen mit Calcium-Ionophor als Kontrolle diente. Diese Interventionen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression. So ergaben die Inkubationen zwar Schwankungen der mittels Western-Blot erfassten Dichte der Bradykinin B2-Rezeptor, jedoch erreichte keiner dieser Unterschiede eine statistische Signifikanz, sowohl nach einer Stunde ($135,5 \pm 17,7$ %, $n=6$), nach 3 Stunden ($111,4 \pm 21,6$ %, $n=7$) als auch nach 6 ($105,3 \pm 22,8$ %, $n=6$) Inkubation (**Abb. 4.14**).

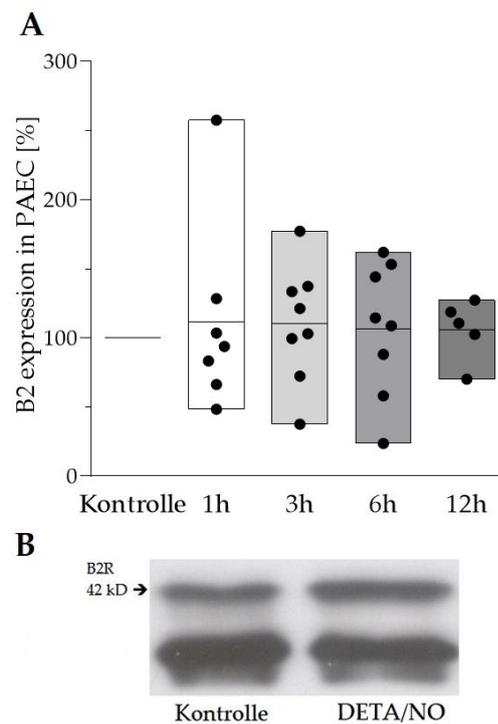


Abbildung 4.13: Die Wirkung von DETA/NO auf den Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAECs. **A**, quantitative Auswertung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression in 100 μ M DETA/NO inkubierten PAEC für eine Stunde ($P>0,05$; $n=7$), drei Stunden ($P>0,05$; $n=8$), sechs Stunden ($P>0,05$; $n=8$) und zwölf Stunden ($P>0,05$; $n=5$; One-way ANOVA, Linie am Mittelwert). **B**, ein Beispiel aus einem Western-Blot der DETA/NO inkubierten PAEC.

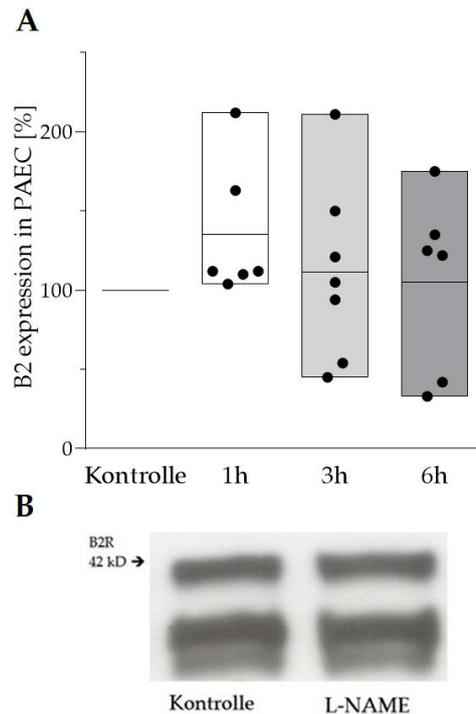


Abbildung 4.14: Einfluss der endogenen NO-Bildung auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren. **A**, quantitative Auswertung der Western-Blots der inkubierten Schweineaorten Endothelzellen für eine Stunde ($P > 0,05$; $n = 6$), drei Stunden ($P > 0,05$; $n = 7$) und sechs Stunden ($P > 0,05$; $n = 6$) ($P > 0,05$; two tailed Student's t-test und One-way ANOVA) (Linie am Mittelwert). **B**, ein Beispiel Bild von Western-Blot Ergebnissen.

4.5.4. SNAP Inkubation der PSMC

Zur Klärung der Fragestellung, ob es Unterschiede hinsichtlich des Effektes von NO auf die Expression von Bradykinin B2-Rezeptoren zwischen Endothelzellen, die selbst NO bilden können, und glatten Muskelzellen, die kein endogenes NO bilden können, gibt, wurden einige der an Endothelzellen durchgeführten Experimente mit glatten Muskelzellen durchgeführt, die aus Schweineaorten kultiviert worden waren. Zunächst wurden die Muskelzellen mit 10 μM SNAP über unterschiedliche Zeiträume und in einem zweiten experimentellen Ansatz für 3 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von SNAP inkubiert. Keine dieser Interventionen zeigte einen Einfluss auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression. So war die Dichte der Bradykinin B2-Rezeptoren nach einer Stunde ($68,97 \pm 30,6 \%$), nach 3 Stunden ($87,3 \pm 28,9 \%$) und nach 6 Stunden ($77,60 \pm 66,5 \%$) Inkubation mit 10 μM SNAP nicht signifikant verschieden von dem Kontrollsignal. Der gleiche Befund ergab sich nach 3 Stunden Inkubation mit 1 μM SNAP ($92,2 \pm 10,4 \%$), 10 μM SNAP ($87,3 \pm 28,9 \%$) und 100 μM SNAP ($216,8 \pm 89,7 \%$). Somit zeigten die glatten Muskelzellen hinsichtlich des Effektes von NO auf die Bradykinin B2 Expression keinen Unterschied zu den Endothelzellen (**Abb. 4.15**).

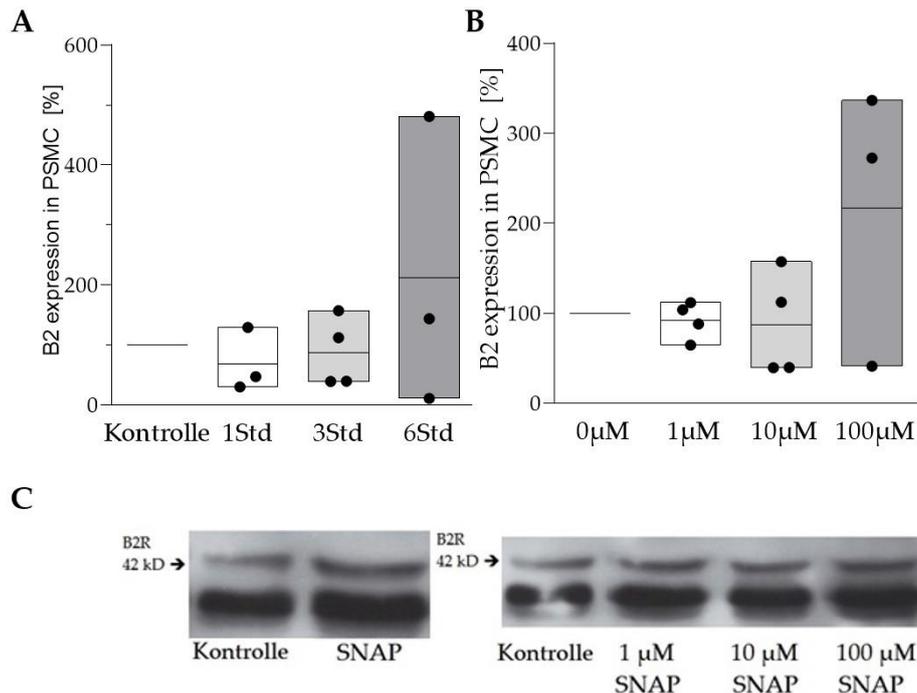


Abbildung 4.15: Einfluss von exogenem NO auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren in glatten Muskelzellen aus Schweineaorta. **A**, quantitative Evaluierung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression nach Inkubation mit 10 µM SNAP 1 Stunde (n=3), 3 Stunden (n=4) und 6 Stunden (n=3) ($P>0,05$; One-way ANOVA), und **B**, nach 3 Stunden Inkubation für mit 1 µM (n=4), 10 µM (n=4) und 100 µM SNAP (n=3) ($P>0,05$; One-way ANOVA) (Linie am Mittelwert). **C**, Darstellung von ausgewählten repräsentativen Western-Blots.

4.6. Einfluss von Moexipril und Bradykinin auf den Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Zellen

Da Bradykinin nach Stimulation des Bradykinin B2-Rezeptors nicht nur zur Aktivierung der NO-Bildung in Endothelzellen führt, sondern auch die Expression verschiedener Gene verändern kann, sollte ebenfalls der Effekt von Bradykinin selbst auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors evaluiert werden. Um den Abbau von Bradykinin durch die membranständige ACE der Endothelzellen und damit die Proteolyse von Bradykinin zu hemmen, war dem Inkubationsmedium der ACE-Hemmer Moexipril hinzugefügt worden. Dabei variierten die Konzentrationen von Moexipril und Bradykinin.

4.6.1 Einfluss von Moexipril und Bradykinin auf den Bradykinin B2-Rezeptorexpression in PAEC

Die Zellen wurden jeweils entweder mit 1 µM Moexipril und 100 nM Bradykinin, 1 µM Moexipril und 1 µM Bradykinin, 10 µM Moexipril und 10 µM Bradykinin oder 10 µM Moexipril und 100 µM Bradykinin für 3 Stunden inkubiert. Die Bradykinin B2-Rezeptorexpression wurde wieder

mittels Western-Blot untersucht und es konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (**Abb. 4.16**). Dies galt für alle verwendeten Kombinationen: 100 nM Bradykinin/1 μ M Moexipril ($151,9 \pm 39,8$ %, $n=6$), 1 μ M Bradykinin/1 μ M Moexipril ($100,2 \pm 13,1$ %, $n=6$), 10 μ M Bradykinin/10 μ M Moexipril ($100,2 \pm 13,7$ %, $n=7$) und 100 μ M Bradykinin/10 μ M Moexipril ($79,7 \pm 7,8$ %, $n=5$).

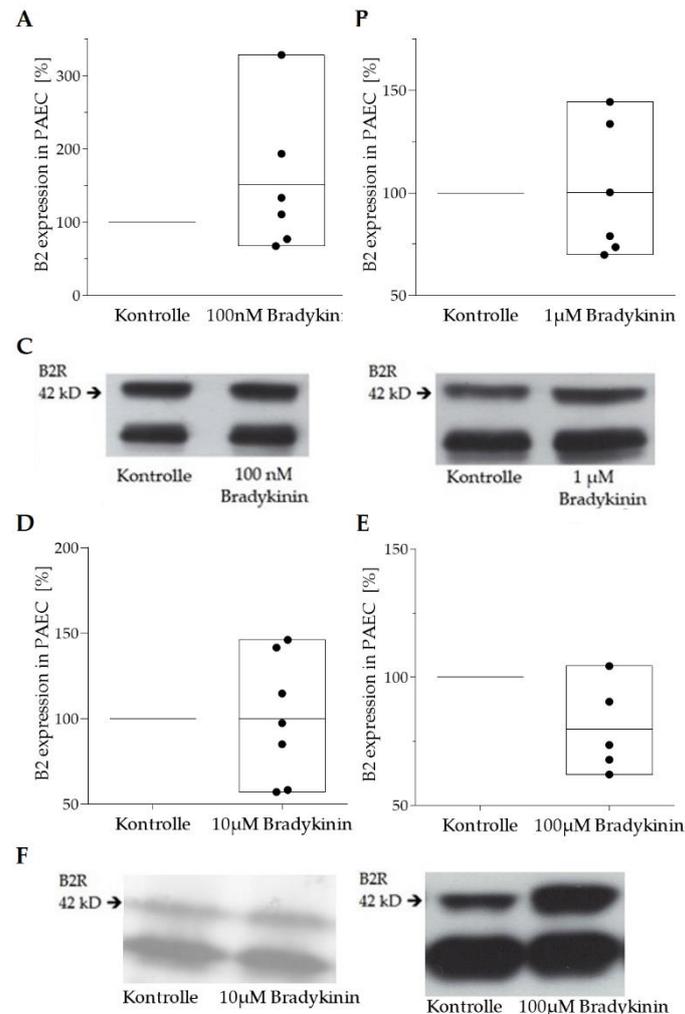


Abbildung 4.16: Effekt verschiedener Kombinationen von Moexipril und Bradykinin auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren in Endothelzellen aus Schweineaorten: **A**, quantitative Evaluierung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Gegenwart von 100 nM Bradykinin und 1 μ M Moexipril ($P>0,05$, je $n=6$, two tailed Student's t-test) (Linie am Mittelwert), **B**, in Gegenwart von 1 μ M Bradykinin und 1 μ M Moexipril ($P>0,05$, je $n=6$, two tailed Student's t-test) (Linie am Mittelwert), **D**, in Gegenwart von 10 μ M Bradykinin und 10 μ M Moexipril ($P>0,05$, je $n=7$, two tailed Student's t-test) (Linie am Mittelwert) und **E**, in Gegenwart von 100 μ M Bradykinin und 10 μ M Moexipril ($P>0,05$, je $n=5$, two tailed Student's t-test) (Linie am Mittelwert). **C**, **F**, ausgewählte repräsentative Western-Blots zur Bradykinin B2-Rezeptorexpression.

4.6.2 Einfluss von Moexipril und Bradykinin auf den Bradykinin B2-Rezeptorexpression in HDBEC

Um die Effekte von Bradykinin auf die Expression der Bradykinin-B2-Rezeptoren in menschlichen Zellen zu studieren, wurde HDBEC mit 1 μ M Moexipril und 10 μ M Bradykinin für 3 Stunden inkubiert. Die Bradykinin B2-Rezeptorexpression wurde wieder mittels Immunzytochemie untersucht ($111,7 \pm 10,42 \%$, $n=5$) und es konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (**Abb. 4.17**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass auch hier Bradykinin keinen Effekt auf die Expression der Bradykinin-B2-Rezeptoren aufwies.

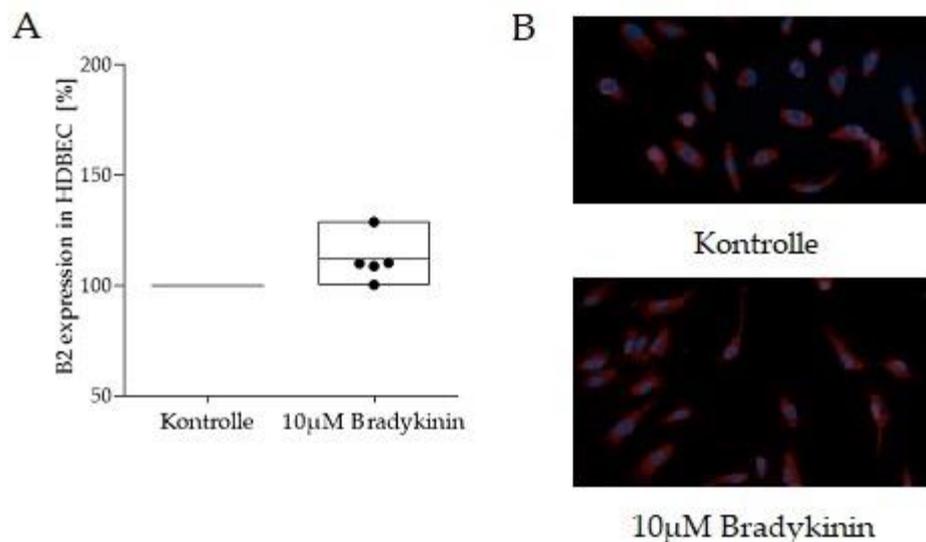


Abbildung 4.17: Effekt von Moexipril und Bradykinin auf die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren in Endothelzellen aus menschlichen dermalen Blutgefäßen (HDBEC). **A**, quantitative Evaluierung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Gegenwart von 1 μ M Bradykinin und 10 μ M Moexipril ($P>0,05$, je $n=5$, two tailed Student's t-test) (Linie am Mittelwert) **B**, ausgewählte repräsentative Bilder zur Bradykinin B2-Rezeptorexpression.

4.7. Einfluss von Fibrinogen auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression

Eine Studie der Arbeitsgruppe hatte gezeigt, dass Patienten mit nicht allergischem Angioödem, welches durch Bradykinin über eine Aktivierung von Bradykinin B2-Rezeptoren vermittelt wird (Bas et al. 2015), signifikant höhere Plasmaspiegel von Fibrinogen aufweisen (Bas et al. 2008). Ebenfalls konnte an Segmenten menschlicher Arteria mammaria interna sowie kleiner porciner Koronararterien erstmals eine konzentrationsabhängige Vasodilatation durch Fibrinogen nachgewiesen werden. Dieser vasodilatatorische Effekt war teilweise abhängig von der NO-Bildung im vaskulären Endothel. Darüber hinaus zeigte sich, dass die bei den Patienten gemessene mittlere Plasmakonzentration von Fibrinogen von 481 ± 22 mg/dl ($14,15 \mu$ M) zu einer nahezu 10-fachen Verstärkung der vasodilatatorischen Wirkung von Bradykinin führte. Daher wurde hier untersucht, ob eine Inkubation von

menschlichen und porcinen Endothelzellen mit 15 μ M Fibrinogen zu einer Änderung der Expression von Bradykinin B2-Rezeptoren führt und auch auf diese Weise zur Pathophysiologie der Entwicklung nicht allergischer Angioödeme beitragen kann. Um herauszufinden, ob die Fibrinbildung im Inkubationsmedium möglicherweise beteiligt ist, wurden Kontrollexperimente mit einer Kombination aus 15 μ M Fibrinogen und 1 μ M Melagatran durchgeführt. Melagatran ist ein nicht klinisch verwendeter direkter und spezifischer Thrombininhibitor und der aktive Metabolit von Ximelagatran, welches wegen hepatotoxischer Effekte nicht mehr als therapeutisches Antikoagulant verwendet werden darf (Bauer 2006).

4.7.1. Fibrinogen Inkubation der HUVECs

Um die Effekte von Fibrinogen auf die Expression an humanen Endothelzellen zu untersuchen wurden Kulturen aus humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) angelegt. Zellen der zweiten Passage wurden mit einer Kombination aus 15 μ M Fibrinogen und 1 μ M Melagatran für 1, 3 und 6 Stunden inkubiert. Zur Quantifizierung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression mittels Western-Blot dienten Homogenate der inkubierten Zellen. Die Expression der Bradykinin B2-Rezeptoren zeigt bei einer Stunde ($108,6 \pm 27,1$ %), 3 Stunden Inkubation ($196,8 \pm 38,3$ %) und 6 Stunden ($102,0 \pm 27,8$ %) keine signifikante Erhöhung. (**Abb. 4.18**).

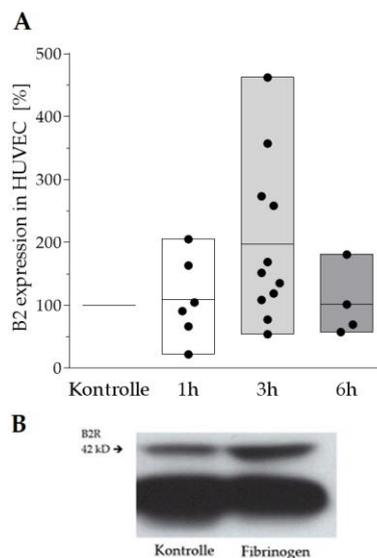


Abbildung 4.18: Effekt einer Inkubation von HUVEC mit einer Kombination aus 15 μ M Fibrinogen und 1 μ M Melagatran auf die Expression von Bradykinin B2-Rezeptoren. **A**, die quantitative Evaluierung der Western-Blot Signale zeigte nur bei 3 Stunden Inkubation (n=11) eine Erhöhung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression, während nach 1 Stunde (n=6) und 6 Stunden Inkubation (n=4) die Bradykinin B2-Rezeptorexpression unverändert blieb. Die statistische Analyse mittels One-way ANOVA ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (P=0,0681) (Linie am Mittelwert). **B**, repräsentativer Western-Blot der Bradykinin B2-Rezeptorexpression nach 3 Stunden Inkubation.

4.7.2. Fibrinogen Inkubation der PAEC

Um die Effekte von Fibrinogen auf die Expression an porcinen Endothelzellen zu untersuchen wurden Kulturen aus porcinen Aorten-Endothelzellen (PAEC) angelegt und ebenfalls Zellen der zweiten Passage mit der Kombination aus 15 μM Fibrinogen und 1 μM Melagatran für 1, 3 und 6 Stunden inkubiert. Darüber hinaus wurde auch das Geschlecht der Zellen festgestellt (siehe **Abschnitt 3.5.6**) und PAEC aus männlichen und weiblichen Schweinen miteinander verglichen. Schließlich wurden bei gleicher Konzentration von Melagatran auch Konzentrationen von 3 μM und 10 μM Fibrinogen über 3 Stunden bei PAEC aus männlichen Schweinen verwendet. Die Quantifizierung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression erfolgte mittels Western-Blot. Die Ergebnisse zeigten für keinen der Vergleiche einen signifikanten Unterschied (One-way ANOVA). Es ergaben sich für die männlichen PAEC folgende Werte nach einer Stunde $102,6 \pm 15,9 \%$; nach 3 Stunden $94,9 \pm 11,6 \%$ und nach 6 Stunden $106,0 \pm 13,1 \%$ ($P > 0,05$). Die Ergebnisse bei weiblichen PAEC betragen nach einer Stunde $116,2 \pm 29,8 \%$; nach 3 Stunden $129,6 \pm 31,8 \%$ und nach 6 Stunden $119,1 \pm 19,6 \%$ ($P > 0,05$). Das Ergebnis änderte sich auch nicht, wenn die Daten aus weiblichen und männlichen PAEC zusammengeführt wurden ($P > 0,05$). Auch die Inkubation männlicher PAEC mit verschiedenen Konzentrationen von Fibrinogen zeigte keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) (**Abb. 4.19**).

