

# Pharmakologie und Signaltransduktion von Kininrezeptoren in Peritubulärzellen des Rattenhodens

---

**Malte Frederick Ihmels**

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Pharmakologie und Signaltransduktion  
von Kininrezeptoren in Peritubulärzellen  
des Rattenhodens

**INAUGURALDISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Malte Frederick Ihmels**

aus Gießen

Gießen 2013

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Hautklinik

Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Giessen

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Uwe Gieler

Betreuer Prof. Dr. W.B. Schill, Prof. Dr. T.K. Monsees, PhD

Gutachter: Prof. Dr. A. Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der Disputation: 16.10.2013

Für meinen Bruder

Arndt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einführung in das Kallikrein – Kinin – System (KKS)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Historie	1
1.1.2	Aktivierung, Funktion und Bedeutung von Kallikrein-Kinin-Systemen	3
<b>1.2</b>	<b>Der Hoden</b>	<b>11</b>
1.2.1	Anatomie und Physiologie des Testis	11
1.2.2	Aufgabe und Funktion von Peritubulärzellen	14
1.2.3	Endokrine Steuerung der Hodenfunktion	14
<b>1.3</b>	<b>Das Kallikrein-Kinin System im Reproduktionstrakt</b>	<b>15</b>
1.3.1	Kininogenasen	15
1.3.2	Kininogene	16
1.3.3	Bradykinin B <sub>2</sub> Rezeptor	16
1.3.4	Kininasen	17
1.3.5	Peritubulärzellen und das Kallikrein-Kinin System	18
1.3.6	Physiologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems im Reproduktionsgeschehen	18
<b>1.4</b>	<b>Theoretische Grundlagen der Rezeptorpharmakologie</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>28</b>
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.2	Kits	29
2.1.3	Geräte	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>30</b>
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.1.1.	Präparation von Primärkulturen der Peritubulärzellen	30
2.2.1.2.	Passagieren von Peritubulärzellkulturen	33
2.2.1.3.	Einfrieren von Peritubulärzellen	34
2.2.1.4.	Auftauen eingefrorener Peritubulärzellen	34
2.2.1.5.	Reinheitskontrolle durch Immunocytochemie zum Nachweis von $\alpha$ - smooth muscle Isoactin	35

2.2.2	Untersuchungen zur Signaltransduktion des B <sub>2</sub> Rezeptors _____	37
2.2.2.1	cAMP _____	37
2.2.2.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration _____	40
2.2.2.2	cGMP _____	40
2.2.2.3	D-myo-Inositol 1,4,5 – Trisphosphat (IP <sub>3</sub> ) _____	41
2.2.2.4	Western Blot - Untersuchungen zum Nachweis Bradykinin induzierter Proteinphosphorylierungen _____	44
2.2.2.4.1	Gewinnung der Proben _____	44
2.2.2.4.2	Polyacrylamid – Gelelektrophorese (PAGE) _____	45
2.2.2.4.3	Färbung der Gele mit Coomassie Blau _____	48
2.2.2.4.4	Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Western Blot) _____	48
2.2.2.4.5	Färbung der Membran mit Direktblau 71 _____	49
2.2.2.4.6	Immunologische Identifikation phosphorylierter Proteine _____	50
2.2.3	Pharmakologische Charakterisierung des B <sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen _____	53
2.2.3.1	Vorversuche zur Pharmakologie _____	53
2.2.3.2	Sättigbarkeit der Bindung von Kininen am B <sub>2</sub> Rezeptor _____	55
2.2.3.3	Verdrängbarkeit der Bindung von Kininen am B <sub>2</sub> Rezeptor _____	56
2.2.4	Statistik _____	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> _____	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b> _____	<b>57</b>
3.1.1	Reinheitskontrolle durch Immunocytochemie zum Nachweis von α - smooth muscle Isoactin _____	59
<b>3.2</b>	<b>Signaltransduktion des B<sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen</b> _____	<b>61</b>
3.2.1	cAMP _____	61
3.2.2	cGMP _____	63
3.2.3	Inositoltriphosphat (IP <sub>3</sub> ) _____	65
3.2.4	Western Blot - Untersuchungen zum Nachweis Bradykinin induzierter Proteinphosphorylierungen _____	67
3.2.4.1	Färbung der Gele mit Coomassie Blau _____	67
3.2.4.2	Färbung der Membran mit Direkt Blau 71 _____	68
3.2.4.3	Immunologische Identifikation phosphorylierter Proteine auf der	

Nitrocellulosemembran	69
3.2.4.3.1 Tyrosinphosphorylierungen	69
3.2.4.3.2 Serin- und Threoninphosphorylierung	71
<b>3.3 Pharmakologische Charakterisierung des B2 Rezeptors in</b>	
<b>Peritubulärzellen</b>	<b>73</b>
3.3.1 Vorversuche zur Pharmakologie	73
3.3.2 Sättigbarkeit der [ <sup>3</sup> H] Bradykinin Bindung	75
3.3.3 Verdrängbarkeit der [ <sup>3</sup> H] Bradykinin Bindung	78
<b>4 Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>4.1 Signaltransduktion des B2 Rezeptors</b>	<b>80</b>
<b>4.2 Pharmakologie</b>	<b>85</b>
<b>4.3 Postuliertes Modell</b>	<b>87</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
<b>6 Abstract</b>	<b>90</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8.1 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>8.2 Tabellenverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>9 Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>109</b>
<b>10.1 Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation</b>	<b>109</b>
<b>10.2 Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>110</b>
<b>10.3 Danksagung</b>	<b>111</b>



## **1 Einleitung**

### **1.1 Einführung in das Kallikrein – Kinin – System (KKS)**

#### **1.1.1 Historie**

Im Jahre 1909 konnten die beiden französischen Chirurgen Abelous und Bardier beobachten, dass die intravenöse Verabreichung einer alkoholunlöslichen Fraktion aus humanem Urin bei einem narkotisierten Hund zu einem vorübergehenden Blutdruckabfall führte. Sie lieferten damit erste Hinweise auf die Existenz des Kallikrein - Kinin - Systems (Abelous und Bardier, 1909). Diesen Effekt führten der Chirurg Emil Karl Frey und der Physiologe Heinrich Kraut 1928 auf eine thermolabile, nicht dialysierbare Substanz zurück, die sie als Kreislaufhormon charakterisierten (Frey und Kraut, 1928). Da diese Substanz im Pankreas in einer sehr hohen Konzentration gefunden wurde, benannte man sie nach dem griechischen Wort für die Bauchspeicheldrüse kallikréas als Kallikrein (Kraut et al., 1930). Im selben Jahr führte Bayer Kallikrein unter dem Handelsnamen Padutin in den Markt ein. Das Mittel wurde dabei vor allem zur Behandlung von idiopathischen Fertilitätsstörungen bei Männern, aber auch bei peripheren Durchblutungsstörungen und anderen Indikationen im Bereich der Inneren Medizin sowie der Augenheilkunde eingesetzt.

Später durchgeführte prospektive, randomisierte Doppel-Blind-Studien konnten jedoch nach einer Behandlung von Fertilitätsstörungen mit Padutin keinen positiven Effekt auf das Gesamtkollektiv bezogen nachweisen (Keck et al., 1994; Yamamoto et al., 1996; Gletzerman et al., 1993), so dass Bayer im Jahre 2001 Padutin wieder vom deutschen Markt nahm.

1937 konnten Werle, Götz und Kappler zeigen, dass die Wirkung des Kallikrein über die Aktivierung eines inaktiven Zwischenstoffes stattfindet, welcher bei glatten Muskelzellen zu einer Kontraktion führt (Werle et al., 1937).

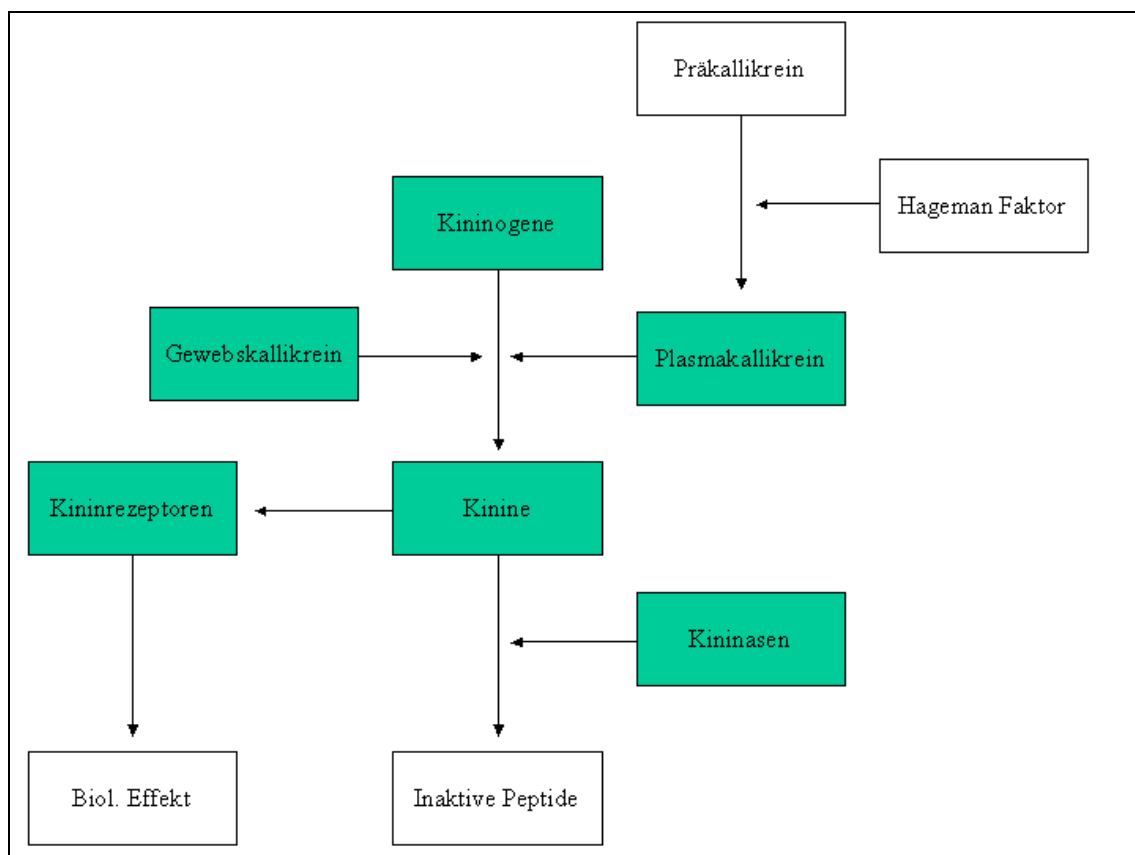
Sie beschrieben die aktive Substanz als ein Polypeptid und nannten sie Kallidin (Werle und Berek, 1948). Kurz darauf identifizierte Rocha e Silva eine weitere, von Kallikrein

---

aktivierte Substanz im Blutplasma: das Bradykinin, welches eine Hypotension bewirkt und am isolierten Meerschweinchendarm zu einer langsamen Kontraktion führt (Rocha e Silva et al., 1949). Der Name Bradykinin leitet sich dabei von dem griechischen bradys für langsam und kinein für Bewegung ab. Diese beiden aktiven Peptide wurden zusammenfassend als Kinine bezeichnet. Regoli und Barabé konnten die biologischen Effekte der Kinine auf eine Interaktion mit spezifischen Kininrezeptoren zurückführen, bei denen sie noch zwei Subtypen unterschieden, den B<sub>1</sub>- und den B<sub>2</sub>-Rezeptor (Regoli und Barabé, 1980).

### 1.1.2 Aktivierung, Funktion und Bedeutung von Kallikrein-Kinin-Systemen

Kallikrein – Kinin – Systeme kommen nahezu ubiquitär im Organismus vor und setzen sich aus fünf Hauptkomponenten zusammen: Kinine sind biologisch aktive Peptide und die terminalen Effektoren des Systems. Sie werden hauptsächlich durch Gewebs- bzw. Plasmakallikrein, aber auch durch Akrosin proteolytisch aus ihren Vorstufen, den Kininogenen, freigesetzt. Sie vermitteln ihre biologische Wirkung durch Interaktion mit spezifischen Kininrezeptoren, welche aus funktionellen und pharmakologischen Gesichtspunkten in zwei Subtypen eingeteilt werden, den B<sub>1</sub> und den B<sub>2</sub> Rezeptor (B<sub>1</sub>R und B<sub>2</sub>R). Die wichtigsten Vertreter der Kinine sind das Bradykinin, sein ebenfalls aktives Abbauprodukt des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin sowie das Kallidin.



**Abbildung1:** Schematischer Überblick über das Kallikrein-Kinin-System

Die freigesetzten Kinine werden schnell durch Kininasen genannte Proteasen wieder deaktiviert. Diese Vorgänge laufen dynamisch ab. Es besteht also ein permanentes Nebeneinander von Kininbildung und -deaktivierung, so dass sich ein Gleichgewicht ausbildet.

Grundsätzlich kann das systemisch relevante Plasmakallikrein-Kinin-System vom lokal wirksamen Gewebeskallikrein-Kinin-System unterschieden werden. Im Plasma spielt das System eine wichtige Rolle bei der Regulation und Steuerung von Gerinnungs- bzw. Fibrinolyseprozessen (Pisano und Austen, 1972), während das Gewebeskallikrein-Kinin-System in Abhängigkeit von der Art des Gewebes eine Vielzahl verschiedener Funktionen erfüllen kann.

Zum einen fungieren die freigesetzten Kinine hier als klassische lokal wirksame Entzündungsmediatoren: Sie führen zur Venokonstriktion, durch direkte Interaktion mit glatten Muskelzellen zur arteriellen Gefäßdilataion und durch Öffnung von tight-junctions zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität (Wachtfogel et al., 1993). Sie können durch Reizung von nozizeptiven Neuronen das Schmerzempfinden steigern und sind über das Anstoßen verschiedener Aktivierungskaskaden mit subsequenter Freisetzung von unter anderem Prostanoiden an der Entstehung von Ödemen beteiligt (Abe und Ogata, 1982). Immunkompetente Zellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen werden zudem aktiviert (Polosa et al., 1993) und ihre Migration vom Blut ins Gewebe gefördert (Bhoola et al., 1992).

Zum anderen spielt das Gewebeskallikrein-Kinin-System eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Proliferations- und Differenzierungsvorgängen (Atanassova, 2003). Es beeinflusst den Tonus glatter Muskelzellen sowie den Glucosemetabolismus (Schack et al., 1980). Tabelle 1 fasst einige Beispiele für spezifische physiologische bzw. pathophysiologische Kininwirkungen in verschiedenen Organen zusammen:

**Tabelle1:** Beispiele für die Wirkung von Kininen in verschiedenen Organen

<b>Organsystem</b>	<b>Kininwirkung</b>
Oberer Respirationstrakt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beteiligung bei der allergischen Rhinitis (Churchill et al., 1991)</li> </ul>
Lunge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronchokonstriktion bei Asthmatikern (Barnes, 1992)</li> <li>• Reizhusten als NW einer Behandlung mit ACE Inhibitoren mit resultierender erhöhter Kininkonzentration (Trifilieff et al., 1993)</li> </ul>
Gehirn	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posttraumatisches cerebrales Ödem (Schilling und Wahl, 1997)</li> <li>• Erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Wahl et al., 1996)</li> </ul>
Niere	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protektiver Effekt bei diabetischer Nephropathie (Doggrell, 2005)</li> <li>• Verminderte Rückresorption von Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O (Tomita et al., 1986)</li> </ul>
Herz	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung von Herzstruktur und -funktion (Emanueli et al., 1999)</li> </ul>
Leber	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Portaler Druckanstieg in der zirrhotischen oder entzündeten Leber (Loureiro-Silva, 2001)</li> </ul>
Knochen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wichtige Rolle bei der rheumatoiden Arthritis (Bhoola et al., 1992)</li> </ul>
Gastrointestinaltrakt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beteiligung bei der Proliferation und Metastasierung von Ösophaguskarzinomen (Dlamini et al., 1999)</li> </ul>
Skelettmuskel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrte endogene Glucoseaufnahme des Muskelgewebes (Dietze et al., 1996)</li> </ul>
Uterus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auslösung von Kontraktionen (Bhoola et al., 1992) / (Ohkura et al., 2003)</li> </ul>
Testis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Steigerung der Proliferationsraten von Spermatogonien (Atanassova, 2003)</li> <li>• Steuerung von Ionentransportvorgängen im Ductus deferens (Pierucci-Alves und Schultz, 2008)</li> <li>• Einfluss auf den Aquaporin 9 abhängigen Flüssigkeitseinstrom in Epididymis und Ductus deferens (Belleannee et al., 2009)</li> </ul>

Im Blutplasma erfolgt die Abspaltung der Kinine von den Kininogenen weitgehend durch das Plasmakallikrein, welches sich von der im Gewebe vorkommenden Form durch das Molekulargewicht, die Substratspezifität und damit die Art der freigesetzten Kinine unterscheidet. Während im Plasma hauptsächlich das Nonapeptid Bradykinin aus high molecular weight kininogen (HMWK) abgespalten wird, steht im Gewebe die Freisetzung des Dekapeptides Kallidin aus low molecular weight kininogen (LMWK) im Vordergrund (Bhoola et al., 1992). HMWK und LMWK sind beides Produkte des gleichen Gens und werden im wesentlichen in der Leber synthetisiert.

Auch die Kallikreine werden aus inaktiven Vorstufen, den Präkallikreinen, freigesetzt. Im Plasma erfolgt dies hauptsächlich durch den aktivierten Gerinnungsfaktor XII (Hageman Faktor), der durch Kontakt mit Proteinen der extrazellulären Matrix oder Membranphospholipiden aktiviert wird (Faktor XIIa). Das gebildete Kallikrein fördert wiederum die Aktivierung des Hageman Faktors. Es liegt also ein positiver Feedbackmechanismus vor (Cochrane et al., 1973). Gewebeskallikrein wird durch verschiedene Kallikreinasen, wie z.B. Thrombin, C1 Esterase und Trypsin gebildet, die als Reaktion auf schädigende Noxen, Ischämie oder Traumen freigesetzt werden.

Wie bereits erwähnt, findet neben der ständigen Neubildung ein permanenter Abbau der Kinine statt. Dieser wird durch verschiedene als Kininasen bezeichnete Proteasen katalysiert. Der wichtigste Vertreter ist dabei die Kininase II, eine mit dem Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) identische Dipeptidylcarboxypeptidase. Mit dem ACE Inhibitor Captopril ist die Wirkung der Kininase II vollständig hemmbar. Auch die neutrale Metalloendopeptidase (Erdös et al., 1985), die Argenincarboxypeptidase N (Kininase I) (Sheikh und Kaplan, 1986), die Aminopeptidase P (Guimaraes et al., 1973) sowie das post proline cleaving enzyme (Sudo et al., 1984) sind am Kininabbau beteiligt. Durch die hohe Aktivität dieser Proteasen haben Kinine nur eine sehr kurze Halbwertszeit im Organismus. Sie beträgt in vivo ca. 27 Sekunden (Cyr et al., 2001).

Die Effekte des Kallikrein – Kinin - Systems beruhen auf einer Interaktion von Kininen mit ihren spezifischen Rezeptoren, die pharmakologisch und funktionell in zwei Subtypen unterteilt werden: den B<sub>1</sub> und den B<sub>2</sub> Rezeptor (B<sub>1</sub>R / B<sub>2</sub>R). Sie unterscheiden sich durch die Affinität zu verschiedenen Agonisten bzw. Antagonisten: der B<sub>1</sub>R bindet bevorzugt [des-Arg<sup>9</sup>]-Bradykinin, während der B<sub>2</sub>R eine hohe Affinität zu Bradykinin und

Kallidin aufweist. In den letzten Jahrzehnten wurde zudem eine Vielzahl synthetischer Rezeptorantagonisten mit hoher Selektivität für die verschiedenen Subtypen entwickelt.

Auch funktionell unterscheiden sich die beiden Subtypen beträchtlich: Während der B<sub>2</sub> Rezeptor in sehr vielen Zelltypen exprimiert wird und die akuten Wirkungen des Kallikrein – Kinin – Systems induziert, spielt der B<sub>1</sub> Rezeptor unter physiologischen Bedingungen nahezu keine Rolle. Er wird erst unter bestimmten pathologischen Konditionen, wie z.B. nach Trauma oder Ischämie und nach Stimulation durch verschiedene proinflammatorische Mediatoren, hochreguliert. Dafür kommen in vivo unter anderen das Interleukin Il 1-β (Phagoo et al., 2001) und Lipopolysaccharide (LPS) aus der Membran von gramnegativen Bakterien (Castano et al., 1998) in Frage.

Beide Subtypen der Kininrezeptoren bestehen aus einem loop mit jeweils 7 Transmembrandomänen und sind an ein G-Protein gekoppelt. Der Aufbau und die Aminosäuresequenz des B<sub>1</sub>R und des B<sub>2</sub>R entsprechen einander zu 36%, dabei unterscheiden sich v.a. die Bindungsstellen am C-Terminus und der intrazelluläre Anteil voneinander (Regoli et al., 1998).

Nach mehrmaliger bzw. länger andauernder Bindung von Agonisten am Rezeptor lässt sich beim B<sub>2</sub> Rezeptor eine rasche Desensibilisierung und Internalisierung beobachten, was die transiente Natur der B<sub>2</sub> vermittelten Wirkung erklären kann. Der B<sub>1</sub>R hingegen unterliegt diesem Mechanismus nicht und reagiert bei mehrmaliger Stimulation mit einem gleichbleibenden Aktivitätsschema (Blaukat, 2003).

Neueren Erkenntnissen zufolge ist in einigen Geweben auch eine direkte Aktivierung des B<sub>2</sub>R durch Kallikrein unter Umgehung von Kininogenen bzw. Kininen möglich (Biyashev et al., 2006; Chao et al., 2008).

Die Bindung von Bradykinin und anderen Agonisten am B<sub>2</sub> Rezeptor setzt eine Kaskade intrazellulärer Signale in Gang und löst so verschiedene Antworten in den Zielzellen aus. Dabei variieren die aktivierten Signaltransduktionspfade und die ausgelösten Reaktionen der Zelle stark in Abhängigkeit vom Zelltyp, der Spezies und der Art des Gewebes.

Von besonderer Bedeutung - und in vielen Geweben anzutreffen - ist beim B<sub>2</sub> Rezeptor die Aktivierung der plasmamembrangebundenen Phospholipase C-β (Blaukat, 2003;

Rabito et al., 1996; Girolami et al., 1992; Taketo et al., 1997; Nakamura et al., 1996). Das Enzym wirkt auf das in kleineren Mengen in der Phospholipiddoppelschicht der Plasmamembran vorhandene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und spaltet es in zwei Produkte: das Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und das Diacylglycerin. Das entstandene IP<sub>3</sub> wandert zum Endoplasmatischen Retikulum und führt dort durch Öffnung von Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanälen zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom vom ER ins Cytosol. Gut erforscht ist dieses System beispielsweise bei der über muskarine Rezeptoren vermittelten Kontraktion glatter Muskelzellen durch Acetylcholin (Makhlouf, 1988; Yang et al., 1993), was daraufhin bei der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle bei den entsprechenden Untersuchungen Anwendung fand. Eine Vielzahl von Proteinen sind in ihrer Funktion von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration abhängig und werden auf diese Weise aktiviert bzw. selten auch deaktiviert. So werden u.a. verschiedene Formen der Stickstoffmonooxid (NO) produzierenden NO-Synthase (NOS) von einem hohen Ca<sup>2+</sup>-Spiegel aktiviert. Das entstehende NO regt seinerseits die Guanylatcyclase zur Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) an. Das cGMP moduliert wiederum die Wirkung verschiedener Proteinkinasen und Ionenkanäle und nimmt dadurch auch Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, so dass eine Rückkopplung stattfindet. In manchen Geweben existieren auch Formen der NO-Synthase, die zusammen mit den intrazellulären Domänen des B<sub>2</sub>-Rezeptors einen inhibitorischen Komplex bilden. Bei Stimulation des B<sub>2</sub>-Rezeptors diffundiert dieser Komplex auseinander und die NO-Synthase wird zur Produktion von NO angeregt (Marrero et al., 1999; Sheng et al., 1995; Olmos et al., 1995). Eine Aktivierung der Guanylatcyclase ist beispielsweise in glatten Muskelzellen durch das ebenfalls als Kontrolle verwendete atrial natriuretic peptide (ANP) bekannt (Hamet et al., 1989).

Das bei der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat entstehende Diacylglycerin bleibt in der Plasmamembran haften und kann dort entweder unter Freisetzung von Arachidonsäure weitergespalten werden oder zusammen mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen die Proteinkinase C aktivieren, die wiederum verschiedene Zielproteine phosphoryliert und so in ihrer Aktivität kontrolliert (Bascands et al., 1993). Die bei der Spaltung von Diacylglycerin entstehende Arachidonsäure dient als Synthesegrundlage für Lipidbotenstoffe wie Prostaglandine und Thromboxane, fungiert aber auch selbst als Botenstoff (Alberts et al., 2004).



Neben der Phospholipase C $\beta$  kann auch die Phospholipase A2 durch den B<sub>2</sub> Rezeptor aktiviert werden. Sie führt ebenso wie der Weg über das Diacylglycerin zu einer Freisetzung von Arachidonsäure (Pierrucci-Alves et al., 2008). Häufig an der Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R beteiligt ist auch die Adenylatcyclase, die die Bildung von cyclischem 3'5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. Dabei existiert eine Vielzahl von Varianten der Rolle des Enzyms in der Signalweiterleitung. So kann die Adenylatcyclase bei der Rezeptoraktivierung direkt über ein G Protein aktiviert werden (Liebmann et al., 1996). Aber auch eine indirekte, sekundäre Aktivierung durch Produkte anderer Signalwege, wie unter anderem über die Phospholipase D, ist beschrieben (Stevens et al., 1994). In anderen Geweben vermittelt der B<sub>2</sub>R wiederum einen inhibierenden Einfluss auf die Adenylatcyclase. Auch hier kann die Modifikation der Enzymaktivität direkt ausgelöst werden (Liebmann und Reissmann, 1990; Liebmann et al., 1994) oder indirekt über andere Transduktionspfade erfolgen (Bascands et al., 1993). Die Änderung der Aktivität des Enzyms spiegelt sich in einer erhöhten bzw. reduzierten intrazellulären Konzentration vom cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) wider. Das cAMP kontrolliert verschiedene Ionenkanäle in der Plasmamembran. Seine Hauptwirkung ist jedoch die Aktivierung der Proteinkinase A, die ebenso wie die Proteinkinase C verschiedene Zielproteine phosphoryliert und damit aktiviert bzw. deaktiviert. Forskolin, ein Diterpen, ist ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase und wurde bei den Versuchen bezüglich des cAMP Pathway als Kontrolle mitgeführt (Hedin und Rosberg, 1983).

Neben den bisher vorgestellten klassischen Signaltransduktionspfaden, die über die Freisetzung eines second messengers wie unter anderem cAMP, cGMP, Ca<sup>2+</sup> oder IP<sub>3</sub> ihre Wirkung entfalten, führt die Stimulation des B<sub>2</sub> Rezeptors in vielen Zellen auch zu einer Aktivierung von direkt an den Rezeptor gekoppelten Kaskaden von verschiedenen Proteinkinasen. Weil diese Form der Signaltransduktion besonders oft bei mitogenen Signalen anzutreffen ist, werden diese Kaskaden zusammenfassend als MAPK pathways (mitogen activated protein kinase) bezeichnet. Im Falle des B<sub>2</sub> Rezeptors ist eine Aktivierung des ERK (extracellular activated kinase) Pfades (Blaukat et al., 2000) sowie der Januskinase / Stat (signal transducer and activator of transcription) Kaskade (Ju et al., 2000) beschrieben.

Sowohl die Aktivierung von MAPK Pathways als auch die Modifikation der Aktivität verschiedener Proteinkinasen durch andere Signaltransduktionspfade kann in der Ziel-

zelle zu einem geänderten Phosphorylierungsmuster führen. Dabei sind sowohl Änderungen im Phosphorylierungsmuster von Tyrosin- (Tippmer et al., 1996; Coutant et al., 1995) als auch von Serin- und Threoninresiduen (Ju et al., 2000; Pizard et al., 1999) bekannt.

Die vom B<sub>2</sub>R vermittelten Signale sind im Gegensatz zu B<sub>1</sub>R ausgelösten Antworten von sehr transientser Natur, was vor allem auf einer raschen Desensibilisierung und Internalisierung des B<sub>2</sub>R nach Stimulation beruht (Blaukat, 2003). Als besonders schnelllebig gilt das Phospholipase C $\beta$  / IP<sub>3</sub> System, für das maximale IP<sub>3</sub> Konzentrationen schon 10-60 Sekunden nach Stimulation beschrieben wurden. Bereits nach wenigen Minuten wurden wieder basale Konzentrationen registriert (Rabito et al., 1996; Lambert et al., 1986; Liebmann et al., 1996). Auch beim NO/cGMP -System konnten maximale Level nach Stimulation bereits nach wenigen Minuten beobachtet werden. Nach 15 Minuten war die Konzentration wieder deutlich niedriger. Minimal erhöhte cGMP Spiegel konnten jedoch auch nach 24h noch nachgewiesen werden (Hamet et al., 1989; Leitman et al., 1988). Die Bildung von cAMP entspricht in der Regel in etwa dem zeitlichen Ablauf der Generierung von cGMP. Für das Bradykininsystem wurde jedoch teilweise auch ein verspäteter Anstieg als Hinweis auf eine indirekte Aktivierung der Adenylatcyclase über andere Signalkaskaden beobachtet (Liebmann et al., 1996).

## 1.2 Der Hoden

### 1.2.1 Anatomie und Physiologie des Testis

Der Hoden (Testis) ist ein paarig angelegtes, parenchymatöses Organ und liegt außerhalb der Leibeshöhle im Scrotum, wo eine um etwa 2-3 °C niedrigere Temperatur als die Körpertemperatur herrscht. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für eine normale Spermatogenese dar. Er ist durchschnittlich 4-5cm lang und 3cm breit. Sein Gewicht beträgt zusammen mit dem Nebenhoden (Epididymis), der dem Testis von dorsal anliegt, zwischen 20-30g. In der Regel ist der linke Hoden etwas kleiner und hängt tiefer als der rechte Hoden.

Lateral vom Nebenhoden ist der Testis mit dem Samenstrang (Funiculus spermaticus) verbunden, der aus dem Samenleiter (Ductus deferens), der A. ductus deferentis, den Aa. testiculares, dem Venengeflecht Plexus pampiniformes sowie Lymphgefäßen und Nerven besteht.

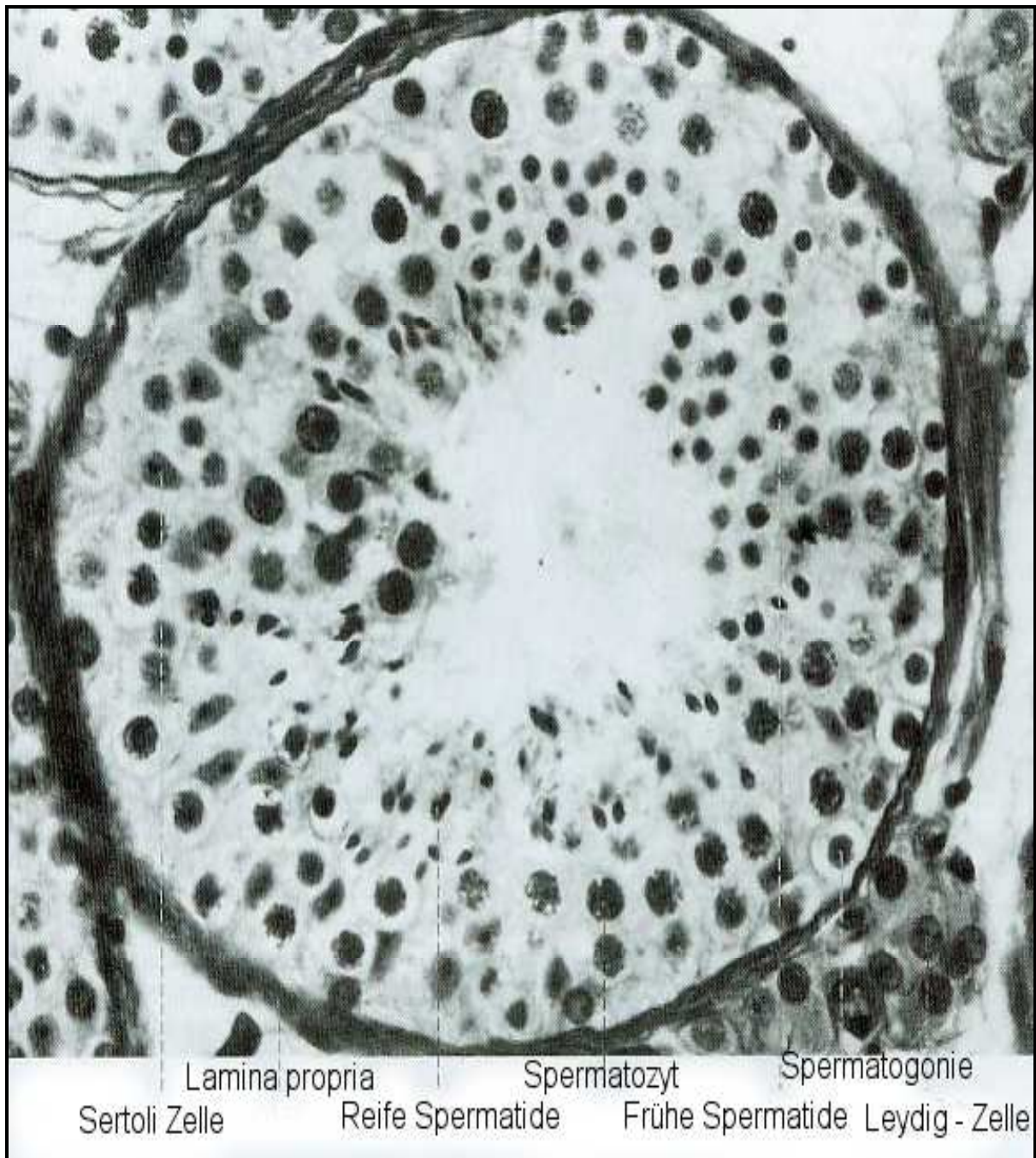
Der Testis ist von der Tunica albuginea, einer derben kollagenfasrigen Kapsel umgeben, der sich von außen das viscerale Blatt der Tunica vaginalis anschließt. Die innere Schicht dieser Kapsel ist besonders reich an Blutgefäßen und wird als Tunica vasculosa bezeichnet. Das Hodenparenchym innerhalb der Kapsel wird durch zarte bindegewebige Septen (Septula testis) in 300-400 Hodenläppchen (Lobuli testis) geteilt, die jeweils 1-4 Samenkanälchen (Tubuli seminiferi) enthalten. Ein Tubulus seminiferus hat einen Durchmesser von ca. 180µm und wird vom Keimepithel ausgekleidet. Das Keimepithel ist 60-80µm hoch und besteht zum einen aus den Sertolizellen, die der Basalmembran aufliegen und ins Lumen reichen. Sie werden auch als Stütz- und Ammenzellen bezeichnet und bilden ein Stützgerüst des Keimepithels. Dieses wird durch tight-junctions zwischen den benachbarten Sertolizellen, die sogenannten Blut-Hodenschranke, in zwei Bereiche unterteilt. Weiter üben sie eine Vielzahl sekretorischer und regulatorischer Funktionen aus. So produzieren sie unter anderem Zytokine, Prostaglandine, Steroide, Wachstumsfaktoren und verschiedene Proteine und sind so durch Erschaffung und