4.7.3. Fibrinogen Inkubation der UDSCC 2

Um die Effekte von Fibrinogen auf die Expression in Tumorzellen zu untersuchen wurden Zellkulturen aus Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches (UDSCC 2) angelegt. Auch bei diesen Experimenten wurden die Zellen mit einer Kombination aus 15 μM Fibrinogen mit und ohne 1 μM Melagatran für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die allein mit Fibrinogen inkubierten Tumorzellen bereits nach 1 Stunde eine signifikante Erhöhung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression aufwiesen ($239,1 \pm 63,6 \%$, $P = 0,0038$, One-way ANOVA, $P < 0,05$, Newman-Keuls multiple comparisons test, **Abb. 4.20A**). Dagegen wurde nach 6 Stunden mit $121,2 \pm 27,6 \%$ kein signifikanter Effekt beobachtet, während die Bradykinin B2-Rezeptorexpression nach 12 Stunden gegenüber den Werten nach 1 Stunde und nach 6 Stunden stark reduziert war ($32 \pm 2,3 \%$, $P = 0,0038$, One-way ANOVA, $P < 0,05$, Newman-Keuls multiple comparisons test). Dabei zeigte sich ein hemmender Effekt auf Zellwachstum und Zellüberleben, weil das Fibrinogen in dem Inkubationsmedium zunehmend zu Fibrin umgesetzt worden war und so offenbar die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff behinderte. Aus diesem Grund können die signifikanten Veränderungen der Bradykinin B2-Rezeptorexpression nicht als spezifische Effekte von Fibrinogen angesehen werden. Wurden die Zellen zusätzlich mit dem Thrombin-Inhibitor Melagatran inkubiert und auf diese Weise die

Bildung von Fibrin verhindert, ergab sich für keine der untersuchten Inkubationszeiten ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($P=0,2181$, One-way ANOVA).

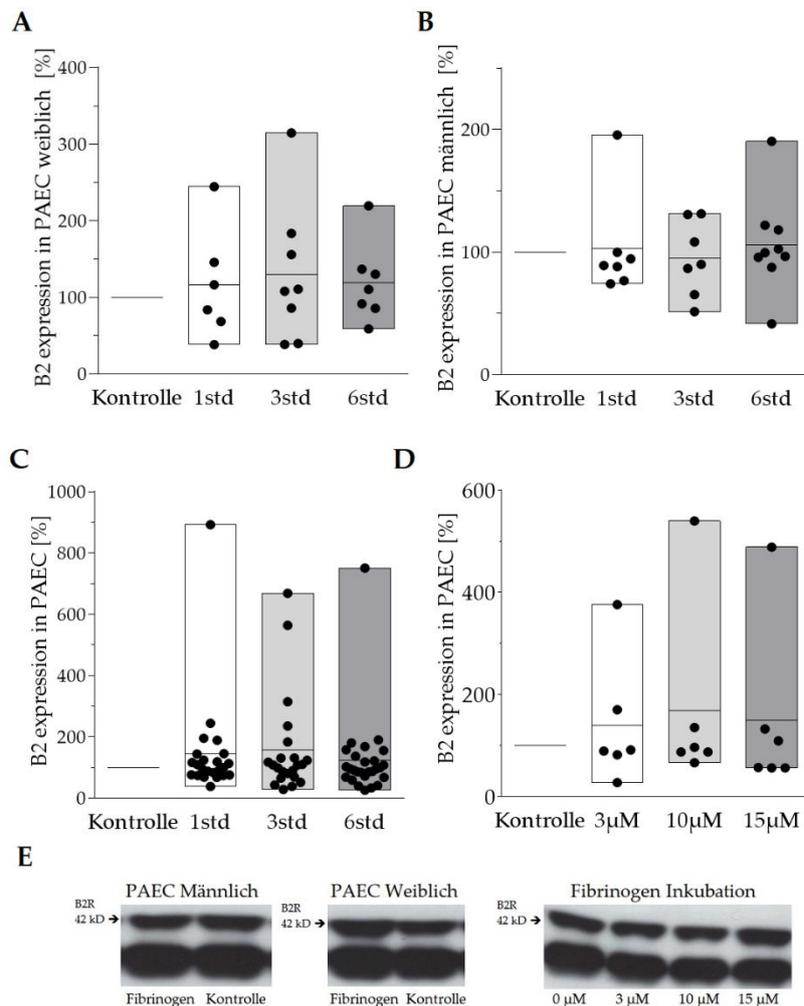


Abbildung 4.19: Effekt einer Inkubation von PAEC mit einer Kombination aus verschiedenen Konzentrationen von Fibrinogen und 1 μM Melagatran auf die Expression von Bradykinin B2-Rezeptoren. Bei keinem der durchgeführten Untersuchungen ergaben sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Bradykinin B2-Rezeptorexpression gegenüber der Kontrolle (One-way ANOVA). **A**, Quantitative Evaluierung der Ergebnisse mit weiblichen PAECs nach 1 Stunde ($n=6$), 3 Stunden ($n=8$) und 6 Stunden ($n=7$, $P>0,05$), **B**, Quantitative Evaluierung der Ergebnisse mit männlichen PAEC nach 1 Stunde ($n=7$), 3 Stunden ($n=7$) und 6 Stunden ($n=9$, $P>0,05$), **C**, Darstellung der in A und B dargestellten Ergebnisse ($P>0,05$) (Linie am Mittelwert). **D**, Quantitative Evaluierung der Ergebnisse mit männlichen PAEC nach 3 Stunden Inkubation mit 3 μM ($n=6$), 10 μM ($n=6$) und 15 μM ($n=6$) Fibrinogen ($P>0,05$) (Linie am Mittelwert). **E**; Beispiele für Western-Blot-Signale des Bradykinin B2-Rezeptor unter verschiedenen Bedingungen.

Im Einzelnen wurden folgende Werte gemessen: nach 5 Minuten $168,6 \pm 34,6 \%$, nach einer Stunde $159,3 \pm 40,9 \%$, nach 6 Stunden $122,9 \pm 39,1 \%$ und nach 12 Stunden $73,8 \pm 3,7 \%$ (**Abb. 4.20B**). Damit konnten die an HUVEC und PAEC in Gegenwart von Melagatran erzielten Ergebnisse an Tumorzellen bestätigt werden.

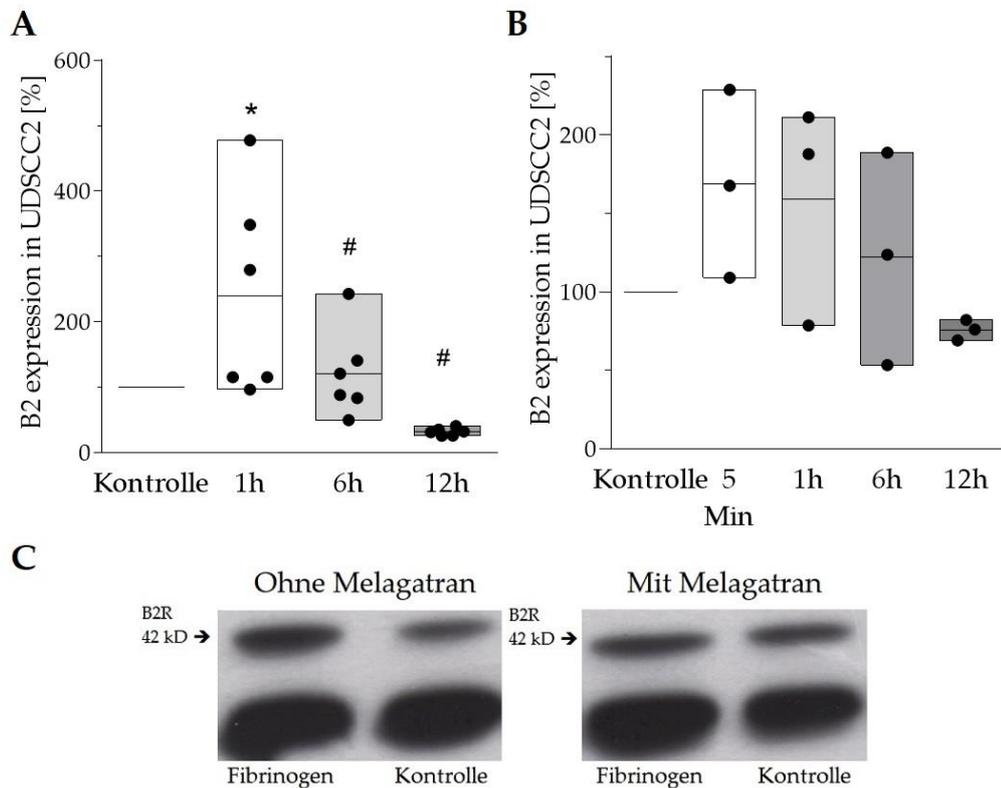


Abbildung 4.20: Effekt von Fibrinogen ohne und mit Melagatran auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors in UDSSC 2 Zellen. **A**, Bei Abwesenheit von Melagatran zeigte Fibrinogen einen biphasischen und signifikanten Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors ($P=0.0038$, je $n=6$, One-way ANOVA). Während bereits nach 1 h die Bradykinin B2-Expression signifikant anstieg ($*P<0,05$, Newman-Keuls multiple comparisons test), zeigte sich dieser Unterschied nach 6 h und nach 12 h nicht. Im Vergleich mit der Bradykinin B2-Expression nach 1 h war jedoch eine signifikante Verminderung gegenüber 6 h (#, $P<0,05$, Newman-Keuls multiple comparisons test) und gegenüber 12 h Inkubation (#, $P<0,01$, Newman-Keuls multiple comparisons test) zu beobachten. **B**, Bei Anwesenheit von Melagatran zeigte Fibrinogen bei keiner Inkubationszeit eine signifikante Verminderung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression (je $n=3$, $P=0,2181$, One-way ANOVA) (Linie am Mittelwert). **C**, repräsentative Beispiele der Western-Blots bei Abwesenheit (links) und Anwesenheit von Melagatran (rechts).

4.8. Einfluss von Fibrinogen auf die Aktivität der Bradykinin B2-Rezeptoren

Um die Effekte von Fibrinogen auf die Aktivität der Bradykinin B2-Rezeptoren zu studieren, wurde Bradykinin (siehe **Tabelle 3.21**) verwendet. Die Zellen wurden mit $15 \mu\text{M}$ Fibrinogen und $1 \mu\text{M}$ Melagatran für 3 Stunden inkubiert und anschließend mit 10 nM oder mit 100 nM

Bradykinin für 5 min aktiviert. Die Bestimmung der Bradykinin B2-Rezeptor Aktivität der porcinen Endothelzellen beruhte auf der gut bekannten Stimulation der NO-Bildung durch die eNOS und wurde mittels Western-Blot untersucht. Das so gebildete endogene NO führt über die Stimulation der löslichen Guanylylzyklase zur Synthese von cGMP und konsekutiver Aktivierung der Proteinkinase G. Diese Kinase phosphoryliert verschiedene Proteine in den Zellen (siehe **Abschnitt 2.1.3.1.**). Gemessen wurde das Ausmaß der Phosphorylierung von VASP (P-Ser239-VASP) im Verhältnis zur Gesamtmenge von detektierbarem VASP.

Dieses Verhältnis war in Fibrinogen inkubierten PAECs die mit 100 nM Bradykinin aktiviert waren gegenüber mit nicht Fibrinogen inkubierten Zellen signifikant erhöht (**Abb. 4.21**). Die PAECs, die mit 10 nM Bradykinin aktiviert waren, haben keine signifikante Erhöhung der Aktivität gezeigt. Dieser leicht verstärkende Effekt von Fibrinogen auf die Aktivität von Bradykinin konnte auch an isolierten kleinen porcinen Koronararterien nachgewiesen werden (Bas et al. 2008).

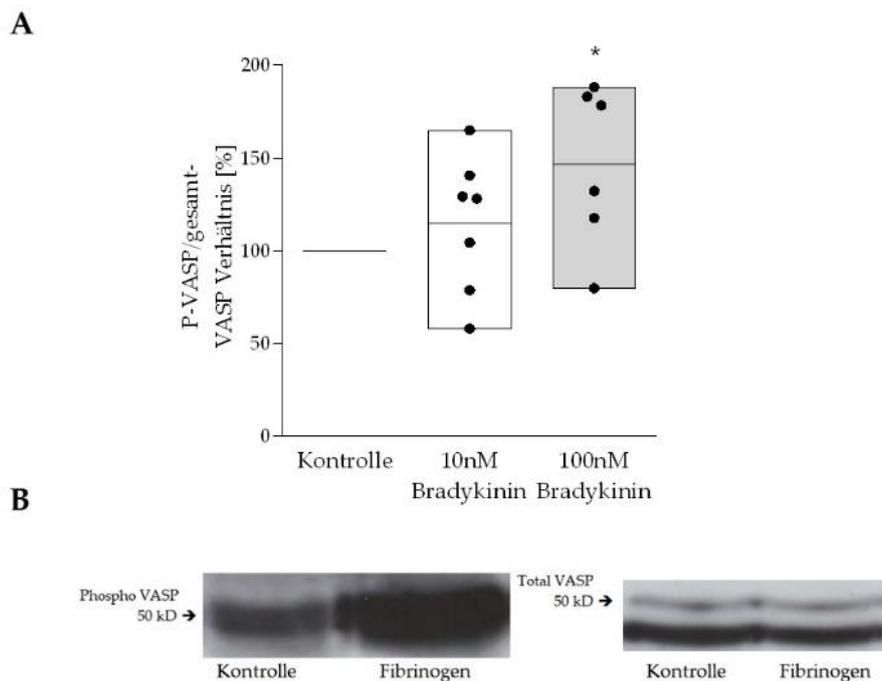


Abbildung 4.21: Effekt von Fibrinogen auf die Aktivität von Bradykinin in porcinen Endothelzellen. Gemessen wurde das Ausmaß der Phosphorylierung von VASP (P-Ser239-VASP) durch die Proteinkinase G im Verhältnis zur Gesamtmenge an detektierbarem VASP. **A**, Während sich bei Inkubation mit 10nM Bradykinin keine Veränderung dieses Verhältnisses ergab (n=7), war die VASP-Phosphorylierung nach Inkubation mit 100 nM Bradykinin signifikant erhöht (n=6, P=0,0232, One-Way ANOVA, P<0.05, Newman-Keuls multiple comparisons test) (Linie am Mittelwert). **B**, Beispiel für Western-Blot mit Detektion der Signale für phosphoryliertes VASP und gesamtes VASP.

4.9. Einfluss von Fibrinogen auf die Funktionalität der Koronararterien durch NO

Wegen der in porcinen Endothelzellen am Beispiel der Bradykinin B2-Rezeptor induzierten NO-Bildung nachweisbaren Steigerung der Aktivität von Bradykinin, wurde an isolierten porcinen Koronararterien untersucht, ob Fibrinogen die Sensitivität der glatten Muskulatur in einem intakten Blutgefäß verändert. Hierzu wurden die Gefäßringe wie im **Abschnitt 3.6.2** beschrieben von den Endothelzellen entfernt, sodass die alleinige Reaktion der glatten Muskelzellen gegenüber aufsteigenden Konzentrationen des NO-Donators SNAP untersucht werden konnte. Die Gefäßringe wurden mit 15 μM Fibrinogen und 1 μM Melagatran für 3 Stunden inkubiert. Als Vergleichsprotein diente 15 μM bovines Serumalbumin und 1 μM Melagatran. Im Anschluss wurden Konzentrations-Wirkungskurven für SNAP in einem Bereich von 1 nM bis 5 μM aufgenommen. Die Relaxation durch den NO-Donator SNAP (1 nM–10 μM) in Gefäßen ohne Endothel zeigten keinen Unterschied zwischen Fibrinogen und BSA inkubierten Schweine Koronararterien ($P=0,1296$, Two-way ANOVA, **Abb. 4.22**).

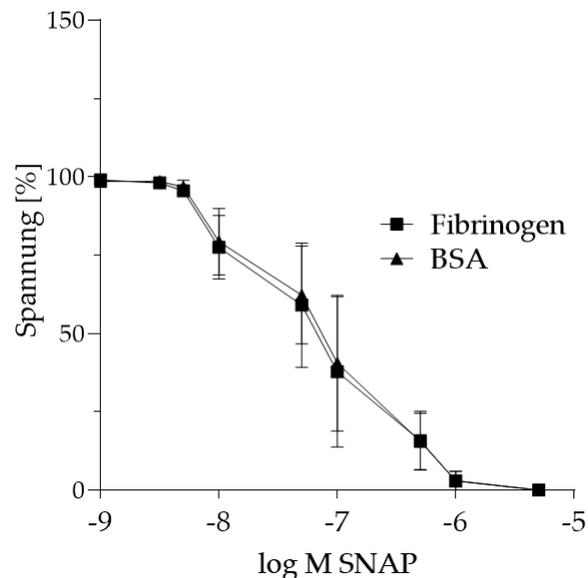


Abbildung 4.22: Auswirkung von Fibrinogen auf die NO-induzierte Vasorelaxation isolierter porciner Koronararterien mit mechanisch entferntem Endothel. Nach einer Vorinkubation über 3 Stunden mit je 15 μM Fibrinogen oder dem Vergleichsprotein bovines Serumalbumin (BSA) zeigte sich kein Unterschied der konzentrationsabhängigen Vasodilatation durch den NO-Donator SNAP (je $n=4$, $P=0,1296$, Two-way ANOVA).

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Aspekte des Bradykinin/NO-Signalweges zu untersuchen. Es soll der Einfluss einer Erhöhung oder Erniedrigung der Bioverfügbarkeit von sowohl exogenem als auch endogenem NO auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors bestimmt werden.

5.1. Aktivierung des NO/cGMP-Signalweg *in vivo*

Das erste wesentliche Teilziel dieser Studie bestand darin, zu untersuchen, ob es durch eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit, entweder bedingt durch eine eNOS-Überexpression oder durch einen therapeutisch eingesetzten NO-Donator, einen Einfluss auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression gibt. Zusätzlich sollte bestimmt werden, ob eine fehlende NO-Bioverfügbarkeit, entweder durch eine komplette eNOS-Defizienz oder durch eine pharmakologische NOS-Inhibition, in Mäusen einen Einfluss auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression hat.

5.1.1. Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges durch genetische Veränderung der eNOS in Mäusen

Mittels des Tie-2-Promotors wurde ein Mausmodell generiert welches die eNOS überexprimiert (Oppermann et al. 2011). Dieser Promotor wurde aufgrund einer Arbeit von Schläger et al. benutzt, in welcher mithilfe des LacZ-Gens gezeigt wurde, dass der Tie-2 Promotor eine endothelspezifische Expression induziert (Schlaeger et al. 1997). Dieser Promotor wurde bereits zur Überexpression verschiedener Proteine verwendet, wobei die Spezifität der Expression ausschließlich in vaskulären Endothelzellen bestätigt werden konnte (Lauer et al. 2005; Suvorava et al. 2005). Inzwischen sind eine Reihe von transgenen Tierlinien publiziert worden, die unter Verwendung des Tie-2 Promotors etabliert wurden (Suvorava und Kojda 2009). In dem in dieser Arbeit verwendeten transgenen Tiermodell wurde die bovine eNOS zur Überexpression verwendet, weil auf diese Weise mittels PCR eine Unterscheidung zwischen der Expression der murinen eNOS und dem Transgen ermöglicht wird. So hat sich in einer anderen transgenen Tierlinie mit Tie-2 gesteuerter eNOS Überexpression gezeigt, dass das Transgen die Expression der murinen eNOS hemmen kann (Suvorava et al. 2017). Die Sequenzen der murinen und der bovinen eNOS stimmen zu 90,9 % überein. Wir haben verschiedene Kolonien auf die eNOS-Expression hin mittels Western-Blot untersucht. Von den 3 etablierten Kolonien zeigten zwei eine deutliche Überexpression der eNOS. Diese betrug bei

Kolonie 2 das 3,3-Fache und bei Kolonie 5 das 2,3-Fache (Oppermann et al. 2011). Der für die Western-Blots verwendete Antikörper erkennt sowohl die murine als auch die bovine eNOS, sodass eine Unterscheidung beider Proteine mit dieser Methode nicht möglich ist. Für die Experimente wurden Tiere der Kolonie 2 verwendet.