Aufrechterhaltung eines geeigneten Milieus von zentraler Bedeutung für die Spermatogenese (Weinbauer et al., 2009). Zum anderen enthält das Keimepithel die verschiedenen Stadien der Keimzellen, die hier ihre Reifeteilung durchführen und sich zu Samenzellen differenzieren (Spermatogenese). Dabei beginnt die Entwicklung mit den Spermatogonien außen an der Basalmembran der Tubuli. Man unterscheidet Spermatogonien vom Typ A, die als Stammzellen gelten, und vom Typ B, die bereits einen weiterentwickelten Zelltyp darstellen. Die Spermatogonien vom Typ A werden zusätzlich aus zytologischen und physiologischen Gesichtspunkten noch nach A-pale und A-dark unterschieden. Durch ihre mitotische Teilung entwickeln sie sich zu Spermatozyten vom Typ 1 weiter. Es folgt die erste Reifeteilung der Meiose, wobei aus einer Typ 1 Spermatozyte zwei Spermatozyten vom Typ II hervorgehen. Diese treten nach kurzer Zeit in die zweite meiotische Teilung ein. Daraus resultieren Tochterzellen mit einem haploiden Chromosomensatz, die Spermatisden, die sich bereits nahe dem Lumen der Tubuli seminiferi befinden. Die Spermatisden differenzieren sich in der Folgezeit über die Zwischenschritte runde Spermatisde und elongierte Spermatisde zu fertigen Spermatozoen aus.

Die Tubuli seminiferi werden von einer Lamina Propria umgeben, die aus einer Basalmembran, einer Kollagenfaserschicht und konzentrisch um die Tubuli angeordneten Myofibroblasten, den Peritubulärzellen, besteht. Diese zur Kontraktion fähigen Zellen bilden dabei artspezifisch bis zu 6 Lagen. Sie sind unter anderem für die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix sowie von verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren verantwortlich.

Zwischen den einzelnen Tubuli befindet sich ein ausgedehntes interstitielles Gewebe, das aus Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nerven und den testosteronbildenden Leydigzellen aufgebaut ist.

Alle Samenkanälchen münden in das Rete testis, ein Kanälchensystem am Hilum des Hodens, ein. Die Kanäle des Rete testis schließen sich zu etwa einem Dutzend Ductuli efferentes zusammen, welche die Tunica albuginea durchbohren und in den caput epididymidis eintreten. Dort vereinigen sie sich zum Ductus epididymidis, der nach der Nebenhodenpassage in den Ductus deferens übergeht (Holstein, 2008).



**Abbildung 2:** Querschnitt durch einen humanen Tubulus seminiferus. Paraffinschnitt; H.E. ; Vergrößerung 500x (aus Benninghoff, 2008)

### 1.2.2 Aufgabe und Funktion von Peritubulärzellen

Peritubulärzellen sind konzentrisch um die Tubuli angeordnete Myofibroblasten mesenchymaler Herkunft. Im menschlichen Testis bilden die Zellen bis zu 6 Lagen um den Tubulus. Bei den meisten Säugetieren kommen nur 2-4 Schichten vor, beim Nager sind die Myofibroblasten einschichtig angeordnet. Durch die Produktion von Faktoren wie Panaktin, Desmin, Gelsolin, glattem Muskelfasermysin und  $\alpha$ -Aktin sind die Peritubulärzellen zu Kontraktionen fähig (Weinbauer et al., 2009). Bei Ratten konnten peristaltische Kontraktionen des Samenkanälchens nachgewiesen werden, die Tubulusflüssigkeit und Samenfäden distal transportieren (Harris und Nicholson, 1998). Weiter bilden sie Bestandteile der extrazellulären Matrix und verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Hier wären unter anderen IGF-1 (Insulin-like-Growth Factor), TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) und Pmod-S (peritubular cell factor that modulates Sertoli cell function), das modulierend auf die Sertolizellfunktionen wirkt, zu nennen (Skinner et al., 1989; Skinner und Moses, 1989; Norton et al., 1994; Gnessi et al., 1997). Die Proliferation von Peritubulärzellen im Rattentestis nimmt bereits kurz nach der Geburt rapide ab (Palombi et al., 1992).

Die polygonalen Zellen besitzen ausgestreckte Zytoplasmaausläufer und bilden in Kultur flache Monolayer (Anthony und Skinner, 1989).

### 1.2.3 Endokrine Steuerung der Hodenfunktion

Die Funktion des Testis unterliegt neben dem bereits vorgestellten umfangreichen lokalen Steuerungssystem entscheidend einer systemischen, endokrinen Regulation über das Hypothalamus-Hypophysensystem. Das im Hypothalamus gebildete Gonadotropin releasing hormon (GnRH) löst in der Adenohypophyse die Sekretion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) aus. FSH stimuliert verschiedene Sertolizellfunktionen und wirkt so indirekt auf die Spermatogenese ein. LH stimuliert Leydigzellen zur Produktion des Sexualhormons Testosteron. Das Testosteron löst vielfältige systemische Effekte aus und übt durch Interaktion mit Sertolizellen einen indirekten Einfluss auf die Spermiogenese aus. Über negative Feedbackschleifen

wirkt das Sexualhormon im Hypothalamus inhibierend auf die GnRH Freisetzung, unterdrückt in der Hypophyse die Bildung von LH sowie schwächer ausgeprägt auch FSH und hemmt autokrin die Testosteronproduktion in den Leydigzellen (Weinbauer et al., 2009)

### **1.3 Das Kallikrein-Kinin System im Reproduktionstrakt**

Alle Komponenten eines funktionierenden Kallikrein-Kinin-Systems wurden im männlichen und teilweise auch im weiblichen Reproduktionstrakt nachgewiesen (Monsees et al., 2012, 2003, 2002, 1999; Valdes et al., 1993, 1996; Frenette et al., 1997; Saitoh et al., 1987; McDonald et al., 1996; Corthorn et al., 2007). Im Folgenden soll die Verteilung und das Vorkommen der einzelnen Bestandteile des Systems im Testis vorgestellt und schließlich auf die physiologische Bedeutung des Peptidhormonsystems für die Reproduktionsfunktion eingegangen werden.

#### **1.3.1 Kininogenasen**

Das humane Seminalplasma enthält an kininfreisetzenden Kininogenasen neben dem weit verbreiteten Gewebskallikrein verschiedene Leukozyten-Proteinasen sowie die Protease Akrosin, die im Akrosom von Spermatozoen lokalisiert ist. Sie setzt Kinine mit der gleichen Potenz aus Kininogenen frei wie das Kallikrein und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Penetration der Zona pellucida (Moriwaki und Kaneko, 1979). Gewebskallikrein konnte im männlichen humanen Genitaltrakt mit immunhistochemischen Methoden in Sertolizellen, in epididymidalen Epithelzellen sowie in Prostata-drüsenzellen nachgewiesen werden (Saitoh et al., 1987). Bei der Ratte wurde hingegen eine Gewebskallikreinexpression in runden und elongierten Spermatisiden, in testikulären Endothelzellen und lumenseitig in Epithelzellen aus dem Ductus Epididymidis aufgezeigt. Sertolizellen zeigten hier keine positive Reaktion. Die Expression von Gewebskallikrein in Spermatisiden war dabei sowohl abhängig vom Alter des Tieres als auch vom Stadium der Spermatogenese. Gewebskallikrein wurde bei 32 Tage alten Ratten in der akrosomalen Kappe von runden und elongierenden Spermatisiden ab der Entwicklungsstufe 9-10, bei 38 Tagen alten Tieren auch in elongierten Spermatisiden bis zur

Entwicklungsstufe 17 nachgewiesen. Im maturen Rattentestis wurde Kallikrein abhängig vom Spermatogenese - Zyklus in allen Tubulis seminiferi detektiert. Bei praepubertären Ratten zeigte sich hingegen im Keimepithel keine Expression von Kallikrein. Im Gegensatz dazu fand sich in Peritubulärzellen bei adulten Ratten kein Gewebeskallikrein, bei praepubertären Ratten hingegen konnte zumindest eine schwache positive Reaktion beobachtet werden (Monsees, 2003). Im weiblichen Genitaltrakt fand sich eine Expression von Gewebeskallikrein im Uterus (Valdes et al., 1993, 1996; Corthorn et al., 2007). Die Kininogenasen befinden sich in einem Gleichgewicht mit verschiedenen Proteaseinhibitoren, die eine überschießende proteolytische Aktivität und damit Entzündungsreaktionen verhindern. Akrosin liegt im Seminalplasma überwiegend als Komplex mit seinem natürlichen, spezifischen Inhibitor Akrostatin vor, welches zu den säurestabilen LMW-Proteinase-Inhibitoren gehört, die in hoher Konzentration im Seminalplasma vorhanden sind. Des Weiteren konnte ein intraakrosomaler Akrosin-Inhibitor identifiziert werden (Tschesche et al., 1982). Wichtigster Inhibitor des Kallikrein ist der  $\alpha$ 1-Proteinase-Inhibitor, der das Kallikrein allerdings nicht mit sofortiger Wirkung inaktiviert.

### 1.3.2 Kininogene

Die Freisetzung der Kinine durch Kallikrein geschieht aus Vorläuferproteinen, die zusammenfassend als Kininogene bezeichnet werden. Während Kininogene hauptsächlich in der Leber synthetisiert und systemisch über die Blutbahn im Körper verteilt werden, zeigt sich im Testis und in einer Reihe von anderen Organen auch eine lokale LMWK (low molecular weight kininogen) Expression (Takano et al., 1997, 2000). Innerhalb des Testis wurde LMWK an der akrosomalen Kappe von runden und elongierten Spermatischen, an Peritubulärzellen sowie auch an Endothel- und Muskelzellen von Blutgefäßen des Interstitiums lokalisiert (Monsees, 2003).

### 1.3.3 Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptor

Eine Expression von Bradykinin B<sub>2</sub> Rezeptor RNA konnte bei adulten Ratten durch den



Einsatz von RT-PCR für Testis, Epididymidis und die Prostata nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich die ausgeprägteste B<sub>2</sub>R Expression im Epididymidis, gefolgt von der Prostata. Der Testis weist die geringste RNA Menge auf (Monsees et al., 2003). Im Testis von praepubertären Ratten findet sich der B<sub>2</sub> Rezeptor in pachytenen Spermatozyten, in Leydigzellen und in Peritubulärzellen. Bei adulten Ratten ist die Expression abhängig vom Stadium der Spermatogenese. Während in den frühen Stadien II und III nur elongierte Spermatisden einen B<sub>2</sub> Rezeptor tragen, findet sich der Rezeptor im Stadium XIII bei runden und elongierten Spermatisden, sowie bei pachytenen Spermatozyten. An Peritubulär- und Leydigzellen konnte bei adulten Ratten der B<sub>2</sub> Rezeptor dagegen nicht mehr nachgewiesen werden (Monsees et al., 2003).

#### 1.3.4 Kininasen

Neben der Bildung von Kininen findet eine ständige Inaktivierung der Effektoren durch verschiedene proteolytische Enzyme, den Kininasen, statt. Einen wichtigen Vertreter im Seminalplasma stellt die Kininase II dar, die identisch mit dem Angiotensin-I-converting-enzyme (ACE) ist. Die Kininase II im Seminalplasma stammt zu 70% aus der Prostata, der Rest aus Hoden und Nebenhoden (Krassnigg et al., 1989). Durch den Einsatz spezifischer Kininaseinhibitoren konnten als weitere wichtige Vertreter im Seminalplasma die neutrale Metalloendopeptidase (Erdös et al., 1985), die auch Kininase I genannte Carboxypeptidase N (Sheikh und Kaplan, 1986), die Aminopeptidase P (Guimaraes et al., 1973) sowie das post proline cleaving enzyme (Sudo und Tanabe, 1984) identifiziert werden. Vergleiche zwischen dem Bradykininabbau bei direktem Kontakt mit Sertolizellen und dem Abbau im konditionierten, zellfreien Kulturüberstand zeigten, dass die Kininasen an die Zellmembranen von Sertolizellen gebunden sind und mit den Kininrezeptoren um die Kinine konkurrieren (Monsees et al., 1996). Auch bei Peritubulärzellen konnten membranständige Proteasen nachgewiesen und mittels HPLC (high performance liquid chromatography) identifiziert werden (Kos 2001; Monsees et al., 1996, 1997, 1998).

### 1.3.5 Peritubulärzellen und das Kallikrein-Kinin System

Zusammenfassend lassen sich Peritubulärzellen als kontraktile Myofibroblasten, die konzentrisch um die Tubuli seminiferi angeordnet sind, beschreiben. Zu ihren Aufgaben gehören unter anderem die Synthese und Sekretion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix sowie die Bildung verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie Insulin-like-Growthfactor (IGF-1), TGF- $\beta$  und Pmod-S. Sie spielen dadurch eine wichtige Rolle in der parakrinen Regulation für Leydig- und Sertolizellen. Bei Peritubulärzellen praepubertärer Ratten konnten sowohl B<sub>2</sub> Rezeptor Protein als auch B<sub>2</sub>R mRNA detektiert werden (Monsees et al., 2003). Weiter konnte eine Funktionsfähigkeit des Rezeptors nachgewiesen werden. Nach Stimulation des Rezeptors mit Bradykinin zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration. Mehrfache Stimulation des Rezeptors führte zu einer Desensibilisierung (Wenemuth et al., 2003). Auch die Kininogenase Gewebskallikrein konnte in praepubertären Peritubulärzellen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch zeigte sich hier eine schwache Anfärbung für Gewebskallikrein. Bei adulten Ratten konnten hier jedoch weder der B<sub>2</sub> Rezeptor noch Gewebskallikrein mehr nachgewiesen werden (Monsees et al., 2003). Als weitere Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems wurden mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) kininabbauende membranständige Kininasen identifiziert. Zu nennen sind hier vor allem die Kininase I, die Kininase II und die neutrale Metalloendoprotease (Kos 2001).

### 1.3.6 Physiologische Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems im Reproduktionsgeschehen

Eine Reihe der bisherigen Studien und Ergebnisse weist auf eine mögliche Beteiligung des Kallikrein-Kinin-Systems an der männlichen und auch weiblichen Reproduktionsfunktion hin (Belleannee et al., 2009; Pierucci-Alves und Schultz., 2008; Atanassova, 2003; Ohkuru et al., 2003; Buchinger und Rehbock, 1999; Schill und Haberland, 1974; Schill, 1979; Schill et al., 1979, 1980; Schill und Rjosk, 1979; Saitoh et al., 1989; Rohen und Stuttmann., 1977).

Wie zuvor erörtert, konnten als Grundvoraussetzung für eine Funktion des Peptidhormonsystems im Reproduktionsgeschehen sowohl im männlichen als auch im weiblichen Genitaltrakt alle Bestandteile gefunden werden, die für ein funktionierendes Kallikrein - Kinin -System notwendig sind.

Durch die Blut-Hoden-Schranke ist der luminale Bereich der Samenkanälchen effektiv gegen hydrophile Substanzen abgeschirmt. Daher unterstreicht die lokale Expression von Kininogenen, Kininogenasen und Kininasen die Funktionalität des Gewebeskallikrein-Kinin Systems als lokales Hormonsystem im Testis.

Wie bereits geschildert, zeigt die Expression der verschiedenen Komponenten des Gewebeskallikrein-Kinin Systems (vor allem von Gewebeskallikrein sowie vom Bradykinin 2 Rezeptor ( $B_2R$ )) eine starke Variabilität in Abhängigkeit sowohl vom Alter der Tiere als auch vom Spermatogenese Stadium. Dies lässt eine Beteiligung des Systems an der Regulation der Spermatogenese vermuten.

Der mögliche Einfluss des Kallikrein - Kinin -Systems auf die Regulation der Spermatogenese wird weiter durch die Tatsache gestützt, dass Kinine in vielen Organen und Zelltypen eine mitogene Wirkung ausüben. So konnte schon in den 70er Jahren gezeigt werden, dass Gewebeskallikrein in Duodenum und Jejunum die mitotische Aktivität signifikant steigern kann (Rohen und Peterhoff, 1972). Im Folgenden konnte eine mitogene Wirkung des Kallikrein-Kinin-Systems unter anderem bei basalen Epithelzellen der Rattenzunge und bei Knochenmarkszellen (Löbbecke, 1972), bei Fibroblasten, Keratinozyten, Thermozyten, glatten Muskelzellen sowie bei Zellen im Endometrium und Mesangium nachgewiesen werden (Überblick in Walsh und Fan, 1997). Die Wirkung scheint dabei in der Regel durch Aktivierung des  $B_2$  Rezeptors induziert zu werden (Bathon et al., 1992; Kiehne und Rozengurt, 1994; Menke et al., 1994; Roberts und Gullick, 1989). Es fanden sich aber Hinweise auf Fälle, in denen auch der  $B_1$  Subtype in die Steuerung von Mitosevorgängen involviert ist (Marceau and Tremblay, 1986; Tiffany and Burch, 1989).

Im weiblichen Reproduktionstrakt konnte eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der Regulation der Embryoimplantation sowie der Follikel- und Uteruskontraktion aufgezeigt werden (Ohkura et al., 2003).

1974 konnten Schill und Haberland einen direkten Einfluss des KKS auf die männliche

Reproduktionsfunktion nachweisen, indem sie zeigten, dass die Zugabe von Kallikrein *in vitro* die Motilität von humanen, ejakulierten Spermatozoen signifikant steigerte (Schill und Haberland, 1974). Bei Ratten führte eine Applikation von Kallikrein *in vitro* ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl an Spermatozoen (Rohen und Stuttmann, 1977), zu einem Anstieg der ABP- (androgen binding protein) Konzentration (Saitoh et al., 1989) und zu einer Aktivierung von Sertoli-Zellfunktionen (Rohen und Buschhüter, 1975). Weiterhin konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass Kinine in testikulären Organkulturen Spermatogonien von praepubertären Ratten zu einer Proliferation anregen (Atanassova, 2003).

Im Ductus deferens kann Bradykinin eine Kontraktion von glatten Muskelzellen induzieren und die Prostaglandinproduktion anregen (Peredo und Celoch, 2001). Neuere Studien zeigten weiter einen Einfluss auf den Aquaporin 9 abhängigen Flüssigkeitseinstrom in Epididymis und Ductus deferens der Ratte (Belleannee et al., 2009). Auch konnte ein durch Bradykinin getriggertem Ionenstromtransport im humanen Ductus deferens und beim Schwein nachgewiesen werden (Pierucci-Alves et al., 2008).

Im Gegensatz zu der eindeutigen Beeinflussung der männlichen Reproduktionsfunktion durch das Kallikrein-Kininsystem *in vitro* kamen verschiedene klinische Studien zur Wirksamkeit einer Kallikreinthherapie bei der Behandlung von Männern mit idiopathischen Fertilitätsstörungen zu kontroversen Ergebnissen. Bei einer 1979 durchgeführten Doppelblindstudie wurden männliche Probanden, die eine Asthenozoospermie (reduzierte Motilität der Spermien) bzw. Oligozoospermie (reduzierte Spermienzahl) aufwiesen, über 3 Monate mit Padutin (Wirkstoff: Kallikrein; Bayer, Deutschland) behandelt. Dabei konnte eine signifikante Verbesserung von Spermienmotilität und -zahl erreicht werden. Auch die Konzeptionsrate innerhalb eines Jahres stieg signifikant an (Schill, 1979). Bei einer weiteren placebokontrollierten Doppelblindstudie mit 58 Patienten konnte auch eine Hemmung des Kininabbaus durch den potenten ACE Inhibitor Captopril eine deutliche Erhöhung der Spermienzahl bewirken. Spermienmotilität und Konzeptionsraten zeigten allerdings keine statistisch fassbaren Differenzen (Parsch und Schill, 1988). Die unveränderte Konzeptionsrate kann möglicherweise durch die Beobachtung, dass Captopril auch die Bindung von Spermien an das Oolemma blockiert, erklärt werden (Köhn et al., 1998).

---

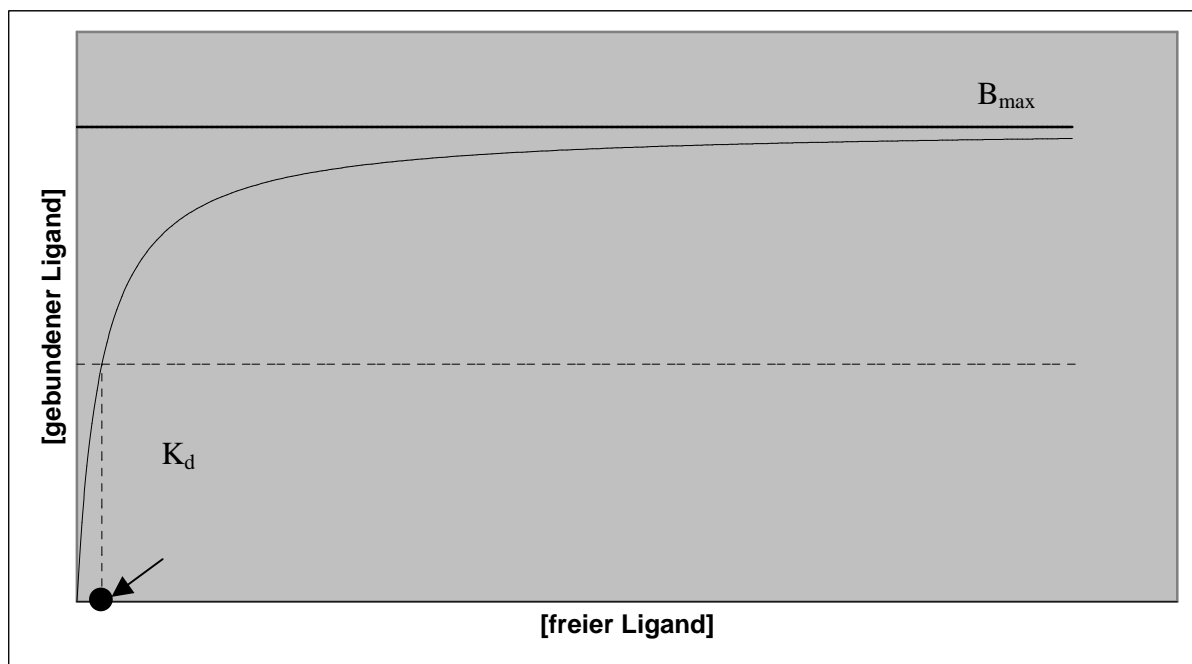
Leider konnten neuere, großangelegte Studien den positiven Effekt einer Kallikreintherapie auf die Seminalparameter und die Konzeptionsrate im Regelfall nicht bestätigen, obwohl es auch hier durchaus einzelne „Responder“ gab (Keck et al., 1994; Yamamoto et al., 1996; Gletzerman et al., 1993). Aus diesem Grund wurde Padutin nur noch selten eingesetzt und 2001 vom deutschen Markt zurückgezogen.

Letzlich gibt es eine Vielzahl an Hinweisen für eine Beteiligung des KKS am Reproduktionsgeschehen. Durch den Nachweis, dass B<sub>1</sub>R und B<sub>2</sub>R Knockout Mäuse fertil sind (Borkowski et al., 1995; Cayla et al., 2007; Pesquero et al., 2000) scheint es unter normalen Bedingungen jedoch nicht essentiell für den Reproduktionsprozess zu sein.

#### 1.4 Theoretische Grundlagen der Rezeptorpharmakologie

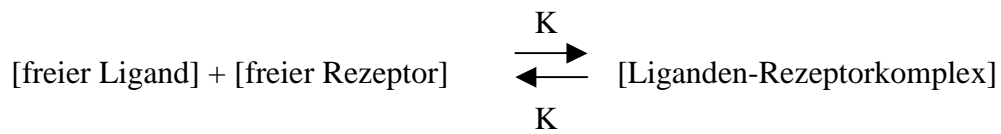
Grundvoraussetzung für die Aktivierung eines Rezeptors durch einen Liganden ist zunächst die Bindung des Liganden an den Rezeptor. Diese Bindung ist sättigbar und in der Regel reversibel. Die Interaktion von Ligand und Rezeptor kann durch die Parameter  $B_{\max}$  und  $K_d$  charakterisiert werden.  $B_{\max}$  beschreibt dabei die maximale Bindungskapazität, also die maximale Konzentration an Bindungsstellen, die Dissoziationskonstante  $K_d$  stellt ein Maß für die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor dar.

Bei Sättigungsexperimenten wird ein Bindungsprotein mit ansteigenden Mengen eines markierten Liganden inkubiert, im Anschluß wird die Menge des spezifisch gebundenen Liganden als Funktion von der Ligandenkonzentration ermittelt.



**Abbildung 3:** Typische hyperbolische Bindungskurve bei Sättigungsexperimenten mit Bindung an einer Bindungsstelle. Eingezeichnet sind die Dissoziationskonstante  $K_d$  und die maximale Rezeptorkonzentration  $B_{\max}$ .

Nach dem 1867 von Cato Maximilian Guldberg eingeführten Massenwirkungsgesetz gilt im Gleichgewicht:



$$K_d = K_2/K_1 = [\text{freier Ligand}] + [\text{freier Rezeptor}] / [\text{Liganden-Rezeptorkomplex}]$$

Die maximale Rezeptorkonzentration ergibt sich aus der Summe der Konzentration der gebundenen und freien Rezeptoren. Es gilt also weiter:

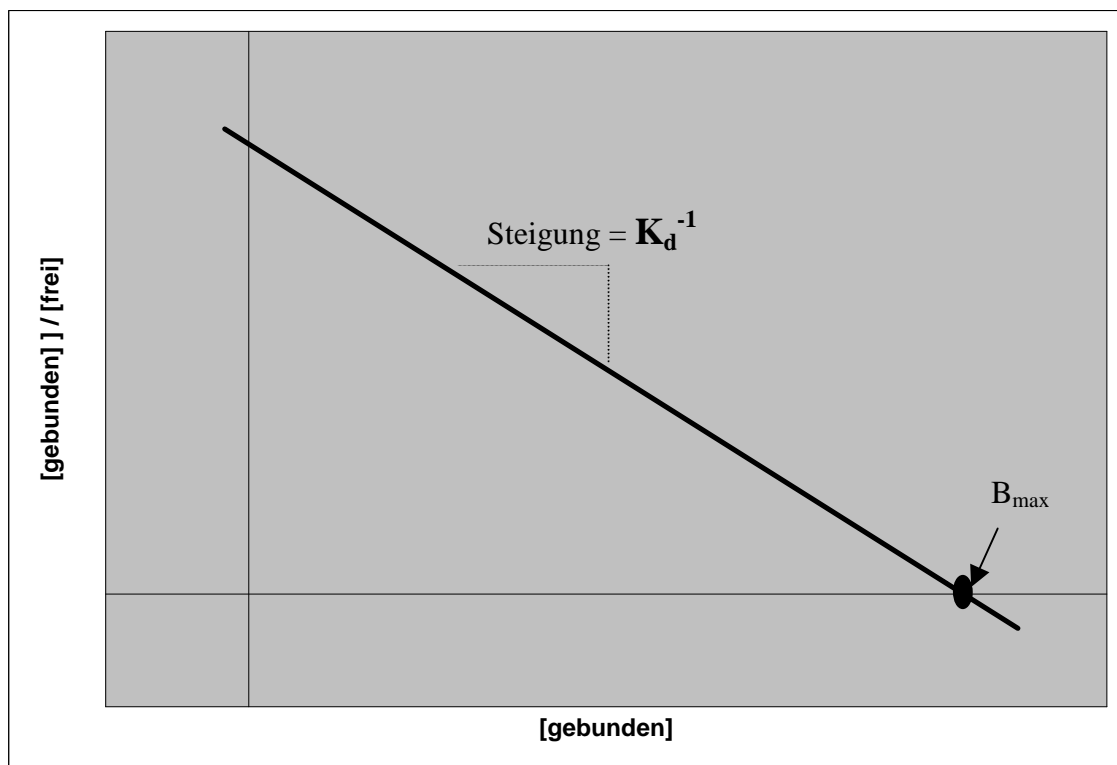
$$B_{\max} = [\text{freier Rezeptor}] + [\text{Liganden-Rezeptorkomplex}] = [\text{freier Rezeptor}] + [\text{gebundener Ligand}]$$

Aus der Kombination der beiden Formeln resultiert die sogenannte Scatchard Gleichung:

$$[\text{gebundener Ligand}] / [\text{freier Ligand}] = - K_d^{-1} \times [\text{gebundener Ligand}] + B_{\max} / K_d$$

Trägt man die experimentellen Daten in der Form  $[\text{gebundener Ligand}] / [\text{freier Ligand}]$  gegen  $[\text{gebundener Ligand}]$  auf, erhält man eine Gerade, den Scatchard Plot.  $K_d$  entspricht dabei dem Reziprokwert der Steigung der Geraden.  $B_{\max}$  ergibt sich aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Gerade mit der x Achse ( $[\text{gebundener Ligand}]$ ).

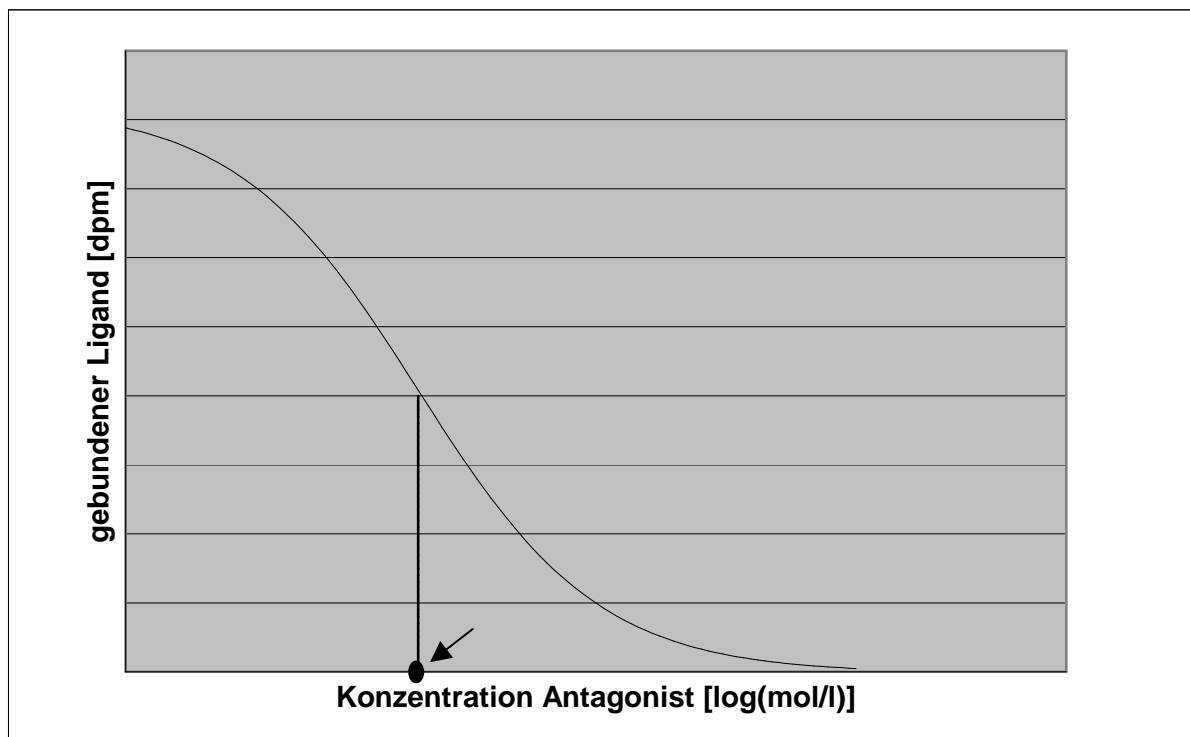
Den Auftrag  $\log(B/B_{\max}-B)$  gegen  $\log L$  nennt man Hill Plot. Die Steigung der Kurve bei halbmaximaler Sättigung heißt Hill Koeffizient. Bei Bindung an einer einzigen Bindungsstelle liefert der Hill Plot eine Gerade mit der Steigung 1. Der Hill Koeffizient ist in diesem Fall also 1.