Die Erhöhung der eNOS-Expression in den transgenen positiven Tieren ist auch funktional aktiv. Dies konnte beispielsweise durch Blutdruckmessungen und VASP Phosphorylierung gezeigt werden (Suvorava et al. 2005; Oppermann et al. 2011). Die transgen positiven Tiere hatten im Vergleich zu transgen negativen Geschwistertieren einen um etwa 15 mm/Hg reduzierten systolischen Blutdruck. Da dieser Unterschied zwischen transgen-negativen und transgen-positiven Mäusen durch eine dreiwöchige Behandlung mit einem NOS-Inhibitor L-NA aufgehoben wurde (Oppermann et al. 2011) ließ sich nachweisen, dass die Senkung des Blutsdrucks tatsächlich auf der vermehrten vaskulären Aktivität der eNOS beruht. Eine ähnliche Reduktion des Blutdrucks wurde auch von einer japanischen Arbeitsgruppe beschrieben (Ohashi et al. 1998), obwohl bei diesem Modell eine etwa 8-Fache Überexpression der eNOS vorlag. Darüber hinaus verwendete diese Arbeitsgruppe zur endothelspezifischen Überexpression den Preproendothelin-Promotor. In starkem Gegensatz zu dem hier verwendeten Mausmodell, zeigte das Modell der japanischen Arbeitsgruppe eine deutliche Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Acetylcholin, die auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird und sich regelmäßig bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Bluthochdruck oder Diabetes mellitus Typ 2 nachweisen lässt (Kojda und Harrison 1999). Die Autoren vermuten, dass dieser negative vaskuläre Effekt durch nitrosativen Stress ausgelöst wurde, der auf der sehr starken Überexpression der eNOS beruht. Ein solcher Effekt wurde bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell nicht beobachtet. Darüber hinaus konnten auch keine Anzeichen von nitrosativem Stress nachgewiesen werden, denn die messbaren Konzentrationen von Peroxynitrit und Superoxid, beides Indikatoren für oxidativen und nitrosativen Stress, unterschieden sich nicht zwischen den transgen-positiven und den transgen-negativen Mäusen. Insofern stellt die eNOS^{tg}-Maus ein Modell dar, welches sich zum Studium der Effekte von endogenem NO auf Organfunktionen und Expressionsmuster in verschiedenen Geweben sehr gut eignet. Insbesondere die vollständig erhaltene Funktion des vaskulären Endothels erscheint im Zusammenhang mit dieser Dissertation von besonderer Bedeutung, denn Störeffekte, die durch oxidativen bzw. nitrosativen Stress vermutlich ausgelöst werden, treten in diesem Modell nicht auf (Oppermann et al. 2011).

Die Funktion der eNOS in eNOS^{tg} konnte nicht nur über die Senkung des Blutdrucks nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von Vasodilatator-stimuliertem Phosphoprotein (VASP). Das VASP gehört zu einer Familie Prolin-reicher Proteine und wird in Endothelzellen, Thrombozyten, vaskulären glatten Muskelzellen

und Fibroblasten exprimiert (Jarchau et al. 1998). Für räumlich begrenzte Aktinfilamente ist es ein wichtiger Faktor und stellt so unter anderem einen Faktor zur Beeinflussung der Zellmotilität dar (Reinhard et al. 2001). Durch unterschiedliche Enzyme wird VASP an drei verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert. Die Proteinkinase G (PKG) phosphoryliert Serin239, während Serin157 hauptsächlich durch die PKA phosphoryliert und Threonin278 unspezifisch phosphoryliert wird (Smolenski et al. 1998). Die beiden Isoformen der PKG werden im Rahmen der NO-Signaltransduktion durch Bindung von cGMP aktiviert, sodass die VASP Serin-Phosphorylierung Veränderungen der NO-Konzentration bzw. NO-Aktivität zuverlässig anzeigt. Die Messung der Aktivität der PKG wird durch eine Bestimmung der VASP-Phosphorylierung an Serin239 mittels eines spezifischen Antikörpers ermittelt. In dem hier verwendeten Modell eNOS^{tg} war die VASP-Phosphorylierung 1,6-fach erhöht. Diese Erhöhung wurde durch eine Behandlung mit dem NOS-Inhibitor L-Nitroarginin aufgehoben. Dies zeigt, dass die erhöhte VASP-Phosphorylierung von der eNOS-Aktivität abhing. Auch weitere Untersuchungen bestätigten die erhöhte NO-Aktivität in eNOS^{tg}. So waren in der Lunge der eNOS^{tg}-Mäuse auch die cGMP-Werte erhöht. Schließlich konnte auch mittels Elektronenspin-Resonanz gezeigt werden, dass sich in eNOS^{tg} die NO-Konzentration gegenüber den eNOSⁿ-Mäusen in etwa verdoppelt war (Oppermann et al. 2011). Trotz der nachweisbaren verstärkten Aktivierung des NO/cGMP Signalweges blieb die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Herz, Lunge und Aorta der Mäuse unverändert. Dies lässt vermuten, dass endogenes NO die Expression des Bradykinin-B2-Rezeptors unter normalen physiologischen Bedingungen nicht reguliert.

5.1.2. Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges durch Behandlung von Mäusen mit dem NO-Donator PETN

Zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit setzt man seit langer Zeit organische Nitrate ein. Die therapeutische Anwendung von Glyceroltrinitrat wurde erstmals im Jahr 1879 beschrieben (Murrel 1879). Es hat jedoch mehr als 100 Jahre gedauert, bis der Mechanismus der antiischämischen bzw. antianginösen Wirkung organischer Nitrate aufgeklärt werden konnte (Ignarro et al. 1981). Etwa zeitgleich wurde beschrieben, dass sich in Ringpräparationen von Kaninchenaorten eine durch Acetylcholin induzierbare Relaxation nachweisen lässt, die strikt endothelabhängig ist (Furchgott und Zawadzki 1980). Der von den beiden Forschern als „Endothelium-derived relaxing factor“ bezeichnete endogene Mediator wurde bereits 7 Jahre später als NO identifiziert (Palmer et al. 1987). Somit konnte gezeigt werden, dass der NO-cGMP Signalweg eine wichtige Rolle für die vaskuläre Homöostase spielt. Darüber hinaus wurde deutlich, dass organische Nitrate einen Signalweg aktivieren, der auch endogen stimuliert wird.

Die organischen Nitrate Glyceroltrinitrat, Isosorbid-2,5-dinitrat, Isosorbit-5-mononitrat und das langwirksame Pentaerythryltetranitrat zählen noch heute zu wichtigen Arzneistoffen zur symptomatischen Behandlung der koronaren Herzkrankheit. Allerdings findet sich in den Leitlinien der Europäischen kardiologischen Gesellschaft zur Behandlung der stabilen Angina pectoris (Montalescot et al. 2013) und des Myokardinfarktes mit (STEMI) (Ibanez et al. 2018) und ohne ST-Streckenhebung (non-STEMI) (Roffi et al. 2016) nur noch Glyceroltrinitrat als Spray zur kurzfristigen Akutbehandlung als Mittel der ersten Wahl. Alle anderen organischen Nitrate gelten als Mittel der zweiten Wahl, da sie im Gegensatz zu beispielsweise β -Blockern keine prognostisch günstigen Wirkungen aufweisen. Nach heutigen Erkenntnissen beruht der antianginöse Effekt vorwiegend auf einer Senkung der Vorlast (Gewaltig und Kojda 2002), aber auch eine Dilatation von kleinen Koronararterien mit Umverteilung des kardialen Blutflusses hin zu ischämischen Arealen trägt dazu bei (Winbury et al. 1971). Die präferenzielle venöse Dilatation könnte darauf beruhen, dass die Bioaktivierung organischer Nitrate durch die endogene NO-Produktion gehemmt wird, denn die vaskuläre NO-Bildung ist Arterien wegen der deutlich stärkeren physikalische Kräfte wie Druck und Pulsation deutlich stärker ausgeprägt als in Venen (Kojda et al. 1998b).

Mechanistisch gesehen werden organische Nitrate bioaktiviert, indem enzymatisch Nitratgruppen abgespalten und zu Stickstoffmonoxid reduziert werden (Bennett et al. 1992; Chung und Fung 1992). Analysen mit Spin-Traps haben die NO-Bildung aus Glyceroltrinitrat in venösen und arteriellen Gefäßen gezeigt (Mülsch et al. 1995). Aber ob NO das pharmakologisch aktive Prinzip organischer Nitrate ist, wird erstaunlicherweise immer wieder diskutiert (Kleschyov et al. 2003). An der enzymatischen Bioaktivierung organischer Nitrate unter Bildung von NO sind vermutlich mehrere Enzyme beteiligt. Es konnte erst 2002 gezeigt werden, dass Glyceroltrinitrat durch die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH-2) zu NO bioaktiviert wird (Chen et al. 2002). Der gleiche Weg der Bioaktivierung gilt wahrscheinlich auch für PETN und den Metabolit PETriN (Wenzel et al. 2007). Wahrscheinlich werden die beiden anderen Metaboliten PEDN und PEMN durch andere enzymatische Reaktionen bioaktiviert. *In-vitro* können organische Nitrate in Anwesenheit von hohen Konzentrationen von Cystein (5 mM) ebenfalls NO bilden. Im Fall von PETN ließ sich nachweisen, dass die so freigesetzte Menge von NO und die Aktivierung isolierter löslicher Guanylylcyclase sehr gut korrelierte (Kojda et al. 1998a). Dabei zeigte sich auch, dass die gebildeten Mengen von NO mit der Anzahl der Nitratgruppen korrelierte und von PETN über PETriN, PEDN und PEMN schrittweise abnahm.

Eine Einzeldosis intragastrales PETN (50 mg) senkt bei anästhesierten Kaninchen den mittleren Aortendruck um etwa 20 %. Nach intravenöser Gabe von PEDN und PEMN wurde die gleiche Wirkung in Abhängigkeit von der jeweiligen Dosis gemessen. Dies zeigt, dass PEDN einer der wichtigsten vasoaktiven Metaboliten ist (Mullenheim et al. 2001). Beim

Menschen lassen sich PETN und PETriN, im Gegensatz dazu die beiden Metaboliten PEDN und PEMN nach oraler Gabe nicht im Plasma nachweisen (Weber et al. 1995). Dies beruht auf dem hohen „first-pass“ Effekt, dem PETN unterliegt. Daher wird davon ausgegangen, dass die therapeutische Wirksamkeit von PETN auf der vaskulären Bildung von NO aus den Metaboliten PEDN und PEMN beruht. Bei therapeutischer Dosierung findet eine Dilatation der Widerstandsgefäße kaum statt. Deshalb kommt es auch nicht zu einer Blutdrucksenkung. Möglicherweise ist das auch ein Grund dafür, dass PETN im Vergleich zu Isosorbid-5-Mononitrat deutlich weniger Kopfschmerz verursacht (Pfaffenrath et al. 1998).

Trotz der nachweisbaren verstärkten pharmakologischen Aktivierung des NO/cGMP Signalweges durch verschiedene Dosierung von PETN blieb die Bradykinin B2-Rezeptorexpression in Herz, Lunge und Aorta der Mäuse unverändert. Dies lässt vermuten, dass auch exogenes NO die Expression des Bradykinin-B2-Rezeptors unter normalen physiologischen Bedingungen nicht reguliert.

5.2. Hemmung des NO/cGMP-Signalwegs in vivo

Um die Ergebnisse, die nach Stimulation des NO/cGMP Signalwegs erhalten wurden weiter abzusichern, sind weitere *In-vivo*-Experimente durchgeführt worden. Im Zentrum dieser Untersuchungen stand die Frage, ob eine Hemmung des NO/cGMP Signalwegs ebenfalls keine Auswirkungen auf die Expression von Bradykinin-B2-Rezeptoren hat.

5.2.1. Hemmung des NO/cGMP-Signalwegs durch genetische Veränderung der eNOS in Mäusen

Um den Effekt einer chronischen Inhibition des NO/cGMP-Signalwegs auf den Bradykinin B2-Rezeptor zu untersuchen, wurden zwei verschiedene eNOS-defiziente Mausstämme benutzt. Die eNOS-defizienten Mäuse von Shesely et al. wurden durch den Ersatz von Exon 12 des eNOS-Gens, welches für die Calmodulin-Bindungsstelle codiert, durch die Neomycin-Kassette generiert (Shesely et al. 1996). Sie hatten einen im Durchschnitt um 18 mmHg erhöhten Blutdruck gegenüber Wildtyp-Mäusen. Außerdem hatten sie ein um ungefähr 7,5 % niedrigeres Körpergewicht und zusätzlich eine signifikant niedrigere Herzfrequenz. Obwohl die Mäuse einen erhöhten Blutdruck und eine niedrigere Herzfrequenz haben, war das Verhältnis aus Herzgewicht und Körpergewicht nicht anders als die Wildtyp-Mäusen (Shesely et al. 1996). In einer anderen Studie, in der an Ratten eine Langzeit L-NAME Behandlung durchgeführt wurde, zeigte sich eine Hypertrophie des Herzens (Moreno et al. 1996). Die Resultate beider Studien zu vergleichen ist schwierig, weil bei den Ratten außer der eNOS auch die nNOS und die iNOS inhibiert wurden. Die Renin-mRNA-Expression war in den eNOS-defizienten Mäusen leicht reduziert, aber die Plasma-Renin Konzentration war doppelt so hoch

gegen über Wildtyp-Mäusen (Shesely et al. 1996). Zusätzlich haben Kurihara et al. weitere Untersuchungen an diesen Mäusen durchgeführt. Bei ihrer Arbeit geht es darum, ob die nNOS einen Einfluss auf den Blutdruck der eNOS-defizienten Mäuse hat. Dazu haben sie 7-Nitroindazole (7-NI) verwendet, der aufgrund der fehlenden Wirkung auf den Blutdruck bei Mäusen als nNOS-selektiver Inhibitor bezeichnet wird (Moore et al. 1993). Nach einer Bolus-Injektion von 7-NI sah man eine Senkung des Blutdrucks in eNOS-defizienten Mäusen wohingegen die Kontroll-Tiere keine statistisch signifikante Erhöhung zeigten (Kurihara et al. 1998). In einer getrennten Gruppe von 129/SvEv Mäusen wurden die NOS-Aktivitäten im Kleinhirn nach 7-NI-Injektion gemessen, da dieses Gewebe sehr reich an nNOS ist. Die Ergebnisse zeigten eine niedrigere Aktivität der NOS im Kleinhirn. Der maximale Effekt trat 15 bis 60 Minuten nach der Injektion auf und nach zwei Stunden stieg die Aktivität wieder auf Normalwerte an. Nach einer akuten Behandlung mit L-NAME hatten die eNOS-defizienten Mäuse, wie auch nach der Behandlung mit 7-NI, eine niedrigere NOS Aktivität im Kleinhirn und einen niedrigeren Blutdruck. Eine Langzeitbehandlung (Gabe über das Trinkwasser oder zweimalige intraperitoneale Injektion täglich) mit dem Inhibitor 7-NI hat allerdings nicht die Kleinhirn NOS-Aktivität inhibiert (Kurihara et al. 1998).

Ein anderer Stamm eNOS-defizienter Mäuse stammt von Gödecke et al. (Gödecke et al. 1998). Diese wurden durch einen Ersatz der Adeninnukleotid-Bindungsstelle von der NADPH-Bindungsstelle an Exon 24 bis zu einem Teil des Exons 25 des eNOS Gens durch die Neomycin-Kassette generiert. Diese Stelle wurde gewählt, weil die NOS-Reaktion streng von diesem Kofaktor abhängt. Um zu beweisen, dass die eNOS auch funktional inaktiv war, haben die Autoren Aorten-Endothelzellen kultiviert und auf NO hin untersucht. Die Zellen zeigten nur Hintergrundwerte an NO_x -Bildung. Das Endothel zeigt außerdem keine NADPH-Diaphorasefärbung, welche man zu den Nachweisen der Funktionalität der NOS benutzt. Die eNOS-defizienten Mäuse haben auch 50 % geringere Plasma $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ Werte. Wie bei den Mäusen von Shesely et al. hatten auch diese Tiere keine Herzhypertrophie, aber ebenfalls einen erhöhten Blutdruck (im Durchschnitt um 28 mmHg) und eine niedrigere Herzfrequenz. Die Tiere zeigten auch keinen Unterschied hinsichtlich des basalen Koronarflusses, ebenso war die koronare venöse Freisetzung von Adenosin identisch (Gödecke et al. 1998).

Die erste eNOS-defizient Maus wurde von Huang et al. kreiert (Huang et al. 1995). Wir haben diesen Stamm nicht für unsere Experimente benutzt. Für das Generieren der Maus haben sie die Ribose- und Adeninnukleotid-Bindungsstelle der NADPH-Bindungsstelle durch die Neomycin-Kassette ersetzt. Wie bei den zwei bereits beschriebenen Stämmen haben diese eNOS-defizienten Mäuse auch einen signifikant höheren Blutdruck (im Durchschnitt um 20 mmHg). Die Ergebnisse waren auch unter Narkose ähnlich. Bei einer Mausmutante der neuronalen NOS von Huang et al. (Huang et al. 1993) war der Blutdruck ungefähr gleich wie der der Wildtyp-Maus (Huang et al. 1994). Die eNOS-defizienten Mäuse dieses Stammes

zeigten in Experimenten einen niedrigeren Blutdruck als Antwort auf L-NA, was in unser Arbeitsgruppe mit den Mäusen von Shesely et al. nicht bestätigt werden konnte (Kojda et al. 1999). Um die Aktivität zu kontrollieren, wurden Organbadversuche mit Aortenringen der Tiere durchgeführt. Die Wildtyp-Mäuse haben eine dosisabhängige Dilatation auf Acetylcholin gezeigt, nicht aber eNOS-defizienten Mäuse (Huang et al. 1995).

Untersuchungen der Mäuse des Shesely-Stamms haben ergeben, dass der heterozygote Genotyp eNOS^{+/-} sich nicht von den transgen negativen Geschwistertieren unterschied. Dementsprechend weisen diese Tiere trotz der Depletion des eNOS Gens auf einem Allel keinerlei Verminderung der eNOS Expression in der Aorta und keinen Phänotypus auf (Kojda et al. 1999). Dies lässt vermuten, dass für den Einfluss der eNOS auf die Regulation des Blutdrucks und die endothelialen Funktionen die Expression eines eNOS-Gens ausreicht. Es zeigte sich jedoch etwas später, dass eNOS^{+/-} Maus nicht in der Lage ist die eNOS Expression nach körperlichem Training zu erhöhen (Kojda et al. 2001).

In dieser Arbeit wurde anhand des Shesely-Stamms wie auch des Gödecke-Stamms der Einfluss einer Defizienz der eNOS auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors untersucht. Weder in Homogenaten von Herzen noch bei denen der Lunge konnte mittels Western-Blot eine Veränderung der Expression festgestellt werden. Demnach bestätigen diese Ergebnisse die Ergebnisse, die durch dauerhafte Aktivierung des NO/cGMP-Weges erhalten wurden und stützen die Schlussfolgerung, dass NO *in vivo* keinen messbaren Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors aufweist.

5.2.2. Einfluss der Deaktivierung des NO/cGMP-Signalwegs auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression *in vivo*

Um den Effekt einer pharmakologischen Inhibition des NO/cGMP-Signaltransduktionswegs auf den Bradykinin-B2-Rezeptor zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse für drei Wochen mit dem NOS-Inhibitor L-NA behandelt. Palmer et al. hatten im Jahr 1988 beschrieben (Palmer et al. 1988), dass die Biosynthese von NO durch die eNOS aus der Aminosäure L-Arginin erfolgt. Zu gleichen Ergebnissen für alle Isoformen der NOS kamen auch weitere Untersuchungen in Endothelzellen (Sakuma et al. 1988; Schmidt et al. 1988), Nebennieren (Palacios et al. 1989), Gehirn (Knowles et al. 1990), neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Mccall et al. 1989; Salvemini et al. 1989; Wright et al. 1989) sowie in Hepatozyten (Curran et al. 1989). Diese Entdeckung führte zur Entwicklung von pharmakologischen Inhibitoren der NOS, die durch Substitution der Guanidino-Struktur von L-Arginin erzielt wurde. Bei dem ersten publizierten NOS-Inhibitor handelte es sich um das substituierte Arginin-Derivat N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) (Iyengar et al. 1987). Weitere häufig verwendete NOS-Inhibitoren sind u. a. N-Iminoethyl-L-ornithin (L-NIO), N^G-Nitro-L-arginin (L-NA) und N^G-Nitro-L-argininmethylester

(L-NAME). Die Effekte der L-Arginin Inhibitoren wurden an vielen verschiedenen Geweben von unterschiedlichen Tieren untersucht. Hierzu zählen beispielsweise Anococcygeus-Muskulatur der Maus (Gibson et al. 1990), Thrombozyten (Radomski et al. 1991b), Neutrophile und Makrophagen (Mccall et al. 1989; Salvemini et al. 1989; Stuehr et al. 1989) (Wright et al. 1989) sowie Hepatozyten (Curran et al. 1989), Gehirngewebe (Knowles et al. 1990; Dwyer et al. 1991), Nebenniere (Palacios et al. 1989) und Blutgefäßen (Palmer et al. 1988; Sakuma et al. 1988; Rees et al. 1989a; Kobayashi und Hattori 1990; Mülsch und Busse 1990; Kojda et al. 1999). Ebenfalls wurden die Effekte dieser NOS-Inhibitoren auf das Herz-Kreislaufsystem untersucht, sowohl die akuten (Rees et al. 1990; Huang et al. 1995; Gödecke et al. 1998) als auch die chronischen Effekte (Kobayashi et al. 1991; Moreno et al. 1996; Kurihara et al. 1998; Kojda et al. 1999).

Untersuchungen zum Effekt von L-NA auf den Blutdruck durch Kobayashi et al. (Kobayashi et al. 1991) und von L-NAME durch Moreno et al. (Moreno et al. 1996) zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Steigerung des Blutdrucks in Ratten. Diese Daten weisen darauf hin, dass kaum eine Spezifität der verschiedenen NOS-Inhibitoren gegenüber einer der NOS-Isoformen existiert, jedoch L-NAME und L-NA die effektivsten NOS-Inhibitoren im Herz-Kreislauf-System sind. Daher wurden sie auch in unseren Untersuchungen zum Einfluss der endogenen NO-Synthese auf die Expression des B2-Rezeptors *in vivo* und *in vitro* verwendet. Darüber hinaus konnte davon ausgegangen werden, dass es mit diesen NOS-Inhibitoren möglich ist, die endogene NO-Synthese vollständig zu blockieren. Ein direkter Vergleich der Blutdruck-steigernden Wirkung von L-NA in C57BL/6 Mäusen zeigte keinen Unterschied zur Hypertonie, die in eNOS^{-/-}-Tieren gemessen wurde und bei Behandlung der eNOS^{-/-} hatte L-NA keinen weiteren Effekt auf den Blutdruck (Kojda et al. 1999) Trotz der nachweisbar starken Wirkung der NOS-Inhibitoren konnte in dieser Arbeit in C57BL/6 kein Einfluss von L-NAME auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression *in vivo* beobachtet werden. Diese Befunde sind deckungsgleich mit den Ergebnissen, die in eNOS^{-/-}-Tieren erzielt wurden und erlauben daher den Schluss, dass die endogene Bildung von NO in Mäusen die Expression von B2-Rezeptoren nicht beeinflusst.