**Abbildung 4:** Typischer Scatchard-Plot bei Sättigungsexperimenten mit Bindung an einer Bindungsstelle. Die Schnittstelle zwischen der Ausgleichsgeraden und der x-Achse entspricht  $B_{\max}$ .  $K_d$  ergibt sich aus dem Reziprokwert der Steigung der Ausgleichsgeraden.



Gebundene Liganden lassen sich durch Einsatz von Rezeptorantagonisten von der Bindung zum Rezeptor verdrängen. Die mittlere Hemmkonzentration  $IC_{50}$  entspricht der Wirkkonzentration des Antagonisten, bei der die Messgröße um 50% im Vergleich zur Kontrolle abgenommen hat (Rehm, 2002).



**Abbildung 5:** Typische Verdrängungskurve bei Verdrängung des Liganden durch Einsatz eines Antagonisten. Eingezeichnet ist die mittlere Hemmkonzentration  $IC_{50}$ . Sie entspricht der Konzentration des Antagonisten, bei der eine halbmaximale Inhibition erreicht wird.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Eine Reihe von Aspekten spricht für eine Beteiligung des Kallikrein-Kinin Systems an der männlichen Reproduktionsfunktion. So konnten alle wesentlichen Komponenten eines Gewebeskallikrein-Kinin Systems im Genitaltrakt des Mannes nachgewiesen werden. Die Expression verschiedener Bestandteile des Peptidhormonsystems zeigte sich bei der Ratte dabei sowohl abhängig vom Entwicklungsstadium der Tiere als auch vom Stadium der Spermatogenese. Weitere Untersuchungen belegen zudem einen Einfluss des Kallikrein-Kinin Systems auf physiologische Vorgänge und Seminalparameter. Obwohl über die genauen Zusammenhänge bis heute nicht viel bekannt ist, wurde Gewebeskallikrein als Medikament bei Männern mit subnormaler Fertilität in der andrologischen Praxis eingesetzt.

Ziel der Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die Aufgabe und Bedeutung des Kallikrein-Kinin Systems am Reproduktionsgeschehen zu gewinnen. Als Modell für die Versuche wurden die Peritubulärzellen von präpubertären Ratten gewählt, weil diese zum einen den B<sub>2</sub> Rezeptor und auch Gewebeskallikrein exprimieren. Zum anderen lassen sie sich in sehr reiner Form und verhältnismäßig leicht isolieren.

Zunächst sollten mögliche, an den B<sub>2</sub> Rezeptor gekoppelte, Signaltransduktionswege in Peritubulärzellen aus dem Rattenhoden identifiziert werden. In bereits existierenden Untersuchungen wurde ein B<sub>2</sub>R vermittelter signifikanter Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration nach nanomolarer Stimulation mit Bradykinin nachgewiesen. Als Gegenstand der aktuellen Arbeit boten sich somit in erster Linie eng mit der Ca<sup>2+</sup> Konzentration verknüpfte Signaltransduktionspfade wie das NO / cGMP und das Phospholipase C $\beta$  / IP<sub>3</sub> System an. Weiter sollte das ebenfalls in Wechselwirkung mit Calciumionen stehende Adenylatcyclase / cAMP System untersucht werden. Da auch ein enger Zusammenhang der genannten Signalkaskaden mit der Aktivität verschiedener Protein-kinasen besteht, überprüften wir weiter, inwieweit sich das Phosphorylierungsmuster der Zellproteine nach Stimulation mit Bradykinin ändert.

Neben den Untersuchungen zur Signaltransduktion war ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit die pharmakologische Charakterisierung des bereits nachgewiesenen B<sub>2</sub>

---

Rezeptors. Ziel dabei war die Ermittlung von pharmakologischen Kenngrößen wie der Dissoziationskonstante  $K_d$  und der maximalen Rezeptordichte  $B_{max}$ . Auch sollte die Existenz von weiteren Bradykinin Bindungsstellen, wie beispielsweise das Vorhandensein von  $B_1$  Rezeptoren, überprüft werden.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle allgemein verwendeten Reagenzien und Chemikalien waren von höchstverfügbarem Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Buchler, Braunschweig

Biochrom, Berlin

BIO-RAD, Hercules, California, USA

Dako, Hamburg

Gibco BRL-Bethesda Research Laboratories, Eggenstein

Merck, Darmstadt

PAA, Cölbe

Serva, Heidelberg

Sigma, Taufkirchen

Roche, Mannheim

Roth, Karlsruhe

Bezugsquellen für spezielle Reagenzien wie spezifische Antikörper oder radioaktive Tracer werden bei den jeweiligen Anwendungen angegeben. Das im Folgenden mit „A. dest.“ bezeichnete Wasser wurde mit einer Millipore-Reinwasseranlage aufbereitet (Milli-RO 10 Plus-Ionenaustauscher zur Vorreinigung, verbunden mit einer Milli Q UF-Plus-Umkehrosiose Anlage; Millipore, Eschborn).

### 2.1.2 Kits

D-myo-Inositol 1,4,5-triphosphate [<sup>3</sup>H] Biotrak assay system, Amersham Buchler, Braunschweig

ECL Western blotting detection reagent and analysis system, Amersham Buchler, Braunschweig

CyclicAMP (low pH) Immunoassay, R&D Systems, Wiesbaden

CyclicGMP (low pH) Immunoassay, R&D Systems, Wiesbaden

### 2.1.3 Geräte

Begasungsbrutschrank      B 5060 EK/CO<sub>2</sub>, Heraeus Instruments, Hanau

β-Szintillationscounter      LS 500 TD, Beckman, München

Elisa Reader      Sunrise, Tecan, Männedorf

Invertmikroskop      Axiovert 35, Zeiss, Jena

Sterilbank Klasse 2      8511 Klasse 2, Kötterman, Uetze

Weiter wurden die im Labor vorhandenen Standardgeräte verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Bei allen durchgeführten Versuchen zur Signaltransduktion und Pharmakologie des B<sub>2</sub> Rezeptors von Peritubulärzellen wurden ausschließlich aus Rattenhodens isolierte Primärkulturen verwendet. Auf den Einsatz immortalisierter Peritubulär – Zelllinien (Hoeben et al., 1995) wurde verzichtet, da durch die Immortalisierung einige Charakteristika der Primärkulturen verloren gehen und zudem der Umgang mit solchen Zelllinien erhöhte Sicherheitsanforderungen an das Labor stellt.

#### **2.2.1.1. Präparation von Primärkulturen der Peritubulärzellen**

Die verwendeten Primärkulturen wurden aus den Hoden von praepubertären (Alter: 18-21 Tage) Sprague-Dawley Ratten nach etabliertem Protokoll (Wennemuth et al., 2000) isoliert. Dazu wurden die Ratten in eine Plastikbox mit Deckel gesetzt, in die CO<sub>2</sub> über einen Kunststoffschlauch eingeleitet wurde. Der Tod der Ratten trat nach wenigen Minuten über die Phasen Schnappatmung – Atempause – Hechelatmung ein. Nachdem sichergestellt war, dass die Ratten tot waren, wurden sie zur Oberflächendesinfektion in ein Becherglas mit 70%igen Ethanol überführt und für fünf Minuten darin belassen. Zunächst wurde die Bauchdecke mit einem V-förmigen Schnitt vom Beckenkamm bis zum Rippenbogen geöffnet (s. Abbildung 6).

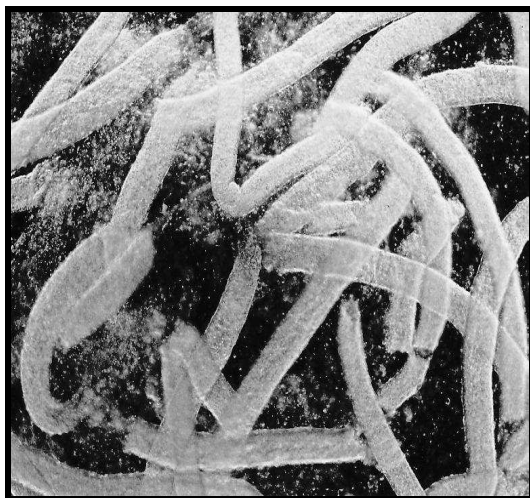


**Abbildung 6:** Entnahme der Hoden

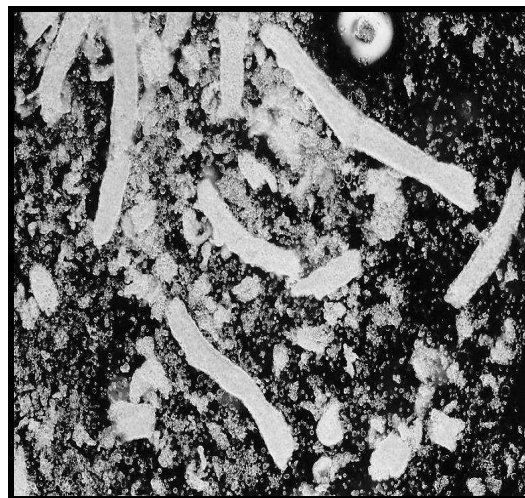
Durch leichten Druck ließen sich die Hoden nun nach oben schieben, mit einem neuen Präparierbesteck entnehmen und in eine Petrischale mit PBS (Dulbecco's PBS) überführen. Die Testes wurden nun in eine Schale mit 70% Alkohol gegeben und sofort danach in zwei weiteren Petrischalen mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte der Präparation erfolgten unter der Sterilbank (Köttermann Nr. 8511, Uetze-Hönigsen). Anschließend wurde das testikuläre Gewebe von der Tunica albuginea befreit, mit einer Pinzette verkleinert und in ein 50ml Falcon Röhrchen mit dem Isolationsmedium M1 (0,25% Trypsin und 0,001% DNase I in PBS; durch 0,2µm Spritzenfilter steril filtriert) gegeben und bei 34°C im Schüttelwasserbad 30 – 50 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die Tubuli seminiferi aus ihrem Gewebeverbund zu lösen. Dabei wurde der Zustand der Tubuli regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert, da die Inkubationszeiten variabel waren. Die Inkubation wurde beendet, wenn die Tubuli etwas verkürzt und gestreckt vorlagen (Abbildung 7 und 8). Es folgten zwei Spülschritte mit steril filtrierten Isolationsmedien M2 und M3 (M2: 1% Trypsininhibitor aus Sojabohnen in PBS; M3: 0,25% Trypsininhibitor aus Sojabohnen in PBS) und anschließend sechs weitere nur mit PBS. Dazu wurde jeweils 10-20 Minuten bei Raumtemperatur bis zum Sedimentieren der Tubuli gewartet (Mikroskopkontrolle) und der Überstand mit den Leydigzellen abgesaugt. Um die Peritubulärzellen von den Tubuli abzutrennen, folgte eine 10 – 20minütige Inkubation mit Isolationsmedium M4 (0,2% Hyaluronidase, 0,2% Collagenase und 0,001% DNase in PBS) im

Schüttelwasserbad bei 34°C. Auch dieser Verdau erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle bis sich die Peritubulärzellen ablösten und die Tubuli eine unregelmäßige Oberfläche entwickelten (Abbildung 9 und 10).

Anschließend wurde der die Peritubulärzellen enthaltende Überstand abgenommen, in ein neues Falconröhrchen überführt und mit Kulturmedium (RPMI 1640 Medium + 10% fetales Kälberserum + Penicillin / Streptomycin) aufgefüllt. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 500 x g. Das resultierende Pellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert und die Suspension auf 250ml Zellkulturflaschen, die bereits mit 23ml Kulturmedium aufgefüllt waren, verteilt. Die Kultur der isolierten Peritubulärzellen fand in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank statt.

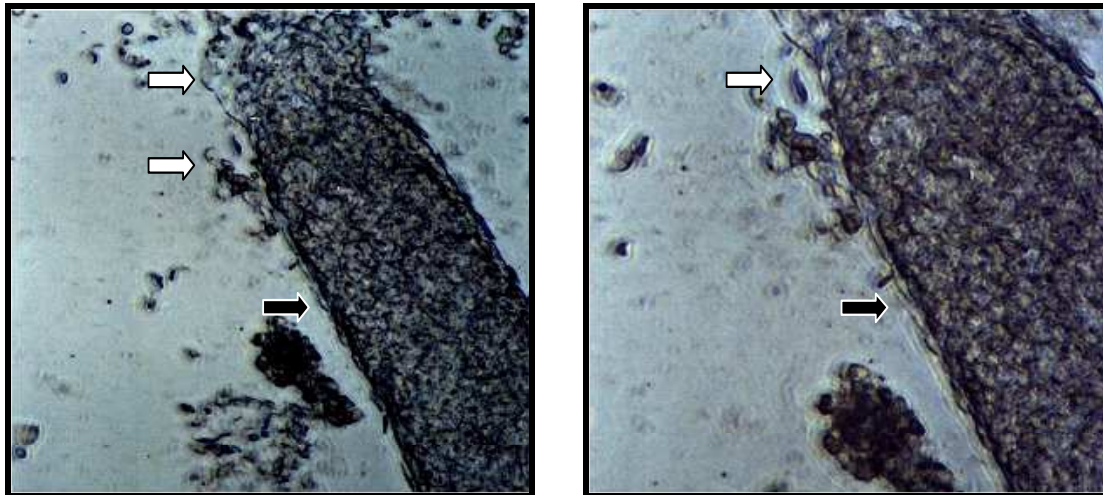


**Abbildung 7:** Die Testissuspension vor Verdau mit 0,25%Trypsin und 0,001%DNAase in PBS. Die Tubuli sind noch im Zellverband verankert (X 10;).



**Abbildung 8:** Die Tubuli Seminiferi nach Verdau mit 0,25% Trypsin und 0,001%DNAase in PBS. Die Tubuli liegen gestreckt und verkürzt vor (X 10).





**Abbildung 9 und 10:** Die Tubuli seminiferi nach Verdau mit 0,2% Hyaluronidase, 0,2% Collagenase und 0,001% DNase in PBS. Die Oberfläche der Tubuli ist aufgeraut (schwarze Pfeile), Peritubulärzellen lösen sich ab (weiße Pfeile). (X 32 links, X 40 rechts)

### 2.2.1.2. Passagieren von Peritubulärzellkulturen

Nach 3 bis 5 Tagen bildete sich ein konfluenter Zellrasen aus und die Kulturen konnten passagiert werden. Bei einer Passage werden die Zellen proteolytisch abgelöst, auf neue Kulturgefäße verteilt und wieder bis zur Konfluenz kultiviert. Dadurch erhält man zum einen pro präpariertem Testis eine größere Menge Zellen, die für Versuche eingesetzt werden können, und reduziert somit die Zahl der zu tötenden Ratten. Zum anderen erhöht sich bei diesem Vorgang die Reinheit der Kultur, da während des Passagierens eventuell noch verbleibende Spermatogenezellen abgelöst und eliminiert werden.

Bei einer Passage wurde zunächst das alte Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 10ml PBS pro Flasche gespült. Anschließend wurde in jede Flasche 3ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) gegeben. Dabei war es wichtig, die Lösung nicht direkt über den Zellrasen laufen zu lassen. Die Flaschen wurden nun kurz geschwenkt und das Trypsin wieder abgesaugt. Nach 4 bis 5 Minuten (Mikroskop Kontrolle) Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen mit 10ml PBS pro Flasche resuspendiert und auf bereitgestellte, mit Medium gefüllte, Kulturgefäße verteilt. Nach weiteren 3 bis 5 Tagen im Brutschrank konnten die Peritubulärzellen

erneut passagiert werden. Für die Versuche wurden ausschließlich Kulturen der 2. Passage eingesetzt, da zu diesem Zeitpunkt eine ausreichende Reinheit erreicht worden war (s. Kapitel 3.1.1) und das Wachstumsverhalten der Zellen andererseits ab der 3. Passage stark nachgelassen hatte. Weiterhin konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bei weiteren Passagen eine gewisse Entdifferenzierung auftreten würde.

#### **2.2.1.3. Einfrieren von Peritubulärzellen**

In der Regel wurden die kultivierten Peritubulärzellen direkt für die Versuche verwendet. Falls dennoch mehr Zellen als gerade benötigt vorhanden waren, wurden diese eingefroren. Dazu wurden die Zellen durch eine Behandlung mit Trypsin analog der bei dem Passagieren verwendeten Prozedur (s. 2.2.1.2.) abgelöst. Die Resuspension erfolgte in 1ml Einfriermedium (70% RPMI 1640 Medium, 20% fetales Kälberserum und 10%DMSO). Die Zellen wurden nun für 24 Stunden in einer Styroporbox bei  $80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im Anschluss wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.1.4. Auftauen eingefrorener Peritubulärzellen**

Die gefrorenen Peritubulärzellen wurden im Kryoröhrchen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  solange aufgetaut, bis gerade noch einige Eiskristalle zu sehen waren. Die Suspension wurde in ein 15ml Falconröhrchen transferiert und mit Kulturmedium aufgefüllt. Es folgte eine 5minütige Zentrifugation bei  $500 \times g$ . Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Pellet in Kulturmedium resuspendiert und wie bei einer Passage auf geeignete vorbereitete Kulturgefäße verteilt. Die Kultur erfolgte weiterhin in einer 5%igen  $\text{CO}_2$  Atmosphäre bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank.

### **2.2.1.5. Reinheitskontrolle durch Immuncytochemie zum Nachweis von $\alpha$ - smooth muscle Isoactin**

Da Peritubulärzellen als einzige Zellen der Tubuli seminiferi das  $\alpha$  – Isoactin exprimieren, eignet sich ein immuncytochemischer Nachweis von  $\alpha$  – smooth muscle Isoactin gut als Reinheitskontrolle für eine Peritubulärzellkultur. Verwendet wurde ein monoklonaler IgG Antikörper von der Maus (Maus anti-human, Dako) in Kombination mit einem gegen die Maus gerichteten HRP-(=Meerrettichperoxidase) konjugierten Zweitantikörper. Als Negativkontrolle wurde statt des Erstantikörpers Mausserum verwendet. Für die immuncytochemische Untersuchung wurden die Peritubulärzellen nach der 2. Passage in 24er Well Platten (Primaria) ausgesät und kultiviert. Nachdem sie die Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen zuerst fixiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch eiskaltes Methanol ersetzt. Dieses wurde im Eisschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten auf den Zellen belassen und anschließend abgesaugt. Die Kulturplatten mit den Zellen konnten in Alufolie verpackt und bis zur Untersuchung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die Arbeitsschritte des immuncytochemischen Nachweises sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Immuncytochemischer Nachweis von  $\alpha$  Isoactin in glatter Muskulatur

Behandlung	Reagentien	Volumen	Dauer
Waschen in Puffer	TBS	Boden bedeckt	2 x 10 Minuten
Blockierung endogener Peptidasen	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	""	15 Minuten
Waschen in Puffer	TBS	""	3 x 5 Minuten
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	Blockierlösung mit Casein	""	10 Minuten
Inkubation mit dem 1. Antikörper	Anti - $\alpha$ - Isoactin 1:1000 in TBS	0,5ml / Well	Über Nacht bei 4°C
Negativkontrolle	Mausserum 1:1000 in TBS	""	""
Waschen in Puffer	TBS	Boden bedeckt	3 x 5 Minuten
Inkubation mit dem 2. Antikörper	Anti Maus – HRP 1:200 in TBS	0,5ml / Well	45 Minuten
Waschen in Puffer	TBS	Boden bedeckt	2 x 5 Minuten
Waschen in Puffer	Tris / HCL (pH 7,5)	""	5 Minuten
Nachweisreaktion	1 Tablette DAB in 15ml Tris / HCL (pH 7,5) + 12ul 30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1ml / Well	3 Minuten
Kernfärbung	Hämatoxilin n. Mayer	1ml / Well	15 Minuten
Abspülen des Hämatoxilin	Leitungswasser	volles Well	3 x 3 Minuten
Spülen	A. dest	volles Well	30 Sekunden
Waschen in Puffer	TBS	1ml / Well	30 Sekunden
Abspülen des Substrates	A. dest	volles Well	3 Minuten

## 2.2.2 Untersuchungen zur Signaltransduktion des B<sub>2</sub> Rezeptors

### 2.2.2.1 cAMP

Für die Versuche zur cAMP Produktion nach Aktivierung des B<sub>2</sub>R wurden in 6er Well Schalen (Primaria) kultivierte Peritubulärzellen in der zweiten Passage eingesetzt. 24 Stunden vor Versuchsanfang wurde begonnen, die Zellen auf serumfreie Bedingungen zu adaptieren, da die genaue Zusammensetzung von FCS (fetales Kälberserum) nicht bekannt ist, und nicht ausgeschlossen werden kann, dass es störende Substanzen, wie z.B. auch Bestandteile des Kallikrein – Kinin Systems enthält. Dazu wurde das serumhaltige Nährmedium abgesaugt und durch dasselbe Nährmedium mit geringerem Serumanteil ersetzt. Die einzelnen Verdünnungsschritte sind Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3:** Adaption an serumfreie Kulturbedingungen

Medium	Dauer
RPMI 1640 + 10% FCS	1 Stunde
RPMI 1640 + 5% FCS	1 Stunde
RPMI 1640 + 2,5% FCS	1 Stunde
RPMI 1640 + 1% FCS	über Nacht
RPMI 1640 ohne FCS	eine Stunde

Nach der Adaption wurden die Zellen eine weitere Stunde mit RPMI 1640 Medium, dem 0,5mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) zugesetzt war, inkubiert. IBMX ist ein unspezifischer Inhibitor der cAMP und cGMP Phosphodiesterasen und wurde eingesetzt, um einen schnellen Abbau des generierten cAMP zu verhindern und so eine Aktivitätsänderung der Adenylatcyclase deutlicher erfassen zu können (Bascands et al., 1993) Anschließend wurde das Medium wieder abgesaugt und es erfolgte die Stimulation der Zellen. Dazu wurden folgende Lösungen verwendet:

- RPMI 1640 Medium + 0,5mM IBMX ohne weitere Zusätze als Kontrolle
- RPMI 1640 Medium + 0,5mM IBMX + 10nM Bradykinin
- RPMI 1640 Medium + 0,5mM IBMX + 100nM Bradykinin
- RPMI 1640 Medium + 0,5mM IBMX + 1µM Forskolin als Positivkontrolle

Das Diterpen Forskolin ist ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase und wurde hier als Positivkontrolle verwendet (Hedin und Rosberg, 1983).

Bei weiteren Durchgängen des Experiments wurde die Gruppe mit 10nM Bradykinin durch eine Lösung mit 100nM Bradykinin + 1µM Forskolin ersetzt, um auch einen eventuellen inhibitorischen Effekt des B<sub>2</sub>R auf die Adenylatcyclase nachweisen zu können. Die Stimulation erfolgte über 15, 30 oder 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, indem das Medium dekantiert und 600µl eiskalte 0,1N HCL auf die Zellen gegeben wurde. Nach etwa 10 Minuten Inkubation unter ständigem leichtem Schwenken waren die Zellen lysiert (Mikroskopkontrolle). Die Lysate wurden 10 Minuten bei 600 x g zentrifugiert und der Überstand bis zur Messung ihres cAMP Gehalts bei -20°C gelagert. Um die Konzentration des Cyclonukleotids zu bestimmen, kam ein kommerzielles ELISA Kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um ein kompetitives ELISA – System, bei dem eine definierte Menge von an alkalische Phosphatase gekoppeltes cAMP mit dem cAMP aus der Probe um Bindungsstellen an einem polyklonalen Kaninchen anti-cAMP- Antikörper konkurriert. Durch den Einsatz eines an den Boden einer 96 Well Platte gebundenen Ziege- anti- Kaninchen- Zweitantikörpers und p-Nitrophenyl Phosphat als Substrat der alkalischen Phosphatase kann die Menge an markiertem cAMP photometrisch bestimmt werden. Die erhaltenen Werte für die optische Dichte (OD) verhalten sich somit antiproportional zur in der Probe vorhandenen Menge an cAMP. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Damit die erhaltenen OD - Werte einer cAMP - Konzentration zugeordnet werden konnten, wurden Standards mit bekannter cAMP - Konzentration mitgeführt (s. Abbildung 11).

Als Kontrollparameter wurden ebenfalls TA (Total activity), NSB (Non substrate binding),  $B_0$  (maximum binding) und Substrate blank bestimmt. Um die Empfindlichkeit des Systems zu erhöhen, wurden zu Beginn alle Proben und Standards acetyliert. Dies geschah, indem zu jeweils 300  $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe 15  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus 0,5ml Acetic Anhydrid und 1ml Triethylamine gegeben und kurz geschüttelt wurde. Dann wurden je 100  $\mu\text{l}$  pro Bestimmung der acetylierten Proben bzw. Standards in ein Well der Mikrotiterplatte pipettiert und durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Neutralisationsreagenz neutralisiert. Anschließend wurden je 50  $\mu\text{l}$  des cAMP – Konjugats und der Antikörperlösung hinzugegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur unter stetigem Schwenken. Anschließend wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte dekantiert und jedes Well 3 mal mit Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes cAMP zu entfernen. Nun wurden 200  $\mu\text{l}$  der Substratlösung in jedes Well gegeben und der Ansatz eine weitere Stunde inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit je 50  $\mu\text{l}$  Stopplösung beendet und der erfolgte Farbumschlag im Photometer bei einer Messwellenlänge von 405nm und einer Referenzwellenlänge von 570nm quantifiziert. Von den gemessenen Werten wurde der ermittelte durchschnittliche NSB – Wert abgezogen. Aus den resultierenden Werten der Standards und den Logarithmen der zugehörigen Konzentrationen konnte nun eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die cAMP -Konzentration der Proben bestimmt werden konnte. Für die Berechnung der Standardkurve wurde Microsoft Excel 2000 eingesetzt.

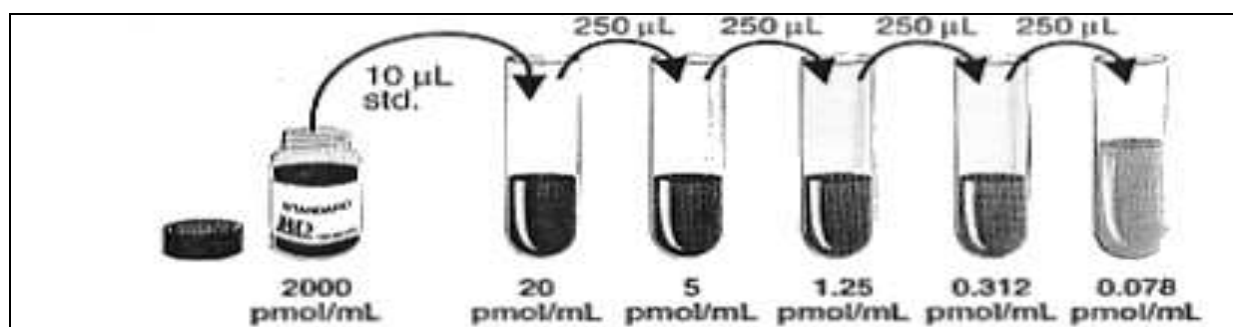


Abbildung 11: Verwendete cAMP - Standards

### 2.2.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Des Weiteren wurde von jeder Probe die Proteinkonzentration bestimmt, so dass die ermittelte cAMP Konzentration auf die Proteinmenge bezogen werden konnte. Auf diese Weise wurde ausgeglichen, dass sich aufgrund von Wachstumsschwankungen nicht exakt gleich viele Zellen pro Well befinden. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „DC Protein Assay“ von Bio-Rad, der eine modifizierte Form der Bestimmung nach Lowry darstellt. Dabei wurden in einer Mikrotiterplatte zu je 5 µl Probe nacheinander 25µl Reagenz A und 200µl Reagenz B pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurden die optischen Dichten der Proben bei einer Messwellenlänge von 750nm photometrisch bestimmt. Anhand der bei jedem Assay mitgeführten Standards aus Rinderserumalbumin (BSA) in 0,1 normaler HCL wurde wieder eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen ermittelt werden konnten. Abgedeckt wurde der Bereich von 1,5 bis 0,1 mg/ml.

### 2.2.2.2 cGMP

Die Versuche zur cGMP Produktion nach Stimulation des B<sub>2</sub>R wurden annähernd genauso durchgeführt wie die cAMP – Untersuchungen (2.2.2.1). Da sich in den meisten Geweben eine wesentlich geringere Konzentration an cGMP als an cAMP findet, war es jedoch sinnvoll, die verwendeten Zellen hier statt in 6er Wellschalen in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen zu kultivieren. Auf diese Weise war es möglich, eine deutlich höhere Zellzahl für jede Probe zu verwenden und so eine optimal im Messbereich des Assays liegende Konzentration des Analyten zu erreichen. Die Zellen wurden hier aufgrund des schnelllebigeren Charakters des NO / cGMP - Systems für nur 30 Sekunden, 5 Minuten oder 15 Minuten stimuliert. Dafür wurden folgende Substanzen benutzt:



- RPMI 1640 Medium + 0,5nM IBMX ohne weitere Zusätze als Kontrolle
- RPMI 1640 Medium + 0,5nM IBMX + 10nM Bradykinin
- RPMI 1640 Medium + 0,5nM IBMX + 100nM Bradykinin
- RPMI 1640 Medium + 0,5nM IBMX + 100 nM ANP (Atrial Natriuretic Peptide) als Positivkontrolle (Hamet et al., 1989).

Zur Lyse der Zellen wurde hier wegen der größeren Kulturgefäße 1ml 0.1 normale HCL verwendet. Die übrigen Schritte zur Probengewinnung verliefen exakt wie bei den cAMP - Versuchen. Die Konzentration der Proben wurde auch hier mit einem kommerziellen ELISA Kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Die Arbeitsschritte des cGMP Kits entsprechen genau dem Protokoll des cAMP Kits (s.2.2.2.1). Allerdings wurden hier Standards von 50 – 0,08 pmol/ml verwendet. Analog zu den cAMP – Versuchen wurde wiederum die Proteinkonzentration jeder Probe ermittelt und die cGMP – Konzentration auf die Proteinmenge bezogen.

### 2.2.2.3 D-myo-Inositol 1,4,5 – Trisphosphat (IP<sub>3</sub>)

Um eine mögliche Beteiligung der Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) – Kaskade an der Signaltransduktion des B<sub>2</sub> Rezeptors nachzuweisen, wurden Peritubulärzellen bei der zweiten Passage in 150 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät. Nachdem die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden sie an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert. Dies geschah nach dem gleichen Protokoll wie bei den cAMP / cGMP – Versuchen (2.2.2.1. / 2.2.2.2.) . Allerdings wurden die Zellen nach der einstündigen Inkubation mit serumfreiem RPMI 1640 Medium nicht direkt für die Versuche eingesetzt, sondern zunächst durch eine Behandlung mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS (s. 2.2.1.2. Passagieren von Peritubulärzellen) abgelöst und in 4ml RPMI 1640 Medium pro Zellkulturflasche aufgenommen. Auf diese Weise konnte eine höhere Konzentration von Zellen im resultierenden Lysat und somit ein dem Messbereich des verwendeten Assays besser entsprechende IP<sub>3</sub> Konzentration erreicht werden. Die erhaltenen Suspensionen wurden gepoolt, um eine gleichmäßige Zellkonzentration zu erreichen. Anschließend wurden je

2ml der Suspension in ein 15ml Falconröhrchen gegeben und ins Schüttelwasserbad bei 37°C gestellt. Dort wurden die Zellen eine Stunde geschüttelt, um auszuschließen, dass die zu messenden Effekte durch die Trypsinbehandlung beeinflusst werden. Danach wurden die Zellen stimuliert, indem in jedes Röhrchen 2ml 37°C warme Stammlösung der jeweiligen zur Stimulation verwendeten Reagenzien gegeben wurde. Auf diese Weise kamen folgende Endkonzentrationen zum Einsatz:

- RPMI 1640 Medium ohne weitere Zusätze als Kontrolle
- RPMI 1640 Medium + 10nM Bradykinin
- RPMI 1640 Medium + 100nM Bradykinin
- RPMI 1640 Medium + 10mM Acetylcholin als Positivkontrolle

Aufgrund der schnellen und transienten Natur der  $IP_3$  - Kaskade wurden mit 5, 30 oder 300 Sekunden sehr kurze Inkubationszeiten gewählt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Röhrchen mit 10ml eiskaltem RPMI 1640 Medium aufgefüllt und eine Minute bei 1800xg und 4°C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden ab diesem Zeitpunkt auf Eis durchgeführt. Das Medium wurde vorsichtig dekantiert und das resultierende Pellet in 600µl eiskalter Perchlorsäure (4%) lysiert. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 2000 x g und 4°C, damit sich die durch die Perchlorsäure ausgefallenen Proteine absetzen konnten. Von dem Überstand wurden 500µl abgenommen, mit 3 Tropfen pH - Indikator (FLUKA) versetzt und mit eiskalter KOH + 60mM Hepespuffer bis zu einem pH - Wert von 7,5 titriert. Dabei wurde für die grobe Annäherung 10 normale KOH, für die Feineinstellung 1 normale KOH verwendet.