Untersucht wurde auch die Funktionalität des Bradykinin B2-Rezeptors in eNOS-defizienten Mäusen. Die Ergebnisse in der Aorta der Maus zeigten, dass Bradykinin zwei Signalwege unterschiedlicher Wirkung, die Vasokonstriktion die durch Prostaglandin und die Vasorelaxation, die durch NO ausgelöst wird, aktiviert. Die vasokonstriktorische Wirkung des Prostaglandins wurde durch die gleichzeitige Bildung von NO abgeschwächt. Die Wirkung von Prostaglandinen bei der Pathogenese nicht-allergischer Angioödeme wird durch unsere Arbeitsgruppe derzeit weiter untersucht.

5.3. Einfluss des NO/cGMP-Signalwegs auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression *in-vitro*

Ein Teilziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob *in vitro* eine Erhöhung oder Erniedrigung der Bioverfügbarkeit von exogenem oder endogenem NO einen Einfluss auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression hat.

Zunächst wurde cAMP, das auch an den Signalwegen der Vasodilatation beteiligt ist, Ende der 50er Jahre aus verschiedenen Geweben isoliert (Sutherland und Rall 1957; Rall und Sutherland 1958; Sutherland und Rall 1958). Später haben Ashman et al. im Urin von Ratten cGMP detektiert und zum ersten Mal bewiesen, dass cGMP im biologischen System existiert (Ashman et al. 1963). Hardman und Sutherland haben nach Untersuchungen am bovinen Herz die Hypothese aufgestellt, dass es mehr als eine Phosphodiesterase im Gewebe existieren könnte (Hardman und Sutherland 1965). Price, Ashman und Mellicow haben zum ersten Mal das Enzym Guanylylcyclase erwähnt und die Katalyse von GTP zu cGMP diskutiert (Price et al. 1967). Ishikawa et al. haben viele verschiedene Gewebe der Ratte und auch andere Tierarten als Säugetiere auf cGMP untersucht und dabei entdeckt, dass es weit verbreitet war. Es wurde auch bestätigt, dass Adenylylcyclase und Guanylylcyclase zwei verschiedene Enzymsysteme sind und dass Guanylylcyclase membranständig ist (Ishikawa et al. 1969). Schulz, Böhme und Munske haben ebenfalls in verschiedenen Geweben von Ratten Guanylylcyclase detektiert und aus ihren Ergebnissen gefolgert, dass Guanylylcyclase löslich ist und diese nur GTP und nicht ATP als Substrat erkennt (Schultz et al. 1969). White und Aurbach haben bestätigt, dass Guanylylcyclase sich von Adenylylcyclase unterscheidet und das Adenylylcyclase membranständig, wohingegen das Guanylylcyclase löslich ist und spezifisch GTP und nicht ATP zyklisiert (White und Aurbach 1969). Auch Hardman und Sutherland haben gezeigt, dass Guanylylcyclase in zwei verschiedenen Formen existiert, eine lösliche und eine membranständige, wobei in vielen Geweben meistens die lösliche Form exprimiert wird. Auch sie haben gesehen das Guanylylcyclase nur GTP katalysiert (Hardman und Sutherland 1969). Den ersten Befund eines Anstiegs der Gewebespiegel von cGMP während einer Veränderung einer Organfunktion zeigten George et al. anhand der Erhöhung der cGMP Werte in Acetylcholin inkubierten Rattenherzen (George et al. 1970). Es dauerte dann weitere zehn Jahre bis Furchgott und Zawadzki entdeckten, dass aus dem vaskulären Endothel ein Faktor freigesetzt wird, der Arterien dilatiert und nannten diesen Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Furchgott und Zawadzki 1980). Nur wenige Jahre später wurde von Ignarro und Furchgott während des „4. International Symposiums of Mechanisms of Vasodilatation“ in Rochester diskutiert, dass sich es bei EDRF möglicherweise um NO handelt (Vanhoutte et al. ; Furchgott 1988; Ignarro 1988). Ignarro et al. haben durch Versuche dargestellt, dass die Wirkungseigenschaften von EDRF und NO nicht zu unterscheiden waren und haben erkannt, dass es sich bei EDRF um NO oder ein instabile Nitrose-Verbindung wie

S-Nitrosothiol handeln muss (Ignarro et al. 1987). Palmer et al. konnten im gleichen Zeitraum dann mittels Chemilumineszenz den EDRF als NO identifizieren (Palmer et al. 1987). Nur ein Jahr später berichteten Palmer et al., dass das endogene NO in Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird und vermuteten, dass ein Enzym für diese oxidative Umwandlung verantwortlich ist. Dazu wurden für die Untersuchungen Calcium-Ionophor und Bradykinin an Endothelzellen aus Schweineaorta benutzt (Palmer et al. 1988). Cocks et al. und Gryglewski et al. haben auch für ihre Experimente Calcium-Ionophor und Bradykinin an Endothelzellen benutzt. Wie bei Palmer et. al. waren die Endothelzellen auf Mikroträgerperlen angehaftet. Die Perlen waren mit einem Durchfluss-System mit Arterien ohne Endothelzellen verbunden. So konnten sie zeigen, dass EDRF nur von Endothelzellen freigesetzt wurde. Es wurden Zellen verschiedener Passagen benutzt (von 2. bis 18. Passage) und gezeigt, dass manche Agonisten, die EDRF oder Prostaglandine freisetzen, bei höheren Passagen ihre Wirkung verlieren, während dies für Bradykinin und Calcium-Ionophor nicht galt (Cocks et al. 1985; Gryglewski et al. 1986). Infolgedessen haben wir die primären Endothelzellen nur bis zur 4. Passage verwendet.

Die Zellen wurden mit NO-Donatoren und NO Inhibitoren inkubiert, über deren Wirkung bereits in **Abschnitt 4.5** berichtet wurde. Für akute Wirkung wurde für unsere In-vitro-Untersuchungen SNAP benutzt. Dabei handelt es sich um ein ungewöhnlich stabiles und kristallines Nitrosothiol, welches in wässriger Lösung bereits durch Spuren von Schwermetallen unter Bildung von NO zerfällt (Barnett et al. 1994) und in Gegenwart von Zellen oder Geweben NO nach einer Transnitrosierung, vermutlich unter Bildung des instabilen Nitroso-Glutathion freisetzt. (Mcaninly et al. 1993). Um die zeitabhängige Wirkung zu untersuchen, haben wir eine Dosierung von 10µM SNAP eingesetzt, die keine Desensibilisierung der sGC auslöst (Kojda et al. 1998b). Die Zytotoxizität von SNAP wurde von Garg und Hassid untersucht und als sehr gering eingestuft (Garg und Hassid 1989). Die Halbwertszeiten von SNAP ist relativ kurz, sodass bereits nach 10 Minuten der Zerfall soweit beendet ist, dass kein weiteres NO mehr entsteht (Kojda et al. 1998b). Für die Untersuchung der Langzeitwirkung von NO wurde daher das NONOate DETA/NO benutzt, welches eine Halbwertszeit von etwa 20 Stunden aufweist (Mooradian et al. 1995). Mooradian et. al. untersuchten ebenfalls die Zytotoxizität des DETA/NOs und sahen eine geringe Wirkung auf die Überlebensfähigkeit von glatte Muskelzellen der Aorta von Ratten (Mooradian et al. 1995; Kimura et al. 1998). Nach der Inkubation wurde die die hier verwendeten PAEC unter dem Mikroskop untersucht. Es wurden keine im Medium schwimmenden Zellen detektiert und keine Deformation der Zellen festgestellt.

Die Untersuchungen an Schweine-Aorten Endothel- und glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene mit aktiviertem NO/cGMP-Signalweg zeigten mittels Western-Blot keine Wirkung auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression. In

gleicher Weise reagierten auch Zellen mit aktivierter eNOS, die mit L-NA behandelt waren, denn auch hierbei ließ sich kein Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors nachweisen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei immortalisierten Endothelzellen aus zerebralen Blutgefäßen von Mäusen erzielt (Khosravani et al. 2015).

Demnach bekräftigen diese Ergebnisse die In-vivo-Daten, die durch Aktivierung und Hemmung des NO/cGMP-Signalweges erhalten wurden und stützen die Schlussfolgerung, dass die Verfügbarkeit von NO keinen messbaren Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptors aufweist.

5.4. Einfluss von endogenem und exogenem Bradykinin auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression *in vitro*

Rocha et al. entdeckten das Bradykinin, indem sie Plasma Globulin mit dem Gift der brasilianischen Lanzenotter-Schlange (*Bothrops Jararaca*) versetzten. Dabei entdeckten sie, dass das Gift im Meerschweinchendarm eine langsame Bewegung auslöste, daher nannten sie die Substanz Bradykinin (Rocha et al. 1949). Nach weiteren Untersuchungen fanden sie auch heraus, dass es sich bei der Substanz um ein Polypeptid handelte (Andrade et al. 1953). Elliot, Lewis und Horton untersuchten das Bradykinin ebenfalls, um die Struktur weiter zu erforschen und zu klären. Dazu haben sie die Struktur mit Proteinabbauenden Arbeiten bestätigt (Elliott et al. 1960b). Nach einer Diskussion mit Dr. Boissonass konnte ein Konsens über die Struktur des Bradykinin erzielt werden. Nachdem die Struktur des Bradykinin bekannt war, konnte es durch Dr. Boissonnas et al. synthetisch in beliebigen Mengen hergestellt werden (Boissonnas et al. 1963). Dies hat die weitere Forschung mit Bradykinin erleichtert und vorangetrieben, denn nun konnten zahlreiche weitere Experimente durchgeführt werden.

Moexipril war eine in unseren Experimenten eingesetzte Substanz. Moexipril ist ein ACE-Hemmer, der in Phosphatpuffer (pH 6,8) eine Haltbarkeit von 38 Tagen hat (Gu und Strickley 1990). Im Meerschweinchen Serum waren durchschnittlich 2,6 nmol/L Moexipril notwendig, um eine Inhibition der ACE-Aktivität von 50 % (IC_{50}) zu erzielen (Friehe und Ney 1997).

Faussner et al. transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters mit Genen des humanen Bradykinin B2-Rezeptor (Faussner et al. 1998) und inkubierten diese Zellen mit Bradykinin 24 Stunden lang. Sie berichteten, dass diese Langzeit-Inkubation die Bindungsaktivität der B2-Rezeptoren für Bradykinin in den transfizierten Ovarialzellen stark verringert hat (Faussner et al. 1999).

Um die Effekte des Bradykinins an humanen Vorhaut-Fibroblasten zu untersuchen, haben Blaukat et al. 2003 diese bis zu 24 Stunden lang mit Bradykinin inkubiert. Um Effekte der Bradykinin-Inkubation genauer zu untersuchen, führten sie anschließend verschiedene Experimente durch. Für die Western-Blot-Analyse wurden unterschiedliche kommerzielle

anti-B2 Antikörper eingesetzt. Da sie aber mit den Versuchsergebnissen nicht zufrieden waren, haben sie selbst einen monoklonalen anti-B2 Antikörper entwickelt. Nach einer 12-stündigen Inkubationsdauer zeigte sich eine mäßige Verringerung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression und nach einer 24-stündigen Inkubation war diese um maximal 50 % reduziert. Mittels Northern-Blotting wurde die mRNA des Bradykinin B2-Rezeptors analysiert, es konnte aber keine Veränderung der Menge gezeigt werden. Sie postulierten daher, dass die Syntheserate des Bradykinin B2-Rezeptor durch die Inkubationen reduziert wurde (Blaukat et al. 2003).

Kalatskaya et al. haben in HEK293 Zellen (human embryonic kidney 293 cells [menschliche embryonale Nierenzellen]) die Wirkung von grün fluoreszierendem Protein (enhanced green fluorescent protein (EGFP)), welches an das C-terminale Ende des Bradykinin B2-Rezeptor fusioniert wurde und mit Wildtyp B2-Rezeptoren verglichen (untersucht). Sie berichteten, dass EGFP keinen Einfluss auf die Expression des Bradykinin B2-Rezeptor hat und die Expression des Wild-Typ B2-Rezeptors und der des mit EGFP-markierten B2-Rezeptors identisch waren (circa 10.4 pmol/mg B2-Rezeptor Protein). Beide Konstrukte zeigten nach einer 10-minütigen Inkubation mit [3H]-Bradykinin in den Zellen eine fast 80%ige Konzentration des [3H]-Bradykinins. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass das EGFP die Internalisierungsmechanismen des B2-Rezeptors nicht beeinflusst. Bei Wild-Typ B2-Rezeptoren, hat man nach einer 5-stündigen Inkubation mit 10 µM Bradykinin eine Verminderung der Oberflächenbindung beobachten können. Bei den EGFP-markierten B2-Rezeptoren zeigte sich allerdings sogar nach einer 8-stündigen Inkubation mit Bradykinin kein Verlust der Oberflächenbindung. Lediglich nach einer 24-stündigen Inkubation mit Bradykinin konnte eine reduzierte B2-Rezeptorexpression detektiert werden.

In weiteren Experimenten wurden HEK-Zellen, welche eine auf 60 % reduzierte B2-Rezeptor-Expression aufweisen (4,4 pmol/mg Protein) mit 10 µM Bradykinin inkubiert. Hier zeigte sich eine deutlich verminderte Oberflächenbindung des Bradykinin an den B2-Rezeptor. Die gleichen Ergebnisse konnten bei den mit EGFP-markierten B2-Rezeptoren erzielt werden. Die Rate der Oberflächenbindung des Bradykinins an den B2-Rezeptor ist daher abhängig vom Expressionsniveau des B2-Rezeptors. Auch dokumentierten diese Daten, dass das EGFP nicht die Internalisierung des Rezeptors beeinflusst, allerdings reduziert es die Herunterregulation des B2-Rezeptors (Kalatskaya et al. 2006). Ein Nachteil ist, dass die HEK 293 Zellen im Vergleich mit den Endothelzellen keine eNOS exprimieren und kein NO produzieren.

Bawolak et al. haben die Wirkung des B2-Rezeptor Agonisten B-9972 untersucht. Dieser Agonist kann nicht inaktiviert werden. In dieser Studie wurden HEK293-Zellen (human embryonic kidney 293 cells [menschliche embryonale Nierenzellen]) mit B2-Rezeptoren aus Kaninchen transfiziert, welche mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) markiert waren.

Die transfizierten Zellen wurden für 3 Stunden und für 12 Stunden entweder mit B-9972 oder mit Bradykinin + Captopril (ACE-Hemmer) inkubiert. Die Ergebnisse nach 3-stündiger Inkubation zeigten keinen Unterschied in der B2 Expressionsrate. Nach 12-stündiger Inkubation konnte aber eine erniedrigte Expressionsrate des B2-Rezeptor-GFP detektiert werden (Bawolak et al. 2007). Bawolak et al. haben daher ergänzend auch Experimente mit einem weiteren inaktivierungsresistenten B2-Rezeptor Agonist Verbund 47a durchgeführt. Auch hier zeigte sich nach einer 12-stündigen Inkubation eine reduzierte Expression des B2-Rezeptor-GFP (Bawolak et al. 2009). Die oben benannten Zellen besitzen keine eNOS und dadurch ist der NO/cGMP Signalweg in diesen Zellen nicht vorhanden.

Tarseviciene-Stewart et al. haben ein Tiermodell in Ratten generiert, welches eine schwere pulmonale Hypertonie aufweist. In diesen Ratten wurde der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Rezeptor (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR)) mit SU5416 blockiert. Daraus resultiert eine chronische Hypoxie und vaskuläre Läsionen der Lunge, welche humanen pulmonalen Gefäßerkrankungen sehr ähnelt (Taraseviciene-Stewart et al. 2001). Sie berichteten, dass in diesen Ratten nach einer vierwöchigen Behandlung mit dem inaktivierungsresistenten B2-Rezeptor Agonist B-9972 eine reduzierte B2-Rezeptorexpression in den pulmonalen Gefäßen auftrat (Taraseviciene-Stewart et al. 2005).

Kuoppala et al. haben humane Endothelzellen aus Koronararterien für 18 Stunden mit Bradykinin und einem ACE-Hemmer inkubiert. Eine veränderte B2-Rezeptor mRNA Expression konnte dabei nicht gezeigt werden (Kuoppala et al. 2002). Diesbezüglich wurde aber in primären Endothel Zellen keine Änderung der B2-Rezeptorexpression detektiert. Kongruent dazu sind auch die Ergebnisse der mit Bradykinin und Moexipril inkubierten porcinen aortalen Endothelzellen (PAEC). Khosravani et al. haben Wildtyp-Mäuse C57Bl/6 entweder mit Icatibant, einem B2-Rezeptor Antagonisten oder mit C1-Esterase-Inhibitor einem Kallikrein-Hemmer behandelt. Eine Veränderung der Bradykinin B2-Rezeptorexpression konnte aber nicht detektiert werden (Khosravani et al. 2015). Bisha et al. haben in einem Endothel-spezifisch humanen B2-Rezeptor-exprimierenden transgenen Mausmodell die B2-Rezeptorexpression untersucht und konnten ebenfalls keine Veränderung der murinen B2-Rezeptorexpression in den B2-Rezeptor-transgenen Mausmodell zeigen (Bisha et al. 2018).

In dieser Arbeit wurden auch menschliche dermale Blut-Endothelzellen mit Bradykinin und Moexipril inkubiert und für die Immunzytochemie geeigneten anti-B2-Rezeptor-Antikörper, der durch Kempe et al. validiert wurde, untersucht (Kempe et al. 2020). Die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der inkubierten PAEC überein.

5.5. Einfluss von Fibrinogen auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression und –Aktivität *in vitro*

Sobald Bradykinin freigesetzt wird, wirkt es durch die Bindung an Bradykinin-Rezeptoren, B1 und B2 als vasoaktives Peptidhormon im Gefäßendothel und induziert die klassischen Entzündungssymptome, d. h. Schwellung und Rötung (Maurer et al. 2011). Die Bildung von Bradykinin führt zur Freisetzung verschiedener Zytokine, z. B. Interleukin 6 (IL-6). CRP und Fibrinogen sind Akute-Phase-Proteine, die nach Stimulation durch IL-6 aus der Leber freigesetzt werden. Ein gemeinsames Merkmal von CRP und Fibrinogen, welche auf eine geringgradige Entzündung hinweisen, war das vermehrte Auftreten von Bradykinin-Metaboliten im Plasma der Probanden (Pietzner et al. 2017).

Das primäre Ziel unserer Arbeit war daher, die molekularbiologischen Ursachen des nicht allergischen Angioödems weiter zu untersuchen, denn zum jetzigen Zeitpunkt sind die vorhandenen Erkenntnisse noch unzureichend. Es ist zwar bereits bekannt, dass das nicht allergische Angioödem durch erhöhte Bradykinin-Spiegel verursacht wird, den genauen Signalweg kennt man aber noch nicht (Bas et al. 2007). Eine unserer Vermutungen war, dass der durch Bradykinin aktivierte NO/cGMP-Signalweg einen Einfluss auf die B2-Rezeptorexpression hat. Wie bereits erwähnt konnten wir aber in unseren Experimenten keinen direkten Einfluss auf B2-Rezeptorexpression detektieren. Bas et al. konnten bereits erhöhte Plasmaspiegel von CRP und Fibrinogen bei Patienten mit einem ACE-Hemmer induzierten Angioödem nachweisen (Bas et al. 2008). Der häufigste Auslöser eines Angioödems bei HEA-Patienten ist ein leichtes Trauma, das die Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade auslöst (Iwamoto et al. 2014). Während der Angioödem-Attacke bei Patienten mit HAE wurde über hohe Konzentrationen von Prothrombinfragment F1 + 2 und D-Dimer (Fibrin Degradation) berichtet (Cugno et al. 2009).

Daher haben wir den Effekt von Fibrinogen auf die B2-Rezeptorexpressionsrate in porcinen aortalen Endothelzellen (PAEC), Tumorzellen aus dem Plattenepithelkarzinom (UDSCC2), Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC) und die B2-Rezeptor-Aktivität in PAECs und Koronararterien ohne Endothelschicht untersucht. Die Expressionsrate des Bradykinin B2-Rezeptors des PAECs war nicht signifikant verändert, auch die B2-Rezeptor-Aktivität war erst ab von 100 nM Bradykinin Inkubation signifikant verändert. In porcinen Koronararterien ohne Endothelschicht konnte nach einer Inkubation mit Fibrinogen kein Effekt auf die B2-Rezeptor Aktivität gezeigt werden.