Das bei der Neutralisation entstandene Kaliumperchlorat wurde durch eine weitere Zentrifugation bei 2000 x g und 4°C sedimentiert. Vom Überstand wurden 300µl abpipettiert und bis zur Untersuchung bei -80°C. gelagert.

Die  $IP_3$  Konzentration wurde durch die Verwendung eines kommerziell erhältlichen RIA Kits (Amersham Buchler, Braunschweig) bestimmt. Das Funktionsprinzip dieses Kits ist mit den ELISA Systemen bei cAMP bzw. cGMP vergleichbar. Das  $IP_3$  aus den

Proben bzw. Standards konkurriert hier mit radioaktivem [ $^3\text{H}$ ]  $\text{IP}_3$  um die Bindung an ein aus boviner Nebennierenrinde isoliertem  $\text{IP}_3$  Bindungsprotein. Durch Zentrifugation wird das freie vom gebundenen  $\text{IP}_3$  getrennt und die gebundene Radioaktivität durch Messung im Szintillationszähler bestimmt. Die gemessene Radioaktivität und damit die Menge an gebundenen [ $^3\text{H}$ ]  $\text{IP}_3$  verhält sich dabei wieder antiproportional zur  $\text{IP}_3$  Konzentration in Proben und Standards.

Alle Schritte zur Durchführung des RIA wurden auf Eis durchgeführt. Verwendung fanden Standards mit  $\text{IP}_3$  Konzentrationen von 25 bis 0,19pmol / ml. Jede Messung wurde auch hier in Doppelbestimmung ausgeführt. Als Kontrollparameter wurden die TC (TotalCounts), NSB (Non-specific binding) und  $B_0$  (maximum binding) mitbestimmt. Zunächst wurden je 100 $\mu\text{l}$  der Proben und Standards des Assay Puffers, des  $\text{IP}_3$  Tracer und des  $\text{IP}_3$  - Bindungsproteins in Eppendorf – Tubes pipettiert und das Gemisch kurz gevortext. Es folgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 x g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und alle Flüssigkeitsreste mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Anschließend wurde das Pellet mit 1ml A. dest. resuspendiert und in Szintillations – Vials transferiert. Die Vials wurden mit 3,5ml Szintillations Cocktail aufgefüllt und die Radioaktivität für 4 Minuten pro Probe im  $\beta$ - Szintillationszähler gemessen (in cpm = counts per minute). Von allen Werten wurde der NSB abgezogen. Analog zu der Auswertung der ELISAs bei cAMP und cGMP konnte aus den resultierenden Werten der Standards und den Logarithmen der zugehörigen Konzentrationen nun eine Standardkurve erstellt und die  $\text{IP}_3$  Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

## 2.2.2.4 Western Blot - Untersuchungen zum Nachweis Bradykinin induzierter Proteinphosphorylierungen

### 2.2.2.4.1 Gewinnung der Proben

Auch für die Versuche zum Nachweis von Bradykinin induzierter Proteinphosphorylierungen wurden Peritubulärzellen bei der zweiten Passage in 150cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Am Tag vor dem Versuch erfolgte erneut eine Adaptation der Zellen an serumfreie Lebensbedingungen nach dem bereits beschriebenen Protokoll (s. 2.2.2.1.). Für die Stimulation der Zellen wurde das alte Medium nicht abgesaugt, da sich gezeigt hatte, dass schon dieser Vorgang gewisse Phosphorylierungen induzieren konnte. Stattdessen wurde zu den 7ml RPMI 1640 Medium in der Flasche 70,7µl einer 0,1mM Bradykinin Stammlösung gegeben und die Kulturflasche leicht geschwenkt. Auf diese Weise wurde eine Bradykinin - Endkonzentration von 100nM erreicht. Die Stimulation erfolgte über 1, 7, 15, 30 oder 60 Minuten. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und je 1ml Lysepuffer (70mM Tris / HCl, pH 6,8; 2,5% SDS; 12,5% Glycerol; 1,25µM Trypsininhibitor aus Sojabohnen; 0,1mM Bacitracin; 1mM 4-Amidinophenylmethanesulfonyl Fluoride Hydrochloride; 5mM EDTA, 1mM Phenanthroline, 3µM Phosphoramidon, 3µM E-64 und 1,5µM Pepstatin) auf die Zellen gegeben und diese lysiert. Nach Entnahme von 15µl zur Proteinbestimmung wurde das übrige Lysat mit 60µl β - Mercaptoethanol, 50µl aktiviertem Natriumorthovanadate, 30µl der 0,5M Iodoacetamid – Stammlösung, sowie 1µl Bromophenolblau versetzt und sofort zur Hitzedenaturierung für 5 Minuten bei 95°C. gekocht. Die Aktivierung und damit die Depolymerisation des Natriumorthovanadates sorgt für ein deutlich größeres Potential des Natriumorthovanadates, Proteinphosphotyrosylphosphatasen zu inhibieren. Dazu wurde eine 200mM Stammlösung Natriumorthovanadate mit 1N HCL auf einen pH Wert von 10 titriert und die nun gelbe Lösung so lange gekocht, bis die Farbe wieder verschwand. Dies Prozedur wurde so lange wiederholt, bis die Lösung farblos blieb und sich der pH Wert bei 10 stabilisierte. Das β – Mercaptoethanol bewirkte eine

Reduzierung der Disulfidbrücken. Die resultierenden SH – Gruppen wurden anschließend durch Alkylierung mit Iodo-acetamid stabilisiert. Um eine höhere Proteinkonzentration zu erreichen, wurde das Lysat anschließend in Zentrifugenfilter (MG cut off: 10KDa) transferiert und für 15 Minuten bei 2000 x g und 4°C. zentrifugiert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde aliquotiert und bis zur Durchführung der Polyacrylamid-gelelektrophorese (=PAGE) bei –80°C gelagert.

#### 2.2.2.4.2 Polyacrylamid – Gelelektrophorese (PAGE)

Bei einer SDS Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes dazu gebracht, durch eine poröse Polyacrylamidmatrix zu wandern. Die Matrix wirkt dabei als Molekularsieb und hält die Proteine abhängig von ihrem Stokes – Radius und damit von ihrem Molekulargewicht unterschiedlich stark zurück, so dass große Proteine langsamer, kleine schneller durch das Polyacrylamidgel wandern können. Die Polyacrylamidmatrix wird durch die radikalische Polymerisation von Acrylamidmonomeren und quervernetzenden N,N'- Methylbisacrylsäureamid (Bis) aufgebaut. Die Porengröße und elastischen Eigenschaften der Gele ergeben sich dabei aus der verwendeten Gesamtmonomerkonzentration  $\%T$  (total monomer concentration =  $\frac{\text{Acrylamid}(g)+\text{Bis}(g)}{\text{Gesamtvolumen}(ml) \times 100}$ ) und aus dem Verhältnis von Acrylamid zu Bis  $\%C$  (crosslinking monomer concentration =  $\frac{\text{Bis}(g)}{\text{Acrylamid}(g)+\text{Bis}(g) \times 100}$ ). Da Proteine mit der Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) negativ geladene SDS – Protein – Komplexe mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit bilden, kann ausgeschlossen werden, dass die Bewegung der Proteine durch das Gel von der Proteineigenladung beeinflusst wird. Zur Auftrennung der Zelllysate wurde eine diskontinuierliche SDS PAGE durchgeführt, das heißt, die Proteine wurden zunächst in einem leicht sauren Sammelgel mit großer Porenweite gesammelt, bevor sie in dem basischen Trenngel mit hoher Acrylamidkonzentration aufgetrennt wurden. Für die vorliegende Fragestellung zeigte es sich am günstigsten, Trenngele mit  $\%T = 10\%$  und  $\%C = 2,67\%$  zu verwenden. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Gele war wie folgt:

**Tabelle 4:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Reagenzien	Sammelgel (% T=4%)	Trenngel(% T=10%)
0,5M Tris / HCL, pH6,8	1,25ml	---
1,5M Tris / HCL, pH8,8	---	2,5ml
A.dest	3,05ml	4,017ml
Acrylamid / Bis – Stammlösung (%T=30%; %C=2,67%)	0,665ml	3,333ml
SDS - Stammlösung (10%)	50µl	100µl
Ammoniumpersulfat - Lösung (10%)	25µl	50µl
N,N,N',N'-tetramethylethylene- diamine ( TEMED)	5µl	5µl

Für die Herstellung der Gele wurde die „Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell“ von Bio Rad verwendet. Dazu wurden die einzelnen Komponenten der Gele ohne die Ammoniumpersulfatlösung (APS) und das TEMED in 15ml Falconröhrchen gegeben, gemischt und ca. 15 Minuten mit Hilfe einer Vakuumpumpe entgast. Zu der entgasten Trenngellösung wurden nun die Radikalstarter APS und TEMED hinzugefügt und das Trenngel gegossen. Das Gel wurde direkt im Anschluss mit 2 -Isopropanol überschichtet und eine Stunde auspolymerisieren gelassen. Nach gründlicher Entfernung des 2 -Isopropanols durch wiederholtes Spülen mit A. dest und anschließender Elimination von Flüssigkeitsresten mit Filterpapier, konnte das Sammelgel gegossen werden. Die Polymerisation wurde auch hier durch die vorherige Zugabe von APS und TEMED gestartet. Teflon - Wellformer- Kämmchen mit 12 Zähnen bildeten die Probetaschen. Eine weitere Stunde später war das Gel auspolymerisiert und die Proben konnten in die Probetaschen eingefüllt werden. Das Ladevolumen betrug 10µl pro Tasche. Je nachdem, welcher Antikörper bei der anschließenden Nachweisreaktion (s.2.2.2.4.6) eingesetzt werden sollte, wurde eine Spur entweder mit Phosphotyrosin-, Phosphoserin- oder Phosphothreonin - BSA - Konjugaten (alle Sigma) zur Positivkontrolle mitgeführt. Um die Molekulargewichte der Proteine abschätzen zu können, wurden die beiden äußeren Probetaschen mit je 10 µl der vorgefärbten Proteinstandardlösung (Precision Plus Protein standards all blue, Bio Rad) beladen. Zusätzlich wurde eine Spur mit einem

weiteren Molekulargewichtsmarker (Sigma Marker Wide Range, Sigma) aufgetragen. Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Marker.

**Tabelle 5:** Größe und Zusammensetzung der verwendeten Molekulargewichtsmarker

Sigma Marker Wide Range		Precision + Protein Standards, Bio Rad	
Größe [kDa]	Protein	Größe [kDa]	Protein
205	Myosin	250	Keine Angaben
116	$\beta$ Galactosidase	150	Keine Angaben
97	Phosphorylase b	100	Keine Angaben
84	Fructose-6-Phosphat-Kinase	75	Keine Angaben
66	BSA	50	Keine Angaben
55	Glutamat Dehydrogenase	37	Keine Angaben
45	Ovalbumin	25	Keine Angaben
36	GAPDH	20	Keine Angaben
29	Carboanhydrase	15	Keine Angaben
24	Trypsinogen	10	Keine Angaben
20	Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	---	---
14,2	$\alpha$ Lactalbumin	---	---
6,5	Aprotinin	---	---

Nach Auffüllen der Elektrophoresekammer mit eiskaltem Laufpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1%SDS) wurde die Elektrophorese im Kühlraum bei 4° Celsius durchgeführt. Das Netzgerät (Power supply 1000/50, Bio Rad) wurde bei variabler Stromstärke auf konstante 200V eingestellt. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, sobald die Bromophenolblaufront das untere Gelende erreicht hatte. Mit oben genannten Einstellungen dauerte dies etwa 45 Minuten. Im Anschluss wurde das Trenngel mit einem Skalpell von dem Sammelgel abgelöst und entweder mit Coomassie Blau gefärbt, oder zur Durchführung des Westernblots in eine Inkubationsschale mit Westernblot – Transferpuffer (s.2.2.2.4.4. Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran) gelegt.

#### 2.2.2.4.3 Färbung der Gele mit Coomassie Blau

Die Färbung mit Coomassie Blau basiert auf einer unspezifischen Bindung des Farbstoffes an fast alle Proteine. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 – 2µg Protein pro Bande. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel zunächst in eine Färbewanne mit 20%iger Trichloressigsäure zur Fixierung überführt. Nach 10 Minuten Inkubation auf der Diffusions – Entfärbung - Apparatur erfolgte eine 15-minütige Zwischenwässerung mit 7%iger Essigsäure. Anschließend konnte die eigentliche Färbung beginnen. Das Gel wurde in einer Wanne mit Färbelösung (0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 45,5% Methanol; 9,2% Essigsäure) gegeben und etwa 30 Minuten unter ständigem Schwenken gefärbt. Um die Hintergrundfärbung zu verringern, wurde das Gel so lange in der Entfärbelösung (30% Ethanol; 10% Essigsäure) inkubiert, bis das gewünschte Verhältnis zwischen Protein- und Hintergrundfärbung eingetreten war. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt. Im Anschluss wurde das Gel auf eine gleichmäßig helle Leuchtbox gelegt und durch einen dunkelgelben Filter (Kodak Wratten Filter Nr. 8) mit einer Polaroidkamera fotografiert (s. 3.2.4.1 Ergebnisse).

#### 2.2.2.4.4 Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Western Blot)

Der elektrophoretische Transfer der separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte nach dem Semi - Dry - Verfahren in der „Fastblot“ Apparatur von Biometra. Vor dem Blotting wurden sechs 3mm dicke Filterpapiere (Schleicher & Schüll) und die verwendete Nitrocellulosemembrane (Porengröße 0,2µm, Bio Rad) großzügig auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten und zusammen mit dem Trenngel in eine Inkubationsschale mit Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 10% (v/v) Methanol; pH 8,3) gelegt. Dort wurden sie für 20 Minuten belassen, um mit dem Transferpuffer equilibrieren zu können. Zwischendurch wurde das Gel für jeweils eine Minute aus dem Puffer genommen. Eine Verbreiterung der Banden durch Diffusion konnte auf diese Weise minimiert werden. Nach kurzem Befeuchten der Elektroden der



Blottingapparatur mit Transferpuffer, erfolgte der Zusammenbau des Blotting - Sandwiches. Dabei war es sehr wichtig, nach jeder neuen Schicht alle eingeschlossenen Luftblasen durch Rollen mit einem nassen Glasstab aus dem Sandwich zu entfernen. Zuerst wurden 3 Lagen Filterpapier auf die Anode gelegt. Es folgte die Membran, anschließend das Gel und schließlich 3 weitere Schichten aus Filterpapier. Lag das Gel einmal auf der Membran, durfte es nicht mehr bewegt werden, da sonst kein originalgetreues Abbild der transferierten Proteine möglich gewesen wäre. Nach der Entfernung von überschüssigem Transferpuffer konnte der Deckel mit der Kohlenstoffkathode aufgelegt und mit 2-3 kg beschwert werden. Die Durchflusskühlung der Blotting – Apparatur wurde an die Wasserleitung angeschlossen und in Betrieb genommen. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200mA / cm<sup>2</sup> Membran und variabler Spannung. Als Spannungsquelle kam erneut das Gerät „Power supply 1000 / 50“ von Bio Rad zum Einsatz. Die optimale Transferdauer wurde empirisch ermittelt und betrug letztendlich 2 Stunden. Bei einem kürzeren Transfer hatte sich gezeigt, dass große Proteine mit einem Molekulargewicht von 100kDa und aufwärts noch nicht vollständig auf die Nitrocellulosemembran übertragen waren. Im Anschluss konnte das Sandwich auseinander gebaut und das Gel vorsichtig von der Membran abgehoben werden. Sowohl das Gel (Coomassie Blau; s.2.2.2.4.3), als auch die Membran (Direktblau 71; s.2.2.2.4.5) wurden gefärbt, um so den korrekten Ablauf des Transfers kontrollieren zu können. Die Färbung der Membran mit Direktblau 71 hatte zudem den Zweck, die gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren mit einer identischen Proteinmenge zu demonstrieren.