Bradykinin B2-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigten im Plasma erhöhte Konzentrationen von NO und Prostacyclin (Fang et al. 2013). Bradykinin B2-Rezeptor- und Prä-Kallikrein-defiziente Mäuse haben eine verlängerte Blutungszeit. Aber mit der Behandlung mit dem COX-2-Hemmer Nimesulid verkürzt sich die Verschlusszeit sowohl bei Prä-Kallikrein-defizienten als

auch bei Bradykinin B2-Rezeptor-defizienten Mäusen signifikant (Fang und Schmaier 2020). In der Studie ABRASE hat man festgestellt, dass COX-Hemmer, wenn sie vor der Bradykinin-Injektion verabreicht wurden, dessen Extravasation erheblich verringerten (Gholamreza-Fahimi et al. 2020). Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass der NO/cGMP Signalweg im Gegensatz zu COX-Signalwegen bei nicht allergischen Angioödemem keinen Einfluss hat. Derzeit ist die Identifizierung der oder des Prostaglandins, welches durch Bradykinin in kleinen Blutgefäßen der Haut gebildet wird, Gegenstand laufender Forschungsarbeiten in unserer Gruppe.

6. Zusammenfassung

Einfluss des NO/cGMP-Signalwegs auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, die molekularbiologischen Ursachen des nicht-allergischen Angioödems zu untersuchen. Es ist bekannt, dass das nicht-allergische Angioödem durch einen erhöhten Bradykininspiegel verursacht wird, jedoch ist der genaue Signalweg noch unklar.

Leider gibt es nur wenige Studien über Veränderungen der Bradykinin B2-Rezeptor-Expression im kardiovaskulären System. Über die Wirkung von Bradykinin auf die eNOS-Expression wurde bereits berichtet, aber bis zum Beginn meiner Arbeit hat keine Studie über die Wirkung von eNOS auf die B2-Rezeptorexpression berichtet.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des NO/cGMP-Signalweges auf Bradykinin B2-Rezeptoren untersucht. Eine Langzeit-Wirkung des NO/cGMP-Signalwegs auf die B2-Expression wurde *in vivo* in genetisch veränderten Mäusen untersucht. Der Mangel an eNOS-abgeleitetem NO im kardiovaskulären System wurde in eNOS-defizienten Mäusen untersucht, die Auswirkungen der erhöhten Aktivität der vaskulären eNOS wurden in Mäusen mit endothelspezifischer Überexpression von eNOS untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Effekte von NO auf die Bradykinin B2-Rezeptorexpression.

Um die akuten Effekte der Abwesenheit oder Aktivierung des NO/cGMP-Signalweges zu untersuchen, wurden Wildtyp (WT) Mäuse mit NOS-Inhibitoren oder NO-Donatoren entsprechend behandelt. Für *In-vitro*-Studien wurden porcine Aortenendothelzellen (PAEC) und porcine aortale glatte Muskelzellen mit NO-Donatoren oder PAEC mit NOS-Inhibitor behandelt. Auch in dieser Untersuchung wurden keine signifikanten Veränderungen der Bradykinin B2-Rezeptorexpression festgestellt. Bradykinin-inkubierte Endothelzellen zeigten ebenfalls keine signifikante Veränderung der Bradykinin B2-Expression. Zusätzlich wurde die Wirkung von Fibrinogen auf Bradykinin B2-Rezeptoren untersucht und es wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Diese Ergebnisse zeigten eine überraschende Stabilität der Bradykinin B2-Rezeptoren und keinen Hinweis auf die molekularbiologischen Ursachen, die das nicht-allergische Angioödem auslösen.

Funktionstests des Bradykinin B2-Rezeptors in eNOS-defizienten und Wildtyp-Mäusen zeigten, dass Bradykinin eine Vasokonstriktion in der Aorta der eNOS-defizienten und Wildtyp-Maus induziert. Die Hemmung der Prostaglandinbildung zeigte, dass im Wildtyp diese Vasokonstriktion durch gleichzeitige Bildung von NO abgeschwächt wurde. Diese NO-abhängigen Veränderungen der Aortenverengung von Mäusen legen nahe, dass NO zwar wichtig für die B2-Rezeptorfunktion ist, aber keinen Einfluss auf die B2-Rezeptor

Proteinexpression hat. Diese Mechanismen könnten Relevanz für die Bradykinin-vermittelten molekularbiologischen Ursachen des nicht-allergischen Angioödems haben.

7. Summary

Influence of the NO/cGMP pathway on bradykinin B2 receptor expression

The primary aim of this work was to investigate the molecular biological causes of non-allergic angioedema. It is known that non-allergic angioedema is caused by an increased level of bradykinin, however the exact signaling pathway is still unclear.

Unfortunately, there are just few studies on changes in bradykinin B2 receptor expression in cardiovascular system. The effect of bradykinin on eNOS expression has already been reported, but until the beginning of my work no study has reported the effect of eNOS on B2 receptor expression.

In this work the influence of NO/cGMP signaling pathway on bradykinin B2 receptors was investigated. A long-term effect of NO/cGMP signaling pathway on B2 expression was studied in vivo in genetically modified mice. Lack of eNOS-derived NO in cardiovascular system was studied in eNOS deficient mice, effects of increased activity of vascular eNOS were investigated in mice with endothelial-specific overexpression of eNOS. The results showed no significant effects of NO on bradykinin B2 receptor expression.

To investigate acute effects of absence or activation of NO/cGMP signaling pathway, wild-type (WT) mice were treated with NOS inhibitors or NO donors accordingly. For in vitro studies porcine aortic endothelial cells (PAEC) and porcine aortic smooth muscle cells were treated with NO donors or PAEC with NOS inhibitor. Likewise, no significant changes of bradykinin B2 receptor expression could be detected in this investigation. Bradykinin-incubated endothelial cells also showed no significant change of bradykinin B2 expression. In addition, the effect of fibrinogen on bradykinin B2 receptors was also examined and no significant changes were detected.

These results showed a surprising stability of bradykinin B2 receptors and no indication of the molecular biological causes that trigger non-allergic angioedema.

Functional testing of the bradykinin B2 receptor in eNOS-deficient and wild-type mice showed that bradykinin induces vasoconstriction in the aorta of the eNOS-deficient and WT mouse. Inhibition of prostaglandin formation showed that in the wild-type, this vasoconstriction was attenuated by simultaneous formation of NO. This NO-dependent changes of mouse aortic constriction suggest that although NO is important for B2R function, it has no effect on B2R protein expression. These mechanisms may have relevance to the bradykinin-mediated molecular biological causes of non-allergic angioedema.

8. Literaturverzeichnis

Abu-Soud, H. M. and D. J. Stuehr (1993):

Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer.

Proc Natl Acad Sci U S A 90: 10769-10772. DOI: 10.1073/pnas.90.22.10769.

Agostoni, A., E. ygoren-Pursun, K. E. Binkley, A. Blanch, K. Bork, L. Bouillet, C. Bucher, A. J. Castaldo, M. Cicardi, A. E. Davis, C. C. De, C. Drouet, C. Duponchel, H. Farkas, K. Fay, B. Fekete, B. Fischer, L. Fontana, G. Fust, R. Giacomelli, A. Groner, C. E. Hack, G. Harmat, J. Jakenfelds, M. Juers, L. Kalmar, P. N. Kaposi, I. Karadi, A. Kitzinger, T. Kollar, W. Kreuz, P. Lakatos, H. J. Longhurst, M. Lopez-Trascasa, I. Martinez-Saguer, N. Monnier, I. Nagy, E. Nemeth, E. W. Nielsen, J. H. Nuijens, C. O'grady, E. Pappalardo, V. Penna, C. Perricone, R. Perricone, U. Rauch, O. Roche, E. Rusicke, P. J. Spath, G. Szendei, E. Takacs, A. Tordai, L. Truedsson, L. Varga, B. Visy, K. Williams, A. Zanichelli and L. Zingale (2004):

Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond.

J. Allergy Clin. Immunol 114: S51-131.

Aisaka, K., S. Gross, O. W. Griffith and R. Levi (1989):

N^G-Methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo?

Biochem. Biophys. Res. Commun 160: 881-886.

Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001):

Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.

Biochem J 357: 593-615. DOI: 10.1042/0264-6021:3570593.

Andrade, S. O., C. R. Diniz, E. Rocha and M. Silva (1953):

Assay of purification of bradykinin by chromatography.

Arch Int Pharmacodyn Ther 95: 100-122.

Ashman, D. F., R. Lipton, M. M. Melicow and T. D. Price (1963):

Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine.

Biochem Biophys Res Commun 11: 330-334.

Aszódi, A., A. Pfeifer, M. Ahmad, M. Glauner, X. H. Zhou, L. Ny, K. E. Andersson, B. Kehrel, S. Offermanns and R. Fässler (1999):

The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function.

Embo j 18: 37-48. DOI: 10.1093/emboj/18.1.37.

Barnett, D. J., J. McAninly and D. L. H. Williams (1994):

Transnitrosation between nitrosothiols and thiols.

J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 2: 1131-1133.

Bas, M., V. Adams, T. Suvorava, T. Niehues, T. K. Hoffmann and G. Kojda (2007):

Non-Allergic Angioedema. Role of bradykinin.

Allergy 62(8): 842-856.

Bas, M., J. Greve, K. Stelter, H. Bier, T. Stark, T. K. Hoffmann and G. Kojda (2010):

Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series.

Ann. Emerg. Med 56: 278-282.

Bas, M., J. Greve, K. Stelter, M. Havel, U. Strassen, N. Rotter, J. Veit, B. Schossow, A. Hapfelmeier, V. Kehl, G. Kojda and T. K. Hoffmann (2015):

A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema.

N Engl J Med 372: 418-425.

Bas, M., T. K. Hoffmann, H. Bier and G. Kojda (2005):

Increased C-reactive protein in ACE-inhibitor-induced angioedema.

Br. J Clin. Pharmacol 59: 233-238.

Bas, M., N. Kirchhartz, J. Hochfeld, C. Tullmann, S. Kumpf, T. Suvorava, M. Oppermann, D. Hafner, H. Bier, T. K. Hoffmann, V. Balz and G. Kojda (2008):

Potential role of vasomotor effects of fibrinogen in bradykinin-induced angioedema.

J. Allergy Clin. Immunol 121: 969-975.

Bas, M., G. Kojda, H. Bier and T. K. Hoffmann (2004):

Durch ACE-Hemmer induziertes Angioödem des Kopf-Hals-Bereichs. Eine Frage der Zeit?

HNO 52 (10): 886-890.

Bauer, K. A. (2006):

New anticoagulants.

Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 450-456. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.450.

Bawolak, M. T., S. Fortin, J. Bouthillier, A. Adam, L. Gera, R. Gaudreault and F. Marceau (2009):

Effects of inactivation-resistant agonists on the signalling, desensitization and down-regulation of bradykinin B(2) receptors.

Br. J. Pharmacol 158: 1375-1386.

Bawolak, M. T., L. Gera, G. Morissette, J. M. Stewart and F. Marceau (2007):

B-9972 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,Oic7,Igl8]-bradykinin) is an inactivation-resistant agonist of the bradykinin B2 receptor derived from the peptide antagonist B-9430 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,D-Igl7,Oic8]-bradykinin): pharmacologic profile and effective induction of receptor degradation.

J Pharmacol Exp Ther 323: 534-546. DOI: 10.1124/jpet.107.123422.

Baxter, G. F. (2004):

The natriuretic peptides.

Basic Res Cardiol 99: 71-75. DOI: 10.1007/s00395-004-0457-8.

Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996):

Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.

Am. J. Physiol 271: C1424-C1437.

Bennett, B. M., B. J. McDonald and M. J. St.James (1992):

Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate.

J. Pharmacol. Exp. Ther 261: 716-723.

Berg, T., O. A. Carretero, A. G. Scicli, B. Tilley and J. M. Stewart (1989):

Role of kinin in regulation of rat submandibular gland blood flow.

Hypertension 14: 73-80. DOI: 10.1161/01.hyp.14.1.73.

Bernstein, K. E., F. S. Ong, W. L. Blackwell, K. H. Shah, J. F. Giani, R. A. Gonzalez-Villalobos, X. Z. Shen, S. Fuchs and R. M. Touyz (2013):

A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme.

Pharmacol Rev 65: 1-46. DOI: 10.1124/pr.112.006809.

Biel, M. and S. Michalakis (2009):

Cyclic nucleotide-gated channels.

Handb Exp Pharmacol: 111-136. DOI: 10.1007/978-3-540-68964-5_7.

Bisha, M., V. T. Dao, E. Gholamreza-Fahimi, M. Vogt, M. van Zandvoort, S. Weber, M. Bas, F. Khosravani, G. Kojda and T. Suvorava (2018):

The role of bradykinin receptor type 2 in spontaneous extravasation in mice skin: implications for non-allergic angio-oedema.

Br J Pharmacol 175: 1607-1620. DOI: 10.1111/bph.14166.

Blaukat, A., P. Micke, I. Kalatskaya, A. Faussner and W. Muller-Esterl (2003):

Downregulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure.

Am. J Physiol Heart Circ. Physiol 284: H1909-H1916.

Böhme, G. A., C. Bon, M. Lemaire, M. Reibaud, O. Piot, J.-M. Stutzmann, A. Doble and J.-C. Blanchard (1993):

Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9191-9194.

Boissonnas, R. A., S. Guttmann, P. A. Jaquenoud, H. Konzett and E. Stuermer (1960):

Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin.

Experientia 16: 326. DOI: 10.1007/bf02157779.

Boissonnas, R. A., S. Guttmann, P. A. Jaquenoud, J. Pless and E. Sandrin (1963):

The synthesis of bradykinin and of related peptides.

Ann N Y Acad Sci 104: 5-14.

Bönner, G., S. Preis, U. Schunk, C. Toussaint and W. Kaufmann (1990):

Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans.

J Cardiovasc Pharmacol 15 Suppl 6: S46-56.

Bork, K., P. Staubach and J. Hardt (2008):

Treatment of skin swellings with C1-inhibitor concentrate in patients with hereditary angio-oedema.

Allergy 63: 751-757. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01577.x.

Bradford, M. M. (1976):

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem 72: 248-254.

Bredt, D. S., P. M. Hwang and S. H. Snyder (1990):

Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.

Nature 347: 768-770.

Brunner, K., A. Tortschanoff, B. Hemmens, P. J. Andrew, B. Mayer and A. J. Kungl (1998):

Sensitivity of flavin fluorescence dynamics in neuronal nitric oxide synthase to cofactor-induced conformational changes and dimerization.

Biochemistry 37: 17545-17553. DOI: 10.1021/bi981138l.

Buechler, W. A., M. Nakane and F. Murad (1991):

Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits.

Biochem. Biophys. Res. Commun 174: 351-357.

Buga, G. M., M. E. Gold, J. M. Fukuto and L. J. Ignarro (1991):

Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads.

Hypertension 17: 187-193.

Carbini, L. A., A. G. Scicli and O. A. Carretero (1993):

The molecular biology of the kallikrein-kinin system: III. The human kallikrein gene family and kallikrein substrate.

J Hypertens 11: 893-898. DOI: 10.1097/00004872-199309000-00002.

Carrier, G. O., L. C. Fuchs, A. P. Winecoff, A. D. Giulumian and R. E. White (1997):

Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels.

Am J Physiol 273: H76-84. DOI: 10.1152/ajpheart.1997.273.1.H76.

Cerra, M. C. and D. Pellegrino (2007):

Cardiovascular cGMP-generating systems in physiological and pathological conditions.

Curr Med Chem 14: 585-599. DOI: 10.2174/092986707780059715.

Chang, M. S., D. G. Lowe, M. Lewis, R. Hellmiss, E. Chen and D. V. Goeddel (1989):

Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases.

Nature 341: 68-72. DOI: 10.1038/341068a0.

Chao, A. C., F. J. de Sauvage, Y. J. Dong, J. A. Wagner, D. V. Goeddel and P. Gardner (1994):

Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase.

Embo j 13: 1065-1072.

Chao, J., L. Chao and H. S. Margolius (1984):

Isolation of tissue kallikrein in rat spleen by monoclonal antibody-affinity chromatography.

Biochim Biophys Acta 801: 244-249. DOI: 10.1016/0304-4165(84)90073-4.

Chao, J., L. Chao, C. C. Swain, J. Tsai and H. S. Margolius (1987):

Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary.

Endocrinology 120: 475-482. DOI: 10.1210/endo-120-2-475.

Chen, Z., J. Zhang and J. S. Stamler (2002):

Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99: 8306-8311.

Chinkers, M., D. L. Garbers, M. S. Chang, D. G. Lowe, H. M. Chin, D. V. Goeddel and S. Schulz (1989):

A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor.

Nature 338: 78-83. DOI: 10.1038/338078a0.

Chung, S.-J. and H.-L. Fung (1992):

A common enzyme may be responsible for the conversion of organic nitrates to nitric oxide in vascular microsomes.

Biochem. Biophys. Res. Commun 185: 932-937.

Cicardi, M., A. Banerji, F. Bracho, A. Malbran, B. Rosenkranz, M. Riedl, K. Bork, W. Lumry, W. Aberer, H. Bier, M. Bas, J. Greve, T. K. Hoffmann, H. Farkas, A. Reshef, B. Ritchie, W. Yang, J. Grabbe, S. Kivity, W. Kreuz, R. J. Levy, T. Luger, K. Obtulowicz, P. Schmid-Grendelmeier, C. Bull, B. Sitkauskiene, W. B. Smith, E. Toubi, S. Werner, S. Anne, J. Bjorkander, L. Bouillet, E. Cillari, D. Hurewitz, K. W. Jacobson, C. H. Katelaris, M. Maurer, H. Merk, J. A. Bernstein, C. Feighery, B. Floccard, G. Gleich, J. Hebert, M. Kaatz, P. Keith, C. H. Kirkpatrick, D. Langton, L. Martin, C. Pichler, D. Resnick, D. Wombolt, D. S. Fernandez Romero, A. Zanichelli, F. Arcoletto, J. Knolle, I. Kravec, L. Dong, J. Zimmermann, K. Rosen and W. T. Fan (2010):

Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema.

N. Engl. J. Med 363: 532-541.

Cicardi, M., L. C. Zingale, E. Pappalardo, A. Folcioni and A. Agostoni (2003):

Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies.

Medicine (Baltimore) 82: 274-281.

Clozel, M. (1991):

Mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelial function in hypertension.

Hypertension 18: 437-442. DOI: 10.1161/01.hyp.18.4_suppl.ii37.

Cocks, T. M., J. A. Angus, J. H. Campbell and G. R. Campbell (1985):

Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture.

J Cell Physiol 123: 310-320.

Cohen, H., J. B. Hunt, M. Dixit, S. Kanwar and H. C. Thomas (1993):

Decreased contact factor mediated fibrinolysis in cirrhosis.

Br. J. Haematol 85: 542-545.

Collier, J. and P. Vallance (1989):

Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems.

Trends Pharmacol Sci 10: 427-431. DOI: 10.1016/s0165-6147(89)80001-x.

Conti, M. and J. Beavo (2007):

Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling.

Annu Rev Biochem 76: 481-511. DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444.

Crane, B. R., A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Q. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr and J. A. Tainer (1998):

Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.

Science 279: 2121-2126.

Craven, K. B. and W. N. Zagotta (2006):

CNG and HCN channels: two peas, one pod.

Annu Rev Physiol 68: 375-401. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728.

Craven, P. A. and F. R. DeRubertis (1983):

Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide.

Biochim Biophys Acta 745: 310-321. DOI: 10.1016/0167-4838(83)90063-8.

Croom, K. F. and M. P. Curran (2008):

Sildenafil: a review of its use in pulmonary arterial hypertension.

Drugs 68: 383-397. DOI: 10.2165/00003495-200868030-00009.

Cugno, M., A. Zanichelli, A. G. Bellatorre, S. Griffini and M. Cicardi (2009):

Plasma biomarkers of acute attacks in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency.

Allergy 64: 254-257. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01859.x.

Curran, R. D., T. R. Billiar, D. J. Stuehr, K. Hofmann and R. L. Simmons (1989):

Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells.

J Exp Med. Nov 1;170(5):1769-74.

Currie, M. G., K. F. Fok, J. Kato, R. J. Moore, F. K. Hamra, K. L. Duffin and C. E. Smith (1992):

Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 947-951.

Danielsson, A., T. K. Nilsson and P. Uddenfeldt (1990):

Alterations in C1 inhibitor and clotting factor concentrations in primary biliary cirrhosis and other chronic liver diseases.

Scand. J. Gastroenterol 25: 149-154.

Dao, V. T., S. Medini, M. Bisha, V. Balz, T. Suvorava, M. Bas and G. Kojda (2016):

Nitric oxide up-regulates endothelial expression of angiotensin II type 2 receptors.

Biochem. Pharmacol 112:24-36. doi: 10.1016/j.bcp.2016.05.011. Epub; 2016 May 26.: 24-36.

de Sauvage, F. J., T. R. Camerato and D. V. Goeddel (1991):

Primary structure and functional expression of the human receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin.

J Biol Chem 266: 17912-17918.

DeLa Cadena, R. A., K. J. Laskin, R. A. Pixley, R. B. Sartor, J. H. Schwab, N. Back, G. S. Bedi, R. S. Fisher and R. W. Colman (1991):

Role of kallikrein-kinin system in pathogenesis of bacterial cell wall-induced inflammation.

Am J Physiol 260: G213-219. DOI: 10.1152/ajpgi.1991.260.2.G213.

Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse and A. M. Zeiher (1999):

Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.

Nature 399: 601-605.

Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller and T. V. Kurzchalia (2001):

Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice.

Science 293: 2449-2452.

Driscoll, J. A. and M. M. Chakinala (2008):

Medical therapy for pulmonary arterial hypertension.

Expert Opin Pharmacother 9: 65-81. DOI: 10.1517/14656566.9.1.65.

Dwyer, M. A., D. S. Bredt and S. H. Snyder (1991):

Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-nitroarginine in brain in vitro and in vivo.

Biochem Biophys Res Commun. May 15;176(3):1136-41.

Eckly-Michel, A., V. Martin and C. Lugnier (1997):

Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation.

Br J Pharmacol 122: 158-164. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701339.

el Karib, A. O., J. Sheng, A. L. Betz and R. L. Malvin (1993):

The central effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N omega-nitro-L-arginine) on blood pressure and plasma renin.

Clin Exp Hypertens 15: 819-832. DOI: 10.3109/10641969309041644.

Elliott, D. F., E. W. Horton and G. P. Lewis (1960a):

Actions of pure bradykinin.

J Physiol 153: 473-480. DOI: 10.1113/jphysiol.1960.sp006548.

Elliott, D. F., E. W. Horton and G. P. Lewis (1961):

The isolation of bradykinin, a plasma kinin from ox blood.

Biochem J 78: 60-65. DOI: 10.1042/bj0780060.

Elliott, D. F., G. P. Lewis and E. W. Horton (1960b):

The structure of bradykinin — A plasma kinin from ox blood.

Biochemical and Biophysical Research Communications 3: 87-91. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(60\)90109-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(60)90109-1).

Endo, S., M. Suzuki, M. Sumi, A. C. Nairn, R. Morita, K. Yamakawa, P. Greengard and M. Ito (1999):

Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 96: 2467-2472. DOI: 10.1073/pnas.96.5.2467.

Erdős, E. G. and R. A. Skidgel (1988):

Human neutral endopeptidase 24.11 (NEP, enkephalinase); function, distribution and release.

Adv Exp Med Biol 240: 13-21. DOI: 10.1007/978-1-4613-1057-0_2.

Erdos, E. G. and E. M. Sloane (1962):

An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins.

Biochem Pharmacol 11: 585-592. DOI: 10.1016/0006-2952(62)90119-3.

Evgenov, O. V., P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Haskó, H. H. Schmidt and J. P. Stasch (2006):

NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential.

Nat Rev Drug Discov 5: 755-768. DOI: 10.1038/nrd2038.

Fang, C. and A. H. Schmaier (2020):

Novel anti-thrombotic mechanisms mediated by Mas receptor as result of balanced activities between the kallikrein/kinin and the renin-angiotensin systems.

Pharmacol Res 160: 105096. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105096.

Fang, C., E. Stavrou, A. A. Schmaier, N. Grobe, M. Morris, A. Chen, M. T. Nieman, G. N. Adams, G. LaRusch, Y. Zhou, M. L. Bilodeau, F. Mahdi, M. Warnock and A. H. Schmaier (2013):

Angiotensin 1-7 and Mas decrease thrombosis in Bdkrb2^{-/-} mice by increasing NO and prostacyclin to reduce platelet spreading and glycoprotein VI activation.

Blood 121: 3023-3032. DOI: 10.1182/blood-2012-09-459156.

Faussner, A., J. M. Bathon and D. Proud (1999):

Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation.

Immunopharmacology 45: 13-20.

Faussner, A., D. Proud, M. Towns and J. M. Bathon (1998):

Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction.

J Biol Chem 273: 2617-2623.

Fehsel, K., A. Jalowy, S. Qi, V. Burkart, B. Hartmann and H. Kolb (1993):

Islet Cell DNA Is a Target of Inflammatory Attack by Nitric Oxide.

Diabetes 42: 496-500. DOI: 10.2337/diab.42.3.496.

Fischmeister, R., L. Castro, A. Abi-Gerges, F. Rochais and G. Vandecasteele (2005):

Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels.

Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 142: 136-143. DOI: 10.1016/j.cbpb.2005.04.012.

Fleming, I. and R. Busse (2003):

Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.

Am. J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol 284: R1-12.

Foerster, J., C. Harteneck, J. Malkewitz, G. Schultz and D. Koesling (1996):

A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of α_1 and β_1 subunits.

Eur. J. Biochem 240: 380-386.

Förstermann, U. (2000):

Regulation of Nitric Oxide Synthase Expression and Activity.

Nitric Oxide. B. Mayer. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 71-91.

Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath and H. Kleinert (1994):

Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.

Hypertension 23: 1121-1131. DOI: 10.1161/01.hyp.23.6.1121.

Förstermann, U., L. D. Gorsky, J. S. Pollock, K. Ishii, H. H. Schmidt, M. Heller and F. Murad (1990):

Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin.

Mol Pharmacol 38: 7-13.

Förstermann, U., K. Ishii, L. D. Gorsky and F. Murad (1989):

The cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells synthesizes an EDRF-like substance that relaxes rabbit aorta.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 340: 771-774. DOI: 10.1007/bf00169689.

Förstermann, U. and T. Münzel (2006):

Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace.

Circulation 113: 1708-1714. DOI: 10.1161/circulationaha.105.602532.

Förstermann, U., H. H. H. W. Schmidt, J. S. Pollock, H. Sheng, J. A. Mitchell, T. D. Warner, M. Nakane and F. Murad (1991):

Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types.

Biochem. Pharmacol 42: 1849-1857.

Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012):

Nitric oxide synthases: regulation and function.

Eur. Heart J 33: 829-837d.

Forte, L. R., P. K. Thorne, S. L. Eber, W. J. Krause, R. H. Freeman, S. H. Francis and J. D. Corbin (1992):

Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP.

Am J Physiol 263: C607-615. DOI: 10.1152/ajpcell.1992.263.3.C607.

Francis, S. H., J. D. Corbin and E. Bischoff (2009):

Cyclic GMP-hydrolyzing phosphodiesterases.

Handb Exp Pharmacol: 367-408. DOI: 10.1007/978-3-540-68964-5_16.

Friebe, A., E. Mergia, O. Dangel, A. Lange and D. Koesling (2007):

Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.

Proc Natl Acad Sci U S A 104: 7699-7704. DOI: 10.1073/pnas.0609778104.

Friehe, H. and P. Ney (1997):

Pharmacological and toxicological studies of the new angiotensin converting enzyme inhibitor moexipril hydrochloride.

Arzneimittelforschung 47: 132-144.

Fülle, H. J., R. Vassar, D. C. Foster, R. B. Yang, R. Axel and D. L. Garbers (1995):

A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons.

Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3571-3575. DOI: 10.1073/pnas.92.8.3571.

Fulton, D., J. P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos and W. C. Sessa (1999):

Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt.
Nature 399: 597-601.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980):

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature 288: 373-376.

Furchgott, R. J. R. P., New York (1988):

Vasodilation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium. 401-414.

Gainer, J. V., J. D. Morrow, A. Loveland, D. J. King and N. J. Brown (1998):

Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects.

N. Engl. J. Med 339: 1285-1292.

García-Cardeña, G., R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos and W. C. Sessa (1998):

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

Garg, U. C. and A. Hassid (1989):

Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generating vasodilators.
Am J Physiol 257: F60-66. DOI: 10.1152/ajprenal.1989.257.1.F60.

Garthwaite, J., S. L. Charles and R. Chess-Williams (1988):

Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.

Nature 336: 385-388. DOI: 10.1038/336385a0.

George, W. J., J. B. Polson, A. G. O'Toole and N. D. Goldberg (1970):

Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine.
Proc Natl Acad Sci U S A 66: 398-403.

Gerzer, R., E. Böhme, F. Hofmann and G. Schultz (1981a):

Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper.
FEBS Lett 132: 71-74. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80429-2.

Gerzer, R., F. Hofman and G. Schultz (1981b):

Purification of a soluble, sodium nitroprusside stimulated guanylate cyclase from bovine lung.
Eur. J. Biochem 116: 479-486.

Gerzer, R., E. W. Radany and D. L. Garbers (1982):

The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase.
Biochem Biophys Res Commun 108: 678-686. DOI: 10.1016/0006-291x(82)90883-x.

Gewaltig, M. T. and G. Kojda (2002):

Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential.
Cardiovasc. Res 55: 250-260.

Ghiadoni, L., S. Taddei and A. Virdis (2012):

Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach.
Curr. Vasc. Pharmacol 10: 42-60.

Gholamreza-Fahimi, E., M. Bisha, J. Hahn, U. Straßén, M. Krybus, F. Khosravani, T. K. Hoffmann, T. Hohlfeld, J. Greve, M. Bas, S. Twarock and G. Kojda (2020):

Cyclooxygenase activity in bradykinin-induced dermal extravasation. A study in mice and humans.
Biomed Pharmacother 123: 109797. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109797.

Gibson, A., S. Mirzazadeh, A. J. Hobbs and P. K. Moore (1990):

L-NG-monomethyl arginine and L-NG-nitro arginine inhibit non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of the mouse anococcygeus muscle.
Br J Pharmacol. Mar;99(3):602-6.

Gödecke, A., U. Decking, Z. Ding, J. Hirchenhain, H. J. Bidmon, S. Godecke and J. Schrader (1998):

Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice.
Circ. Res 82: 186-194.

Green, S. J., S. Mellouk, S. L. Hoffman, M. S. Meltzer and C. A. Nacy (1990):

Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes.
Immunol Lett 25: 15-19. DOI: 10.1016/0165-2478(90)90083-3.

Gryglewski, R. J., S. Moncada and R. M. Palmer (1986):

Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells.
Br J Pharmacol 87: 685-694.

Gu, L. and R. G. J. I. J. o. P. Strickley (1990):

A profound solvent effect on the diketopiperazine formation of the new dipeptide angiotensin-converting enzyme inhibitor, moexipril.

60: 99-107.

Hamet, P., J. Tremblay, S. C. Pang, R. Garcia, G. Thibault, J. Gutkowska, M. Cantin and J. Genest (1984):

Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP.

Biochem Biophys Res Commun 123: 515-527. DOI: 10.1016/0006-291x(84)90260-2.

Hamra, F. K., L. R. Forte, S. L. Eber, N. V. Pidhorodeckyj, W. J. Krause, R. H. Freeman, D. T. Chin, J. A. Tompkins, K. F. Fok, C. E. Smith, K. L. Duffin, N. R. Siegel and M. G. Currie (1993):

Uroguanylin: Structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10464-10468.

Hardman, J. G. and E. W. Sutherland (1965):

A cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase from heart with specificity for uridine 3',5'-phosphate.

J Biol Chem 240: 3704-3705.

Hardman, J. G. and E. W. Sutherland (1969):

Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate.

J Biol Chem 244: 6363-6370.

Harteneck, C., D. Koesling, A. Söling, G. Schultz and E. Böhme (1990):

Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits.

FEBS Lett 272: 221-223. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80489-6.

Hashimoto, K., H. Hamamoto, Y. Honda, M. Hirose, S. Furukawa and E. Kimura (1978):

Changes in components of kinin system and hemodynamics in acute myocardial infarction.

Am Heart J 95: 619-626. DOI: 10.1016/0002-8703(78)90304-6.

Hecquet, C., F. Tan, B. M. Marcic and E. G. Erdös (2000):

Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases.

Mol Pharmacol 58: 828-836. DOI: 10.1124/mol.58.4.828.

Hellebrand, M. C., G. Kojda, T. K. Hoffmann and M. Bas (2005):

[Angioedema due to ACE inhibitors and AT(1) receptor antagonists.].

Hautarzt.

Higgins, M. K., D. Weitz, T. Warne, G. F. Schertler and U. B. Kaupp (2002):

Molecular architecture of a retinal cGMP-gated channel: the arrangement of the cytoplasmic domains.

Embo j 21: 2087-2094. DOI: 10.1093/emboj/21.9.2087.

Hille, R., J. S. Olson and G. Palmer (1979):

Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin.

J Biol Chem 254: 12110-12120.

Hintze, T. H. and S. F. Vatner (1984):

Reactive dilation of large coronary arteries in conscious dogs.

Circ Res 54: 50-57. DOI: 10.1161/01.res.54.1.50.

Hofmann, F., M. Biel and U. B. Kaupp (2005):

International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels.

Pharmacol Rev 57: 455-462. DOI: 10.1124/pr.57.4.8.

Hölscher, C. and S. P. Rose (1992):

An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick.

Neurosci Lett 145: 165-167. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90012-v.

Holtz, J., U. Förstermann, U. Pohl, M. Giesler and E. Bassenge (1984):

Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition.

J Cardiovasc Pharmacol 6: 1161-1169.

Huang, P. L., T. M. Dawson, D. S. Bredt, S. H. Snyder and M. C. Fishman (1993):

Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene.

Cell 75: 1273-1286.

Huang, P. L., Z. H. Huang, H. Mashimo, K. D. Bloch, M. A. Moskowitz, J. A. Bevan and M. C. Fishman (1995):

Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase.

Nature 377: 239-242.

Huang, Z., P. L. Huang, N. Panahian, T. Dalkara, M. C. Fishman and M. A. Moskowitz (1994):

Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase.

Science 265: 1883-1885.

Hull, S. S., Jr., L. Kaiser, M. D. Jaffe and H. V. Sparks, Jr. (1986):

Endothelium-dependent flow-induced dilation of canine femoral and saphenous arteries.

Blood Vessels 23: 183-198. DOI: 10.1159/000158641.

Ibanez, B., S. James, S. Agewall, M. J. Antunes, C. Bucciarelli-Ducci, H. Bueno, A. L. P. Caforio, F. Crea, J. A. Goudevenos, S. Halvorsen, G. Hindricks, A. Kastrati, M. J. Lenzen, E. Prescott, M. Roffi, M. Valgimigli, C. Varenhorst, P. Vranckx and P. Widimsky (2018):

2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC).

Eur Heart J 39: 119-177. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx393.

Ignarro, L. J. (1989):

Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein.

Circ. Res 65: 1-21.

Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri (1987):

Endothelium derived relaxing factor produced and released from arteries and veins is nitric oxide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9265-9269.

Ignarro, L. J., H. Lipton, J. C. Edwards, W. H. Barricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz and C. A. Gruetter (1981):

Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates.

J. Pharmacol. Exp. Ther 218: 739-749.

Ignarro, L. J., K. S. Wood and M. S. Wolin (1982):

Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 79: 2870-2873.

Ignarro, L. J. M. o. V. (1988):

Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical.

427.

Ikawa, T., A. Kakegawa, T. Nagano, H. Ando, Y. Yamakoshi, T. Tanabe, J. P. Simmer, C. C. Hu, M. Fukae and S. Oida (2005):

Porcine amelogenin is expressed from the X and Y chromosomes.

J Dent Res 84: 144-148. DOI: 10.1177/154405910508400207.

Ingram, S. L. and J. T. Williams (1996):

Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons.

J Physiol 492 (Pt 1): 97-106. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021292.

Ishikawa, E., S. Ishikawa, J. W. Davis and E. W. Sutherland (1969):

Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine.

J Biol Chem 244: 6371-6376.

Iwamoto, K., S. Morioke, Y. Yanase, K. Uchida and M. Hide (2014):

Tissue factor expression on the surface of monocytes from a patient with hereditary angioedema.

J Dermatol 41: 929-932. DOI: 10.1111/1346-8138.12610.

Iyengar, R., D. J. Stuehr and M. A. Marletta (1987):

Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst.

Proc Natl Acad Sci U S A 84: 6369-6373.

Jacobsen, S. (1966a):

Separation of 2 different substrates for plasma kinin-forming enzymes.

Nature 210: 98-99. DOI: 10.1038/210098a0.

Jacobsen, S. (1966b):

Substrates for plasma kinin-forming enzymes in human, dog and rabbit plasmas.

Br J Pharmacol Chemother 26: 403-411. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1966.tb01920.x.

Jarchau, T., C. Häusler, T. Markert, D. Pöhler, J. Vanderkerckhove, H. R. De Jonge, S. M. Lohmann and U. Walter (1994):

Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II.

Proc Natl Acad Sci U S A 91: 9426-9430. DOI: 10.1073/pnas.91.20.9426.

Jarchau, T., T. Mund, M. Reinhard and U. Walter (1998):

Purification and assays of vasodilator-stimulated phosphoprotein.

Methods Enzymol. 1998;298:103-13.

Jiang, H., J. L. Colbran, S. H. Francis and J. D. Corbin (1992):

Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries.

J Biol Chem 267: 1015-1019.

Jouquey, S., N. L. Brown, J. Fichelle and M. Worcel (1988):

Comparison of the effects of the ace inhibitors trandolapril and enalapril on phlogogen induced foot pad oedema in the rat.

Agents Actions 24: 297-302. DOI: 10.1007/bf02028286.

Kaiser, L., S. S. Hull, Jr. and H. V. Sparks, Jr. (1986):

Methylene blue and ETYA block flow-dependent dilation in canine femoral artery.

Am J Physiol 250: H974-981. DOI: 10.1152/ajpheart.1986.250.6.H974.

Kalatskaya, I., S. Schussler, C. Seidl, M. Jochum and A. Faussner (2006):

C-terminal fusion of eGFP to the bradykinin B2 receptor strongly affects down-regulation but not receptor internalization or signaling.

Biol Chem 387: 603-610. DOI: 10.1515/bc.2006.077.

Kamisaki, Y., S. Saheki, M. Nakane, J. A. Palmieri, T. Kuno, B. Y. Chang, S. A. Waldman and F. Murad (1986):

Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer.

J Biol Chem 261: 7236-7241.

Kaplan, A. P. and K. Joseph (2014):

Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway.

Adv. Immunol 121:41-89. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00002-7.: 41-89.

Kato, T., T. Nagatsu, K. Fukasawa, M. Harada, I. Nagatsu and S. Sakakibara (1978):

Successive cleavage of N-terminal Arg1--Pro2 and Lys3-Pro4 from substance P but no release of Arg1-Pro2 from bradykinin, by X-Pro dipeptidyl-aminopeptidase.

Biochim Biophys Acta 525: 417-422. DOI: 10.1016/0005-2744(78)90237-1.

Kaupp, U. B. and R. Seifert (2002):

Cyclic nucleotide-gated ion channels.

Physiol Rev 82: 769-824. DOI: 10.1152/physrev.00008.2002.

Kempe, S., G. Fois, C. Brunner, T. K. Hoffmann, J. Hahn and J. Greve (2020):

Bradykinin signaling regulates solute permeability and cellular junction organization in lymphatic endothelial cells.

Microcirculation 27: e12592. DOI: 10.1111/micc.12592.

Khosravani, F., T. Suvorava, V. T. Dao, N. Brockmann, O. Kocgirli, F. F. Herbst, S. Valcaccia, M. U. Kassack, M. Bas and G. Kojda (2015):

Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH.

Allergy 70: 285-294.

Kimura, M., R. P. White, E. W. Wolf and J. T. Robertson (1998):

Responses of human basilar and other isolated arteries to novel nitric oxide donors.

J Cardiovasc Pharmacol 32: 695-701.

Klatt, P., S. Pfeiffer, B. M. List, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bächinger, E. R. Werner, K. Schmidt and B. Mayer (1996):

Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin.

J. Biol. Chem 271: 7336-7342.

Kleschyov, A. L., M. Oelze, A. Daiber, Y. Huang, H. Mollnau, E. Schulz, K. Sydow, B. Fichtlscherer, A. Mulsch and T. Munzel (2003):

Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin?

Circ. Res 93: e104-e112.

Kluft, C., G. Dooijewaard and J. J. Emeis (1987):

Role of the contact system in fibrinolysis.

Semin Thromb Hemost 13: 50-68. DOI: 10.1055/s-2007-1003475.

Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. Palmer and S. Moncada (1989):

Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase.

Proc Natl Acad Sci U S A 86: 5159-5162. DOI: 10.1073/pnas.86.13.5159.

Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. Palmer and S. Moncada (1990):

Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain.

Biochem J. Jul 1;269(1):207-10.

Kobayashi, Y. and K. Hattori (1990):

Nitroarginine inhibits endothelium-derived relaxation.

Jpn J Pharmacol. Jan;52(1):167-9.

Kobayashi, Y., K. Ikeda, K. Shinozuka, Y. Nara, Y. Yamori and K. Hattori (1991):

L-nitroarginine increases blood pressure in the rat.

Clin Exp Pharmacol Physiol 18: 397-399.

Kojda, G., Y. C. Cheng, J. Burchfield and D. G. Harrison (2001):

Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene.

Circulation 103: 2839-2844.

Kojda, G., A. Hacker and E. Noack (1998a):

Effects of non-intermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and vascular superoxide production.

Eur. J. Pharmacol 355: 23-31.

Kojda, G. and D. G. Harrison (1999):

Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure.

Cardiovasc. Res 43: 562-571.

Kojda, G. and K. Kottenberg (1999):

Regulation of basal myocardial function by NO.

Cardiovasc. Res 41: 514-523.

Kojda, G., K. Kottenberg, P. Nix, K. D. Schlüter, H. M. Piper and E. Noack (1996):

Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes.

Circ. Res 78: 91-101.

Kojda, G., J. B. Laursen, S. Ramasamy, J. D. Kent, S. Kurz, J. Burchfield, E. G. Shesely and D. G. Harrison (1999):

Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control.

Cardiovasc. Res 42: 206-213.

Kojda, G., M. Patzner, A. Hacker and E. Noack (1998b):

Nitric oxide inhibits vascular bioactivation of glyceryl trinitrate. A novel mechanism to explain preferential venodilation of organic nitrates.

Mol. Pharmacol 53: 547-554.

Komalavilas, P. and T. M. Lincoln (1996):

Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta.

J Biol Chem 271: 21933-21938. DOI: 10.1074/jbc.271.36.21933.

Kröncke, K. D., H. H. Brenner, M. L. Rodriguez, K. Etzkorn, E. Noack, H. Kolb and V. Kolb-Bachofen (1993):

Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide.

Biochimica et Biophysica Acta: BXD61294-BXD61294.

Kröncke, K. D., V. Kolb-Bachofen, B. Berschick, V. Burkart and H. Kolb (1991):

Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation.

Biochem Biophys Res Commun 175: 752-758. DOI: 10.1016/0006-291x(91)91630-u.

Krupinski, J., F. Coussen, H. A. Bakalyar, W. J. Tang, P. G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R. R. Reed and A. G. Gilman (1989):

Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure.

Science 244: 1558-1564. DOI: 10.1126/science.2472670.

Kuoppala, A., N. Shiota, J. O. Kokkonen, I. Liesmaa, K. Kostner, M. Mayranpaa, P. T. Kovanen and K. A. Lindstedt (2002):

Down-regulation of cardioprotective bradykinin type-2 receptors in the left ventricle of patients with end-stage heart failure.

J Am Coll Cardiol 40: 119-125. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)01928-9.

Kurihara, N., M. E. Alfie, D. H. Sigmon, N. E. Rhaleb, E. G. Shesely and O. A. Carretero (1998):

Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice.

Hypertension. Nov;32(5):856-61.

Laemmli, U. K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227: 680-685.

Laney, D. W., Jr., J. A. Bezerra, J. L. Kosiba, S. J. Degen and M. B. Cohen (1994):

Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver.

Am J Physiol 266: G899-906. DOI: 10.1152/ajpgi.1994.266.5.G899.

Lange, M., P. Enkhbaatar, Y. Nakano and D. L. Traber (2009):

Role of nitric oxide in shock: the large animal perspective.

Front Biosci (Landmark Ed) 14: 1979-1989. DOI: 10.2741/3357.

Lauer, N., T. Suvorava, U. Rütger, R. Jacob, A. Meyer, D. G. Harrison and G. Kojda (2005):

Critical Involvement of Hydrogen Peroxide In Exercise-Induced Upregulation Of Endothelial NO-Synthase.

Cardiovasc. Res 65(1): 254-262.

Laursen, J. B., M. Somers, S. Kurz, L. McCann, A. Warnholtz, B. A. Freeman, M. Tarpey, T. Fukui and D. G. Harrison (2001):

Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin.

Circulation 103: 1282-1288.

Leroy, J., A. Abi-Gerges, V. O. Nikolaev, W. Richter, P. Lechêne, J. L. Mazet, M. Conti, R. Fischmeister and G. Vandecasteele (2008):

Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca²⁺ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases.

Circ Res 102: 1091-1100. DOI: 10.1161/circresaha.107.167817.

Li, Z. and M. F. Goy (1993):

Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA.

Am J Physiol 265: G394-402. DOI: 10.1152/ajpgi.1993.265.2.G394.

List, B. M., B. Klösch, C. Völker, A. C. F. Gorren, W. C. Sessa, E. R. Werner, W. R. Kukovetz, K. Schmidt and B. Mayer (1997):

Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: Tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization.

Biochem. J 323: 159-165.

Liu, Y. H., J. Xu, X. P. Yang, F. Yang, E. Shesely and O. A. Carretero (2002):

Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure.

Hypertension 39: 375-381. DOI: 10.1161/hy02t2.102796.

Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter and H. R. De Jonge (1997):

Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases.

Trends Biochem Sci 22: 307-312. DOI: 10.1016/s0968-0004(97)01086-4.

Loke, K. E., C. M. Curran, E. J. Messina, S. K. Laycock, E. G. Shesely, O. A. Carretero and T. H. Hintze (1999):

Role of nitric oxide in the control of cardiac oxygen consumption in B(2)-kinin receptor knockout mice.

Hypertension 34: 563-567. DOI: 10.1161/01.hyp.34.4.563.

Longhurst, H. J. and K. Bork (2006):

Hereditary angioedema: causes, manifestations and treatment.

Br J Hosp Med (Lond) 67: 654-657. DOI: 10.12968/hmed.2006.67.12.22439.

Lowe, D. G., M. S. Chang, R. Hellmiss, E. Chen, S. Singh, D. L. Garbers and D. V. Goeddel (1989):

Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction.

Embo j 8: 1377-1384.

Lucas, K. A., G. M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Schulz, K. P. Chepenik and S. A. Waldman (2000):

Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.

Pharmacol. Rev 52: 375-414.

Lukowski, R., S. D. Rybalkin, F. Loga, V. Leiss, J. A. Beavo and F. Hofmann (2010):

Cardiac hypertrophy is not amplified by deletion of cGMP-dependent protein kinase I in cardiomyocytes.

Proc Natl Acad Sci U S A 107: 5646-5651. DOI: 10.1073/pnas.1001360107.

MacMicking, J. D., C. Nathan, G. Hom, N. Chartrain, D. S. Fletcher, M. Trumbauer, K. Stevens, Q. Xie, K. Sokol, N. Hutchinson, H. Chen and J. S. Mudgett (1995):

Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase.

Cell 81: 641-650.

Maizel, J. V., Jr., D. F. Summers and M. D. Scharff (1970):

SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells.

J. Cell Physiol 76: 273-287.

Malecot, C. O., D. M. Bers and B. G. Katzung (1986):

Biphasic contractions induced by milrinone at low temperature in ferret ventricular muscle: role of the sarcoplasmic reticulum and transmembrane calcium influx.

Circ Res 59: 151-162. DOI: 10.1161/01.res.59.2.151.

Malinski, T. and Z. Taha (1992):

Nitric oxide release from a single cell measured *in situ* by a porphyrinic-based microsensor.

Nature 358: 676-678.

Mancia, G., R. Fagard, K. Narkiewicz, J. Redon, A. Zanchetti, M. Bohm, T. Christiaens, R. Cifkova, G. De Backer, A. Dominiczak, M. Galderisi, D. E. Grobbee, T. Jaarsma, P. Kirchhof, S. E. Kjeldsen, S. Laurent, A. J. Manolis, P. M. Nilsson, L. M. Ruilope, R. E. Schmieder, P. A. Sirnes, P. Sleight, M. Viigimaa, B. Waeber, F. Zannad, J. Redon, A. Dominiczak, K. Narkiewicz, P. M. Nilsson, M. Burnier, M. Viigimaa, E. Ambrosioni, M. Caulfield, A. Coca, M. H. Olsen, R. E. Schmieder, C. Tsioufis, P. van de Borne, J. L. Zamorano, S. Achenbach, H. Baumgartner, J. J. Bax, H. Bueno, V. Dean, C. Deaton, C. Erol, R. Fagard, R. Ferrari, D. Hasdai, A. W. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, P. A. Sirnes, J. L. Tamargo, M. Tendera, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, D. L. Clement, A. Coca, T. C. Gillebert, M. Tendera, E. A. Rosei, E. Ambrosioni, S. D. Anker, J. Bauersachs, J. B. Hitij, M. Caulfield, M. De Buyzere, S. De Geest, G. A. Derumeaux, S. Erdine, C. Farsang, C. Funck-Brentano, V. Gerc, G. Germano, S. Gielen, H. Haller, A. W. Hoes, J. Jordan, T. Kahan, M. Komajda, D. Lovic, H. Mahrholdt, M. H. Olsen, J. Ostergren, G. Parati, J. Perk, J. Polonia, B. A. Popescu, Z. Reiner, L. Ryden, Y. Sirenko, A. Stanton, H. Struijker-Boudier, C. Tsioufis, P. van de Borne, C. Vlachopoulos, M. Volpe and D. A. Wood (2013):

2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).

Eur Heart J 34: 2159-2219. DOI: 10.1093/eurheartj/eh151.

Markovic, S. N., D. J. Inwards, E. A. Frigas and R. P. Phyliky (2000):

Acquired C1 esterase inhibitor deficiency.

Ann. Intern. Med 132: 144-150.

Martins, T. J., M. C. Mumby and J. A. Beavo (1982):

Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues.

J Biol Chem 257: 1973-1979.

Maurer, M., M. Bader, M. Bas, F. Bossi, M. Cicardi, M. Cugno, P. Howarth, A. Kaplan, G. Kojda, F. Leeb-Lundberg, J. Lotvall and M. Magerl (2011):

New topics in bradykinin research.

Allergy 66: 1397-1406.

Maurice, D. H. (2005):

Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system.

Front Biosci 10: 1221-1228. DOI: 10.2741/1614.

McAninly, J., D. L. H. Williams, S. Askew, A. R. Butler and C. Russell (1993):

Metal ion catalysis in nitrosothiol (RSNO) decomposition.

J. Chem. Soc. , Chem. Commun: 1758,-11759.

McCabe, T. J., D. Fulton, L. J. Roman and W. C. Sessa (2000):

Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation.

J Biol Chem 275: 6123-6128. DOI: 10.1074/jbc.275.9.6123.

McCall, T. B., N. K. Boughton-Smith, R. M. Palmer, B. J. Whittle and S. Moncada (1989):

Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion.

Biochem J. Jul 1;261(1):293-6.

McEachern, A. E., E. R. Shelton, S. Bhakta, R. Obernolte, C. Bach, P. Zuppan, J. Fujisaki, R. W. Aldrich and K. Jarnagin (1991):

Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88: 7724-7728.

Melikian, N., M. D. Seddon, B. Casadei, P. J. Chowienczyk and A. M. Shah (2009):

Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation.

Trends Cardiovasc Med 19: 256-262. DOI: 10.1016/j.tcm.2010.02.007.

Menniti, F. S., W. S. Faraci and C. J. Schmidt (2006):

Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development.

Nat Rev Drug Discov 5: 660-670. DOI: 10.1038/nrd2058.

Milstien, S. and Z. Katusic (1999):

Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function.

Biochem Biophys Res Commun 263: 681-684. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1422.

Mohan, P., D. L. Brutsaert, W. J. Paulus and S. U. Sys (1996):

Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP.

Circulation 93: 1223-1229.

Mombouli, J. V., S. Illiano, T. Nagao, T. Scott-Burden and P. M. Vanhoutte (1992):

Potentialiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors.

Circ Res 71: 137-144. DOI: 10.1161/01.res.71.1.137.

Moncada, S. and A. Higgs (1993):

Mechanisms of disease: The L-arginine-nitric oxide pathway.

N. Engl. J. Med 329: 2002-2012.

Moncada, S. and E. A. Higgs (1991):

Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance.

Eur. J. Clin. Invest 21: 361-374.

Montalescot, G., U. Sechtem, S. Achenbach, F. Andreotti, C. Arden, A. Budaj, R. Bugiardini, F. Crea, T. Cuisset, C. Di Mario, J. R. Ferreira, B. J. Gersh, A. K. Gitt, J. S. Hulot, N. Marx, L. H. Opie, M. Pfisterer, E. Prescott, F. Ruschitzka, M. Sabate, R. Senior, D. P. Taggart, E. E. van der Wall, C. J. Vrints, J. L. Zamorano, S. Achenbach, H. Baumgartner, J. J. Bax, H. Bueno, V. Dean, C. Deaton, C. Erol, R. Fagard, R. Ferrari, D. Hasdai, A. W. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, P. Lancellotti, A. Linhart, P. Nihoyannopoulos, M. F. Piepoli, P. Ponikowski, P. A. Sirnes, J. L. Tamargo, M. Tendera, A. Torbicki, W. Wijns, S. Windecker, J. Knuuti, M. Valgimigli, H. Bueno, M. J. Claeys, N. Donner-Banzhoff, C. Erol, H. Frank, C. Funck-Brentano, O. Gaemperli, J. R. Gonzalez-Juanatey, M. Hamilos, D. Hasdai, S. Husted, S. K. James, K. Kervinen, P. Kolh, S. D. Kristensen, P. Lancellotti, A. P. Maggioni, M. F. Piepoli, A. R. Pries, F. Romeo, L. Ryden, M. L. Simoons, P. A. Sirnes, P. G. Steg, A. Timmis, W. Wijns, S. Windecker, A. Yildirir and J. L. Zamorano (2013):

2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology.

Eur Heart J 34: 2949-3003. DOI: 10.1093/eurheartj/eh296.

Montfort, W. R., J. A. Wales and A. Weichsel (2017):

Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor.

Antioxid Redox Signal 26: 107-121. DOI: 10.1089/ars.2016.6693.

Mooradian, D. L., T. C. Hutsell and L. K. Keefer (1995):

Nitric oxide (NO) donor molecules: Effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro.

J. Cardiovasc. Pharmacol 25: 674-678.

Moore, P. K., P. Wallace, Z. Gaffen, S. L. Hart and R. C. Babbedge (1993):

Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7- nitro indazole and related indazoles: Antinociceptive and cardiovascular effects.

Br. J. Pharmacol 110: 219-224.

Moreira, C. R., A. H. Schmaier, F. Mahdi, G. da Motta, H. B. Nader and Z. Shariat-Madar (2002):

Identification of prolylcarboxypeptidase as the cell matrix-associated prekallikrein activator.

FEBS Lett 523: 167-170. DOI: 10.1016/s0014-5793(02)02980-0.

Moreno, H. J., K. Metz, A. C. Bento, E. Antunes, R. Zatz and G. de Nucci (1996):
Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease.
Basic Res Cardiol. May-Jun;91(3):248-55.

Morwood, K., D. Gillis, W. Smith and F. Kette (2005):
Aspirin-sensitive asthma.
Intern. Med. J 35: 240-246.

Mullenheim, J., S. Muller, U. Laber, V. Thamer, W. Meyer, E. Bassenge, B. Fink and G. Kojda (2001):
The effect of high-dose pentaerythritol tetranitrate on the development of nitrate tolerance in rabbits.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol 364: 269-275.

Mülsch, A. and R. Busse (1990):
N^G-nitro-L-arginine (N⁵-[imino(nitroamino)methyl]-L- ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 341: 143-147.

Mülsch, A., P. Mordvintcev, E. Bassenge, F. Jung, B. Clement and R. Busse (1995):
In vivo spin trapping of glyceryl trinitrate-derived nitric oxide in rabbit blood vessels and organs.
Circulation 92: 1876-1882.

Murrel, W. (1879):
Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris.
Lancet 1: 80-81.

Murthy, K. S. and G. M. Makhlouf (1995):
Interaction of cA-kinase and cG-kinase in mediating relaxation of dispersed smooth muscle cells.
Am J Physiol 268: C171-180. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.1.C171.

Nakane, M., H. H. Schmidt, J. S. Pollock, U. Förstermann and F. Murad (1993):
Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle.
FEBS Lett 316: 175-180. DOI: 10.1016/0014-5793(93)81210-q.

Nathan, C. and Q. Xie (1994):
Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls.
Cell 78: 915-918.

Nathan, C. F. and J. B. Hibbs, Jr. (1991):

Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity.

Curr Opin Immunol 3: 65-70. DOI: 10.1016/0952-7915(91)90079-g.

Netherton, S. J. and D. H. Maurice (2005):

Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis.

Mol Pharmacol 67: 263-272. DOI: 10.1124/mol.104.004853.

Ngo, M. L., F. Mahdi, D. Kolte and Z. Shariat-Madar (2009):

Upregulation of prolylcarboxypeptidase (PRCP) in lipopolysaccharide (LPS) treated endothelium promotes inflammation.

J Inflamm (Lond) 6: 3. DOI: 10.1186/1476-9255-6-3.

Noble, M. A., A. W. Munro, S. L. Rivers, L. Robledo, S. N. Daff, L. J. Yellowlees, T. Shimizu, I. Sagami, J. G. Guillemette and S. K. Chapman (1999):

Potentiometric analysis of the flavin cofactors of neuronal nitric oxide synthase.

Biochemistry 38: 16413-16418. DOI: 10.1021/bi992150w.

Noda, K., M. Sasaguri, M. Ideishi, M. Ikeda and K. Arakawa (1993):

Role of locally formed angiotensin II and bradykinin in the reduction of myocardial infarct size in dogs.

Cardiovasc Res 27: 334-340. DOI: 10.1093/cvr/27.2.334.

Nolly, H., L. A. Carbini, G. Scicli, O. A. Carretero and A. G. Scicli (1994):

A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts.

Hypertension 23: 919-923. DOI: 10.1161/01.hyp.23.6.919.

Nolly, H., G. Saed, O. A. Carretero, G. Scicli and A. G. Scicli (1993):

Adrenal kallikrein.

Hypertension 21: 911-915. DOI: 10.1161/01.hyp.21.6.911.

Nolly, H., A. G. Scicli, G. Scicli and O. A. Carretero (1985):

Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein.

Circ Res 56: 816-821. DOI: 10.1161/01.res.56.6.816.

Ohashi, Y., S. Kawashima, K. Hirata, T. Yamashita, T. Ishida, N. Inoue, T. Sakoda, H. Kurihara, Y. Yazaki and M. Yokoyama (1998):

Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase [see comments].

J. Clin. Invest 102: 2061-2071.

Ohlstein, E. H., K. S. Wood and L. J. Ignarro (1982):

Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX.

Arch Biochem Biophys 218: 187-198. DOI: 10.1016/0003-9861(82)90335-6.

Oppermann, M., V. T. Dao, T. Suvorava, M. Bas and G. Kojda (2008):

Effect of oral organic nitrates on expression and activity of vascular soluble guanylyl cyclase.

Br. J. Pharmacol 155: 335-342.

Oppermann, M., T. Suvorava, T. Freudenberger, V. T. Dao, J. W. Fischer, M. Weber and G. Kojda (2011):

Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-dependent posttranslational modification.

Basic Res. Cardiol 106: 539-549.

Orstavik, S., R. Solberg, K. Taskén, M. Nordahl, M. R. Altherr, V. Hansson, T. Jahnsen and M. Sandberg (1996):

Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase.

Biochem Biophys Res Commun 220: 759-765. DOI: 10.1006/bbrc.1996.0477.

Oza, N. B., J. H. Schwartz, H. D. Goud and N. G. Levinsky (1990):

Rat aortic smooth muscle cells in culture express kallikrein, kininogen, and bradykininase activity.

J Clin Invest 85: 597-600. DOI: 10.1172/jci114479.

Palacios, M., R. G. Knowles, R. M. Palmer and S. Moncada (1989):

Nitric oxide from L-arginine stimulates the soluble guanylate cyclase in adrenal glands.

Biochem Biophys Res Commun. Dec 15;165(2):802-9.

Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987):

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature 327: 524-526.

Palmer, R. M. and S. Moncada (1989):

A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun 158: 348-352. DOI: 10.1016/s0006-291x(89)80219-0.

Palmer, R. M. J., D. S. Ashton and S. Moncada (1988):

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L- arginine.

Nature 333: 664-666.

Pape, H. C. and R. Mager (1992):

Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons.

Neuron 9: 441-448. DOI: 10.1016/0896-6273(92)90182-d.

Pauvert, O., D. Salvail, E. Rousseau, C. Lugnier, R. Marthan and J. P. Savineau (2002):

Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery.

Biochem Pharmacol 63: 1763-1772. DOI: 10.1016/s0006-2952(02)00919-x.

Peng, W., J. R. Hoidal and I. S. Farrukh (1996):

Regulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: Role of nitric oxide.

J. Appl. Physiol 81: 1264-1272.

Pfaffenrath, V., S. de la Motte, F. Harrison and C. Ruthning (1998):

[Actions of pentaerithritol tetranitrate, isosorbide mononitrate and placebo on headache and ability to work of healthy subjects].

Arzneimittelforschung 48: 646-650.

Pfeifer, A., P. Ruth, W. Dostmann, M. Sausbier, P. Klatt and F. Hofmann (1999):

Structure and function of cGMP-dependent protein kinases.

Rev Physiol Biochem Pharmacol 135: 105-149. DOI: 10.1007/BFb0033671.

Pietzner, M., A. Kaul, A. K. Henning, G. Kastenmüller, A. Artati, M. M. Lerch, J. Adamski, M. Nauck and N. Friedrich (2017):

Comprehensive metabolic profiling of chronic low-grade inflammation among generally healthy individuals.

BMC Med 15: 210. DOI: 10.1186/s12916-017-0974-6.

Price, T. D., D. F. Ashman and M. M. Melicow (1967):

Organophosphates of urine, including adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate.

Biochim Biophys Acta 138: 452-465.

Pryzwansky, K. B., T. A. Wyatt and T. M. Lincoln (1995):

Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils.

Blood 85: 222-230.

Qadri, F. and M. Bader (2018):

Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation.

Expert Opin Ther Targets 22: 31-44. DOI: 10.1080/14728222.2018.1409724.

Radomski, M. W., J. F. Martin and S. Moncada (1991a):

Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the american horseshoe crab (*Limulus polyphemus*).

Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. (Biol.) 334: 129-133.

Radomski, M. W., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1991b):

Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway.

TIPS 12: 87-88.

Raeymaekers, L., J. A. Eggermont, F. Wuytack and R. Casteels (1990):

Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump of bovine pulmonary artery.

Cell Calcium 11: 261-268. DOI: 10.1016/0143-4160(90)90002-c.

Rall, T. W. and E. W. Sutherland (1958):

Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles.

J Biol Chem 232: 1065-1076.

Rees, D. D., R. M. Palmer, H. F. Hodson and S. Moncada (1989a):

A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation.

Br J Pharmacol. Feb;96(2):418-24.

Rees, D. D., R. M. Palmer, R. Schulz, H. F. Hodson and S. Moncada (1990):

Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.

Br J Pharmacol. Nov;101(3):746-52.

Rees, D. D., R. M. J. Palmer and S. Moncada (1989b):

Role of endothelium derived nitric oxide in the regulation of blood pressure.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 646-652.

Regoli, D. (1986):

Kinins, receptors, antagonists.

Adv Exp Med Biol 198 Pt A: 549-558. DOI: 10.1007/978-1-4684-5143-6_73.

Regoli, D. and J. Barabe (1980):

Pharmacology of bradykinin and related kinins.

Pharmacol. Rev 32: 1-46.

Reinhard, M., T. Jarchau and U. Walter (2001):

Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins.

Trends Biochem Sci. Apr;26(4):243-9.

Rhaleb, N. E., X. P. Yang and O. A. Carretero (2011):

The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function.

Compr Physiol 1: 971-993. DOI: 10.1002/cphy.c100053.

Rocha, E. S. M., W. T. Beraldo and G. Rosenfeld (1949):

Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin.

Am J Physiol 156: 261-273. DOI: 10.1152/ajplegacy.1949.156.2.261.

Roffi, M., C. Patrono, J. P. Collet, C. Mueller, M. Valgimigli, F. Andreotti, J. J. Bax, M. A. Borger, C. Brotons, D. P. Chew, B. Gencer, G. Hasenfuss, K. Kjeldsen, P. Lancellotti, U. Landmesser, J. Mehilli, D. Mukherjee, R. F. Storey, S. Windecker, H. Baumgartner, O. Gaemperli, S. Achenbach, S. Agewall, L. Badimon, C. Baigent, H. Bueno, R. Bugiardini, S. Carerj, F. Casselman, T. Cuisset, C. Erol, D. Fitzsimons, M. Halle, C. Hamm, D. Hildick-Smith, K. Huber, E. Iliodromitis, S. James, B. S. Lewis, G. Y. Lip, M. F. Piepoli, D. Richter, T. Rosemann, U. Sechtem, P. G. Steg, C. Vrints and Z. J. Luis (2016):

2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC).

Eur Heart J 37: 267-315.

Roman, R. J., M. L. Kaldunski, A. G. Scicli and O. A. Carretero (1988):

Influence of kinins and angiotensin II on the regulation of papillary blood flow.

Am J Physiol 255: F690-698. DOI: 10.1152/ajprenal.1988.255.4.F690.

Rosen, R. C. and J. B. Kostis (2003):

Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction.

Am J Cardiol 92: 9m-18m. DOI: 10.1016/s0002-9149(03)00824-5.

Rubanyi, G. M., J. C. Romero and P. M. Vanhoutte (1986):

Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol 250: H1145-H1149.

Saed, G. M., O. A. Carretero, R. J. MacDonald and A. G. Scicli (1990):

Kallikrein messenger RNA in rat arteries and veins.

Circ Res 67: 510-516. DOI: 10.1161/01.res.67.2.510.

Sakuma, I., D. J. Stuehr, S. S. Gross, C. Nathan and R. Levi (1988):

Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor.

Proc Natl Acad Sci U S A. Nov;85(22):8664-7.

Sakuma, I., H. Togashi, M. Yoshioka, H. Saito, M. Yanagida, M. Tamura, T. Kobayashi, H. Yasuda, S. S. Gross and R. Levi (1992):

N^G-methyl L-arginine, an inhibitor of L-arginine derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone?

Circ. Res 70: 607-611.

Salgado, M. C. O., S. F. Rabito and O. A. Carretero (1986):

"Blood Kinin in One-Kidney, One Clip Hypertensive Rats."

Hypertension. 8(4, Part 2) (Supplement I):I-110-I-113, April 1986.

Salvemini, D., G. de Nucci, R. J. Gryglewski and J. R. Vane (1989):

Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor.

Proc Natl Acad Sci U S A Aug;86(16):6328-32.

Sandberg, M., V. Natarajan, I. Ronander, D. Kalderon, U. Walter, S. M. Lohmann and T. Jahnsen (1989):

Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat.

FEBS Lett 255: 321-329. DOI: 10.1016/0014-5793(89)81114-7.

Schlaeger, T. M., S. Bartunkova, J. A. Lawitts, G. Teichmann, W. Risau, U. Deutsch and T. N. Sato (1997):

Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 3058-3063.

Schmidt, H. H. H. W., B. Nau, W. Wittfoht, J. Gerlach, K.-E. Prescher, M. M. Klein, F. Niroomand and E. Böhme (1988):

Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide.

Eur. J. Pharmacol 154: 213-216.

Schultz, G., E. Bohme and K. Munske (1969):

Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity.

Life Sci 8: 1323-1332.

Schulz, S., C. K. Green, P. S. Yuen and D. L. Garbers (1990):

Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor.

Cell 63: 941-948. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90497-3.

Schulz, S., S. Singh, R. A. Bellet, G. Singh, D. J. Tubb, H. Chin and D. L. Garbers (1989):

The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family.

Cell 58: 1155-1162. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90513-8.

Schulz, S., B. J. Wedel, A. Matthews and D. L. Garbers (1998):

The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor.

J. Biol. Chem 273: 1032-1037.

Schwarz, P. M., H. Kleinert and U. Förstermann (1999):

Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 19: 2584-2590.

Scicli, A. G. and O. A. Carretero (1986):

Renal kallikrein-kinin system.

Kidney Int 29: 120-130. DOI: 10.1038/ki.1986.14.

Scicli, A. G., T. Mindroiu, G. Scicli and O. A. Carretero (1982):

Blood kinins, their concentration in normal subjects and in patients with congenital deficiency in plasma prekallikrein and kininogen.

J Lab Clin Med 100: 81-93.

Scicli, G., H. Nolly, O. A. Carretero and A. G. Scicli (1989):

Glandular kallikrein-like enzyme in adrenal glands.

Adv Exp Med Biol 247b: 217-222. DOI: 10.1007/978-1-4615-9546-5_36.

Seino, M., O. A. Carretero, R. Albertini and A. G. Scicli (1982):

Kinins in regulation of uteroplacental blood flow in the pregnant rabbit.

Am J Physiol 242: H142-147. DOI: 10.1152/ajpheart.1982.242.2.H142.

Shariat-Madar, Z., F. Mahdi and A. H. Schmaier (2002):

Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator.

J. Biol. Chem 277: 17962-17969.

Shariat-Madar, Z., F. Mahdi and A. H. Schmaier (2004):

Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein.

Blood 103: 4554-4561.

Sharma, V. S., J. F. Geibel and H. M. Ranney (1978):

"Tension" on heme by the proximal base and ligand reactivity: conclusions drawn from model compounds for the reaction of hemoglobin.

Proc Natl Acad Sci U S A 75: 3747-3750. DOI: 10.1073/pnas.75.8.3747.

Shesely, E. G., N. Maeda, H. S. Kim, K. M. Desai, J. H. Krege, V. E. Laubach, P. A. Sherman, W. C. Sessa and O. Smithies (1996):

Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13176-13181.

Smolenski, A., C. Bachmann, K. Reinhard, P. Hönig-Liedl, T. Jarchau, H. Hoschuetzky and U. Walter (1998):

Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody.

J Biol Chem. Aug 7;273(32):20029-35.

Snyder, S. H. and D. S. Bredt (1992):

Biological roles of nitric oxide.

Sci. Am 266: 68-77.

Stone, J. R. and M. A. Marletta (1994):

Soluble guanylate cyclase from bovine lung: Activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states.

Biochemistry 33: 5636-5640.

Stuehr, D., S. Pou and G. M. Rosen (2001):

Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.

J Biol Chem 276: 14533-14536. DOI: 10.1074/jbc.R100011200.

Stuehr, D. J. (1999):

Mammalian nitric oxide synthases.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1411: 217-230. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00016-X).

Stuehr, D. J., H. J. Cho, N. S. Kwon, M. F. Weise and C. F. Nathan (1991a):

Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.

Proc Natl Acad Sci U S A 88: 7773-7777. DOI: 10.1073/pnas.88.17.7773.

Stuehr, D. J., S. S. Gross, I. Sakuma, R. Levi and C. F. Nathan (1989):

Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide.

J Exp Med.

Stuehr, D. J., N. S. Kwon, C. F. Nathan, O. W. Griffith, P. L. Feldman and J. Wiseman (1991b):

N^{ω} -hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine.

J. Biol. Chem 266: 6259-6263.

Stuehr, D. J. and M. A. Marletta (1985):

Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide.

Proc Natl Acad Sci U S A 82: 7738-7742. DOI: 10.1073/pnas.82.22.7738.

Sutherland, E. W. and T. W. Rall (1957):

THE PROPERTIES OF AN ADENINE RIBONUCLEOTIDE PRODUCED WITH CELLULAR PARTICLES, ATP, Mg^{++} , AND EPINEPHRINE OR GLUCAGON.

Journal of the American Chemical Society 79: 3608-3608. DOI: 10.1021/ja01570a087.

Sutherland, E. W. and T. W. Rall (1958):

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.

J Biol Chem 232: 1077-1091.

Suvorava, T. and G. Kojda (2009):

Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models.

Biochim. Biophys. Acta 1787: 802-810.

Suvorava, T., N. Lauer, S. Kumpf, R. Jacob, W. Meyer and G. Kojda (2005):

Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo.

Circulation 112: 2487-2495.

Suvorava, T., N. Nagy, S. Pick, O. Lieven, U. Ruther, V. T. Dao, J. W. Fischer, M. Weber and G. Kojda (2015):

Impact of eNOS-Dependent Oxidative Stress on Endothelial Function and Neointima Formation.

Antioxid. Redox. Signal %20;23: 711-723.

Suvorava, T., S. Pick and G. Kojda (2017):

Selective impairment of blood pressure reduction by endothelial nitric oxide synthase dimer destabilization in mice.

J Hypertens 35: 76-88.

Tamura, N., H. Itoh, Y. Ogawa, O. Nakagawa, M. Harada, T. H. Chun, S. Suga, T. Yoshimasa and K. Nakao (1996):

cDNA cloning and gene expression of human type Ialpha cGMP-dependent protein kinase.

Hypertension 27: 552-557. DOI: 10.1161/01.hyp.27.3.552.

Taraseviciene-Stewart, L., Y. Kasahara, L. Alger, P. Hirth, G. Mc Mahon, J. Waltenberger, N. F. Voelkel and R. M. Tuder (2001):

Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension.

Faseb j 15: 427-438. DOI: 10.1096/fj.00-0343com.

Taraseviciene-Stewart, L., R. Scerbavicius, J. M. Stewart, L. Gera, Y. Demura, C. Cool, M. Kasper and N. F. Voelkel (2005):

Treatment of severe pulmonary hypertension: a bradykinin receptor 2 agonist B9972 causes reduction of pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy.

Peptides 26: 1292-1300. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.03.050.

Thorpe, D. S. and E. Morkin (1990):

The carboxyl region contains the catalytic domain of the membrane form of guanylate cyclase.

J Biol Chem 265: 14717-14720.

Toda, N., K. Ayajiki and T. Okamura (2009):

Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase.

J Hypertens 27: 1929-1940. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32832e8ddf.

Togashi, H., I. Sakuma, M. Yoshioka, T. Kobayashi, H. Yasuda, A. Kitabatake, H. Saito, S. S. Gross and R. Levi (1992):

A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation.

J. Pharmacol. Exp. Ther 262: 343-347.

Trabold, F., S. Pons, A. A. Hagege, M. Bloch-Faure, F. Alhenc-Gelas, J. F. Giudicelli, C. Richer-Giudicelli and P. Meneton (2002):

Cardiovascular phenotypes of kinin B2 receptor- and tissue kallikrein-deficient mice.

Hypertension 40: 90-95. DOI: 10.1161/01.hyp.0000021747.43346.95.

Tsai, E. J. and D. A. Kass (2009):

Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics.

Pharmacol Ther 122: 216-238. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.02.009.

Uhler, M. D. (1993):

Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain.

J Biol Chem 268: 13586-13591.

Vandecasteele, G., I. Verde, C. Rücker-Martin, P. Donzeau-Gouge and R. Fischmeister (2001):

Cyclic GMP regulation of the L-type Ca(2+) channel current in human atrial myocytes.

J Physiol 533: 329-340. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2001.0329a.x.

Vanhoutte, P. M., J. T. Shepherd, S. International Union of Physiological, Congress and V. International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation : vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves, and endothelium. New York, Raven Press.

Vargas, H. M., J. M. Cuevas, L. J. Ignarro and G. Chaudhuri (1991):

Comparison of the inhibitory potencies of N^G-methyl-, N^G- nitro- and N^G-amino-L-arginine on EDRF function in the rat: Evidence for continuous basal EDRF release.

J. Pharmacol. Exp. Ther 257: 1208-1215.

Verde, I., G. Vandecasteele, F. Lezoualc'h and R. Fischmeister (1999):

Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes.

Br J Pharmacol 127: 65-74. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702506.

Vleeming, W., J. G. van Amsterdam, B. H. Stricker and D. J. De Wildt (1998):

ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management.

Drug Saf 18: 171-188.

Waldman, S. A. and F. Murad (1987):

Cyclic GMP synthesis and function.

Pharmacol Rev 39: 163-196.

Waldman, S. A., R. M. Rapoport and F. Murad (1984):

Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues.

J Biol Chem 259: 14332-14334.

Wang, G. R., Y. Zhu, P. V. Halushka, T. M. Lincoln and M. E. Mendelsohn (1998):

Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(9):: 4888-4893.

Weber, M., H. Cai, G. Kojda and D. G. Harrison (2002):

A Cys-101-Ala-Mutation increases the Superoxide Production of bovine endothelial NO-Synthase.

Free Radic. Biol. Med 33: S381.

Weber, W., K. Michaelis, V. Luckow, U. Kuntze and D. Stalleicken (1995):

Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerythrityl tetranitrate and two of its metabolites.

Arzneim. Forsch 45: 781-784.

Wegener, J. W., H. Nawrath, W. Wolfsgruber, S. Kühbandner, C. Werner, F. Hofmann and R. Feil (2002):

cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium.

Circ Res 90: 18-20. DOI: 10.1161/hh0102.103222.

Wenzel, P., U. Hink, M. Oelze, A. Seeling, T. Isse, K. Bruns, L. Steinhoff, M. Brandt, A. L. Kleschyov, E. Schulz, K. Lange, H. Weiner, J. Lehmann, K. J. Lackner, T. Kawamoto, T. Munzel and A. Daiber (2007):

Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2^{-/-} mice.

Br. J. Pharmacol 150: 526-533.

White, A. A. and G. D. Aurbach (1969):

Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues.

Biochim Biophys Acta 191: 686-697.

White, H. D. (2003):

Should all patients with coronary disease receive angiotensin-converting-enzyme inhibitors?

Lancet 362: 755-757. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)14295-x.

Wilkin, J. K., J. J. Hammond and W. M. Kirkendall (1980):

The captopril-induced eruption. A possible mechanism: cutaneous kinin potentiation.
Arch Dermatol 116: 902-905.

Winbury, M. M., B. B. Howe and H. R. Weiss (1971):

Effect of nitroglycerin and dipyridamole on epicardial and endocardial oxygen tension-further evidence for redistribution of myocardial blood flow.
J. Pharmacol. Exp. Ther 176: 184-199.

Wink, D., K. Kasprzak, C. Maragos, R. Elespuru, M. Misra, T. Dunams, T. Cebula, W. Koch, A. Andrews, J. Allen and a. et (1991):

DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors.
Science 254: 1001-1003. DOI: 10.1126/science.1948068.

Winqvist, R. J., E. P. Faison, S. A. Waldman, K. Schwartz, F. Murad and R. M. Rapoport (1984):

Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle.
Proc Natl Acad Sci U S A 81: 7661-7664. DOI: 10.1073/pnas.81.23.7661.

Wolin, M. S., K. S. Wood and L. J. Ignarro (1982):

Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme.
J. Biol. Chem 257: 13312-13320.

Wright, C. D., A. Mülsch, R. Busse and H. Osswald (1989):

Generation of nitric oxide by human neutrophils.
Biochem Biophys Res Commun. Apr 28;160(2):813-9.

Yang, H. Y., E. G. Erdos and Y. Levin (1970):

A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin.
Biochim. Biophys. Acta 214: 374-376.

Yang, H. Y., E. G. Erdos and Y. Levin (1971):

Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme).
J Pharmacol. Exp. Ther 177: 291-300.

Yang, R. B., D. C. Foster, D. L. Garbers and H. J. Fülle (1995):

Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye.
Proc Natl Acad Sci U S A 92: 602-606. DOI: 10.1073/pnas.92.2.602.

Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman and W. A. Catterall (2005):

Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily.

Pharmacol Rev 57: 387-395. DOI: 10.1124/pr.57.4.13.

Yuen, P. S., L. R. Potter and D. L. Garbers (1990):

A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney.

Biochemistry 29: 10872-10878. DOI: 10.1021/bi00501a002.

Zhang, Q., J. Moalem, J. Tse, P. M. Scholz and H. R. Weiss (2005):

Effects of natriuretic peptides on ventricular myocyte contraction and role of cyclic GMP signaling.

Eur J Pharmacol 510: 209-215. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.01.031.

Zhang, X. J., K. B. Cahill, A. Efenbein, V. Y. Arshavsky and R. H. Cote (2008):

Direct allosteric regulation between the GAF domain and catalytic domain of photoreceptor phosphodiesterase PDE6.

J Biol Chem 283: 29699-29705. DOI: 10.1074/jbc.M803948200.

Zhou, L. and D. Y. Zhu (2009):

Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications.

Nitric Oxide 20: 223-230. DOI: 10.1016/j.niox.2009.03.001.

Publikationsverzeichnis

Khosravani, F., Suvorava, T., Dao, V. T. -V., Brockmann, N., Kocgirli, O., Herbst, F. F., Valcaccia, S., Kassack, M. U., Bas, M., & Kojda, G. (2015). Stability of murine bradykinin type 2 receptor despite treatment with NO, bradykinin, icatibant, or C1-INH. *Allergy*, 70(3), 285-294.

Abstrakt

Kocgirli O., Balz V., Bas M., Kojda G. Expression of the bradykinin B2-receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2007) 375 (Suppl 1):S22.

Dao V.T., Suvorava T., Kocgirli O., Agouri S., Oppermann M., Balz V., Kojda G. Effect of endogenous NO and pentaerythritol tetranitrate on myocardial AT-2 receptor expression in-vivo *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2009) 379 (Suppl 1): S35.

Dao V.T., Suvorava T., Kocgirli O., Agouri S., Oppermann M., Balz V., Effect of nitric oxide on the AT-2 receptor expression in-vivo. *Eur Heart J.* (2009) ;30(Suppl 1): S361.

Kumpf S, Kocgirli O, Suvorava T, Bas M, Kojda G. Vessel-specific vasodilation by fibrinogen: Role of the $(\alpha)(v)(\beta)(3)$ integrin v. *Amino Acids* (2009) 37 (Suppl 1):S73.

Kocgirli O, Valcaccia S, Bas M., Vera B. Kojda G Effect of fibrinogen on bradykinin receptor type-2 protein expression. *IUBMB Life.* (2009);61(3):366-367.

Kocgirli O, Valcaccia S, Dao V.T, Suvorava T, Kumpf S, Floeren M, Oppermann M, Kojda G. Vascular bradykinin type-2 receptor overexpression in eNOS knockout mice. *European Heart Journal* (2010) 31 (Suppl 1): S81.

Kocgirli O, Valcaccia S, Dao VT, Suvorava T, Kumpf S, Floeren M, Oppermann M, Kojda G. Effects of NO on vascular bradykinin type-2 receptor expression. *Cardiovascular Research* (2010) 87 SUPPL. 1 (S54-S55).

Agouri S, Dao VT, Kocgirli O, Oppermann M, Suvorava T, Kojda G NO-donor induced cGMP-dependent AT2 receptor expression in porcine aortic endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, May 2010, 17, 2(suppl, 1), S22.

Kocgirli O, Suvorava T., Valcaccia S., Khosravani F., DaoV.T., Balz V., Gödecke A., Bas M., Kojda G. Bradykinin type-2 receptor expression and bioavailability of NO. In Vivo (2011), 25 (3) 538.

Kocgirli O., Suvorava T., Valcaccia S., Khosravani F., Dao V. T., Balz V., Gödecke A., Bas M., Kojda G. Upregulation of bradykinin type-2 receptor expression in eNOS-deficient mice. A role for the lack of eNOS? Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2011) 383 (Suppl 1): S68.

Dao V. T., Bas M., Kocgirli O., Agouri S., Suvorava T., Kojda G. Impact of the AT-2-receptor on the Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Activity by Nitric Oxide in-Vivo. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2011) 383 (Suppl 1): S53.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Georg Kojda für die für Überlassung des Themas und der Möglichkeit zur Promotion am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität sowie für die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses und dafür, dass er mir stets beratend zur Seite stand. Danke auch für die Möglichkeit meine Forschungsergebnisse auf diversen nationalen und internationalen Fachkongressen präsentieren zu können und die damit verbundene Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bäumer danke ich sehr herzlich für die Mitbetreuung und die Vertretung der Arbeit vor der Veterinärmedizinische Fakultät der FU-Berlin.

Besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Murat Bas für die gute Zusammenarbeit und dafür, dass er mir jederzeit zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich mich für die hilfreiche Beratung und Unterstützung bei zahlreichen Experimenten bei meinen Kollegen (Dr. Tatsiana Suvorava, Dr. Sandra Maria Valcaccia, Dr. Stephanie Han-Whei Pick, Dr. Marc Oppermann, Ehsan Fahimi, Dr. Farbod Khosravani, Marion Bisha, Dr. Vu Thao-Vi Dao, Dr. Sawsan Agouri und Ilse Alonso und allen weiteren Praktikanten, Doktoranden und fleißigen Helfern, die während meiner Promotionszeit Teil der Arbeitsgruppe waren, bedanken.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Jens Fischer, Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör und allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie für die immer freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Meinen Freunden Elif und Baris Üstün und Selen Demirel danke ich für die Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau, meinen Kindern und meinen Eltern herzlich für ihre Geduld und dafür, dass ich mich auf sie jederzeit bedingungslos verlassen kann. Ohne ihre Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen.

Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Antragsnummer 1557/14-1), die Deutsche Gesellschaft für Gefäßkrankungsforschung e. V. (Antragsnummer 701610801) und die Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Antragsnummer 9772681).

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Interessenskonflikt

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Düsseldorf den 12.07.2022

Oktay Koçgirli