#### **2.2.2.4.5 Färbung der Membran mit Direktblau 71**

Für die Färbung der geblotteten Proteine auf der Membran wurde Direktblau 71 (Hong et al., 2000) eingesetzt. Dieser Farbstoff (Synonyme: Benzolichtblau, Siriuslichtblau) besitzt auf Nitrocellulosemembranen mit 0,5 – 1,5ng Protein / mm<sup>2</sup> Membran eine wesentlich niedrigere Nachweisgrenze als die weit verbreitete Ponceau - S - Färbung (Nachweisgrenze: 5-15ng Protein / mm<sup>2</sup>) und lässt sich zudem besser dokumentieren. Zur Durchführung der Färbung wurde die Membran in eine Inkubationsschale mit Direktblau 71 - Arbeitslösung (0,008% (w/v) Direkt Blau 71; 40% Ethanol; 10% Essigsäure) gelegt und für 5 Minuten auf der Diffusions – Entfärbung Apparatur angefärbt. Um die

Hintergrundfärbung zu reduzieren, folgten zwei Waschschriffe für jeweils zwei Minuten mit Direktblau 71- Waschlösung (40% Ethanol; 10% Essigsäure). Die gefärbte Membran konnte nun mit der Polaroidkamera fotografiert oder mit einem Flachbettscanner (Tevion MD 40420) gescannt werden (s.3.2.4.2 Ergebnisse). Weiterhin wurden die Banden der Proteinstandards auf der Membran mit einem weichen Bleistift markiert. Damit die anschließende Nachweisreaktion nicht beeinträchtigt wurde, war es notwendig, die Membran wieder zu entfärben. Dies geschah durch eine 15minütige Inkubation in Direktblau 71 - Entfärbelösung (150mM Natriumbicarbonat; 10% Ethanol). Auch die Entfärbung erfolgte unter ständigem Schwenken.

#### 2.2.2.4.6 Immunologische Identifikation phosphorylierter Proteine

Der immunologische Nachweis von phosphorylierten Proteinen auf der Nitrocellulosemembran wurde durch den Einsatz von monoclonalen Maus Antikörpern gegen Phosphotyrosine (Sigma; Klon PT - 66), Phosphoserine (Sigma; Klon PSR - 45) und Phosphothreonine (Sigma; Klon PTR - 8) erbracht. Als Zweitantikörper wurde ein HRP - markierter Anti - Maus - Antikörper von der Ziege eingesetzt (schon bei 2.2.1.5 verwendet). Die optimalen Konzentrationen für die Antikörper wurden empirisch bestimmt und sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6:** Zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen verwendete Antikörper

1. Antikörper	Konzentration 1. Antikörper	Konzentration 2. Antikörper
Antiphosphotyrosin	1:2000 (in T-TBS + 1% BSA)	1:2000 (in T-TBS + 1% BSA)
Antiphosphoserin	1:500 (in T-TBS + 1% BSA)	1:1500 (in T-TBS + 1% BSA)
Antiphosphthreonin	1:500(in T-TBS + 1% BSA)	1:1250 (in T-TBS + 1% BSA)

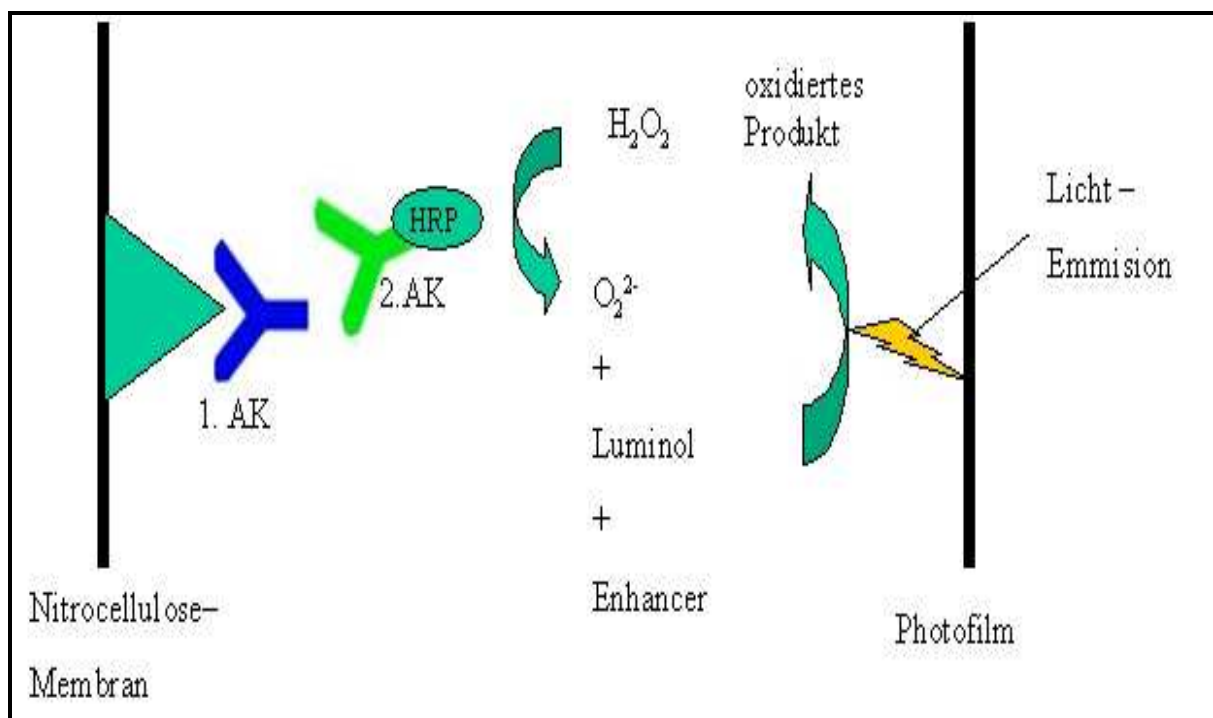
Vor Beginn der Nachweisreaktion mussten die überschüssigen Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran abgesättigt werden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren. Nachdem sich die weit verbreitete Blockierung mit Trockenmilchpulver als völlig untauglich für die verwendeten Antikörper erwiesen hatte (vermutlich enthält Trockenmilch selber verschiedene phosphorylierte Proteine), wurde eine Reihe andere Reagenzien ausprobiert. Das beste Ergebnis konnte bei der Verwendung von 5% Teleostgelatine (Gelatine from cold water fish skin, Sigma) in T-TBS + 1% BSA bei Blockierung über Nacht bei 4°C erzielt werden. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Wasch- und Inkubationsschritte auf der Diffusions - Entfärbes Apparat bei Raumtemperatur durchgeführt. Tabelle 7 beschreibt den genauen Ablauf bei der Immunreaktion.

**Tabelle 7:** Protokoll der Immunreaktion zum Nachweis phosphorylierter Proteine

Behandlung	Reagenz	Dauer
Absättigen unspezifischer Bindungen	5% Teleostgelatine in T-TBS	über Nacht bei 4°C
Waschen in Puffer	T-TBS	2 x 1 Minute
Inkubation 1. Antikörper	s. Tabelle 6	1 Stunde
Negativkontrolle	nur T-TBS + 1% BSA	1 Stunde
Waschen in Puffer	T-TBS	1 x 15 Minute + 3 x 5 Minuten
Inkubation 2. Antikörper	s. Tabelle 6	1 Stunde
Waschen in Puffer	T-TBS	1 x 15 Minute + 3 x 5 Minuten

Die gebundenen Antikörper wurden mit dem ECL System (Enhanced chemilumineszenz System, Amersham Pharmacia Biotech) visualisiert (s. Abbildung 12). Dazu wurde in einer Dunkelkammer die Proteinseite der Membran mit ECL Reagenz bedeckt und für eine Minute inkubiert. Überschüssige Reagenz wurde entfernt, anschließend die Membran in Klarsichtfolie verpackt und in eine Fotokassette gelegt. Nun konnte das Photopapier (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) auf die Membran gelegt und die Kassette geschlossen werden. Nach einer für jeden Antikörper empirisch bestimmten Entwicklungszeit wurde die Kassette wieder geöffnet, der Film entnommen

und in eine Schale mit Entwicklerlösung gelegt und für 90 Sekunden darin belassen. Der Film wurde nun in Wasser gewaschen und anschließend in eine Schale mit Fixierungslösung gegeben. Nach einer Minute konnte der Film entnommen und nach Abspülen von restlicher Fixierungslösung zum Trocknen aufgehängt werden.



**Abbildung 12:** Prinzip der ECL Reaktion

### 2.2.3 Pharmakologische Charakterisierung des B<sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen

Die pharmakologische Charakterisierung des B<sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen wurde an adhärent gewachsenen Zellen mit radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Bradykinin (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Die weitverbreitete Bestimmung von pharmakologischen Daten an Membranpräparationen von Zellen erwies sich für uns als ungeeignet, da es sich gezeigt hatte, dass eine große Menge Zellmaterial nötig gewesen wäre, um die erforderliche Menge an Membransuspension herzustellen und somit sehr viele Ratten hätten getötet werden müssen.

Verwendet wurden stattdessen in 6er Well Schalen kultivierte Peritubulärzellen in der 2. Passage. Wie bei den Versuchen zur Signaltransduktion mussten die Zellen vor Versuchsbeginn auf serumfreie Kulturbedingungen adaptiert werden, da möglicherweise auch die pharmakologischen Eigenschaften des B<sub>2</sub> Rezeptors durch unbekannte Serumbestandteile hätte beeinflusst werden können. Die Adaption geschah nach dem bereits beschriebenen Protokoll (2.2.2.1).

#### 2.2.3.1 Vorversuche zur Pharmakologie

Bevor die eigentliche Determination der pharmakologischen Parameter stattfinden konnte, war es zum einen erforderlich, die nötige Inkubationszeit bis zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts zwischen Bradykinin und dem B<sub>2</sub> - Rezeptor zu ermitteln. Zum anderen musste bestimmt werden, wie viele Waschschriffe zur Elimination von nicht gebundenem [<sup>3</sup>H] - Bradykinin durchgeführt werden sollten, um ein möglichst optimales Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung zu erreichen. Um diese zwei Versuchsparameter zu ermitteln, wurde nach Adaption der Zellen auf serumfreie Bedingungen in beiden Fällen zunächst das Nährmedium abgesaugt und durch Bindungspuffer (RPMI 1640 Medium; 4,6µM Captopril; 1,8µM Phosphoramidon; 1mM σ - Phenanthroline; 1% BSA) ersetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C, um die Zellen mit dem Bindungsansatz equilibrieren zu lassen. Die Proteaseinhibitoren Captopril, Phosphoramidon und σ - Phenanthrolin im Puffer (s. Tabelle 8) hatten die Aufgabe, die verschiedenen Kininasen zu blockieren, die vermutlich an die Membran von Peritubulärzellen gebunden sind und dort mit dem B<sub>2</sub> Rezeptor um

die Kinine konkurrieren, wie dies bei Sertolizellen der Fall ist (Regoli und Barabe, 1980). Durch die Inhibition sollte eine Bindung des Bradykinins an die Kininasen und somit deren Peptidolyse verhindert werden. Zudem wäre bei der pharmakologischen Bestimmung eine Bindung des [<sup>3</sup>H] Bradykinin an die Kininasen nicht von einer Bindung an den B<sub>2</sub> Rezeptor zu unterscheiden gewesen und hätte so die erhaltenen Daten verfälscht.

**Tabelle 8:** Spezifität der verwendeten Kininaseinhibitoren

Kininase - Inhibitor	Spezifität
Captopril	Kininase II
Phosphoramidon	Neutral Endopeptidase (NEP)
σ - Phenanthroline	Metalloprotease

Nach der Vorinkubation wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen und auf Eis gestellt. Die Styroporbox mit dem Eis wurde während der Inkubation stetig geschwenkt. Nach 10 Minuten wurde der Bindungspuffer bei der Hälfte der Zellen durch Bindungspuffer + 10nM [<sup>3</sup>H] - Bradykinin, bei der anderen Hälfte durch Bindungspuffer + 10nM [<sup>3</sup>H] - Bradykinin + 10 μM 'kaltes' Bradykinin ersetzt. Durch die Zugabe des hohen Überschusses an kaltem Bradykinin wurde die spezifische Bindung des [<sup>3</sup>H]-Bradykinin an den B<sub>2</sub> Rezeptor nahezu vollständig unterdrückt, so dass bei diesen Zellen letztendlich die rein unspezifische Bindung bestimmt werden konnte. Durch Subtraktion der erhaltenen Werte von den Ergebnissen der anderen Gruppe, die sich aus unspezifischer und spezifischer Bindung zusammensetzte, war es möglich, die spezifische Bindung zu ermitteln.

Bei den Versuchen zum Austesten der benötigten Inkubationszeiten wurde die Bindungsreaktion nach 30, 45, 60, 75, 90, 105 sowie 120 Minuten durch Absaugen des Bindungsansatzes beendet. Nun wurden die Zellen 3 mal 1 Minute mit je 1,5ml eiskaltem PBS pro Well gewaschen und anschließend mit 1ml Lysepuffer (0,1N NaOH; 0,1M Natriumbicarbonat; 1%SDS) 5 Minuten lysiert. Nun konnte das Lysat in Szintillations - Vials transferiert, mit 3.5ml Szintillations Cocktail aufgefüllt und die Radioaktivität im β - Szintillationszähler bestimmt werden.

Bei der Ermittlung der optimalen Anzahl von Waschschritten wurden alle Zellen 90 Minuten im Bindungsansatz inkubiert und anschließend verschieden oft (1-5mal) mit eiskaltem PBS gewaschen. Die übrigen Schritte waren identisch.

Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurde in beiden Fällen die Software Microsoft Excel 2000 verwendet.

### **2.2.3.2 Sättigbarkeit der Bindung von Kininen am B<sub>2</sub> Rezeptor**

Um die Sättigbarkeit der Bindung von Kininen am B<sub>2</sub> Rezeptor zu demonstrieren, wurden Peritubulärzellen mit steigenden Konzentrationen von [<sup>3</sup>H] Bradykinin inkubiert. Der grundsätzliche Versuchsaufbau war identisch mit dem bei den Vorversuchen (s.2.2.3.1) zur Pharmakologie: Adhärent gewachsene Peritubulärzellen in der zweiten Passage wurden zunächst eine Stunde im Brutschrank bei 37°C mit Bindungspuffer (s.2.2.3.1) equilibriert, bevor sie auf Eis gestellt und unter Schütteln mit dem Bindungsansatz inkubiert werden konnten. Im Gegensatz zu den Vorversuchen, bei denen für alle Zellen der gleiche Bindungsansatz verwendet worden war, kamen hier folgende [<sup>3</sup>H] Bradykininkonzentrationen zum Einsatz: 0,1nM; 0,5nM; 1nM; 2nM; 3nM; 5nM; 7,5nM; 10nM und 20nM. Die unspezifische Bindung wurde wieder in Gegenwart von 10µM unmarkiertem Bradykinin bestimmt. Gemäß den Ergebnissen aus den Vorversuchen (s. 3.3.1) erfolgte die Inkubation über eine Stunde mit drei sich anschließenden Spülgängen mit eiskaltem PBS (1,5ml pro Well). Anschließend konnten die Zellen, wie bereits bei den Vorversuchen (2.2.3.1) beschrieben, lysiert und die Radioaktivität nach Versetzung mit Szintillationscocktail im β - Szintillationszähler gemessen werden. Alle Werte wurden auf die durchschnittliche Proteinkonzentration pro Well bezogen, die durch die Bestimmung der Proteinmenge aus drei zufällig ausgewählten Wells mit dem „DC Protein Assay“ von Bio Rad (s.2.2.2.1 cAMP) ermittelt wurde. Aus den erhaltenen Daten wurde eine Sättigungskurve erstellt, aus der durch weitere Umformungen die pharmakologischen Konstanten K<sub>d</sub> und B<sub>max</sub> bestimmt werden konnten (s.3.2.3.2 Ergebnisse). Die Dissoziationskonstante K<sub>d</sub> erfasst die Affinität von Bradykinin zum B<sub>2</sub> Rezeptor und B<sub>max</sub> beschreibt die Gesamtkonzentration an Bindungsstellen.

### 2.2.3.3 Verdrängbarkeit der Bindung von Kininen am B<sub>2</sub> Rezeptor

Neben der Sättigbarkeit der Bindung von Kininen am B<sub>2</sub> Rezeptor sollte gezeigt werden, dass sich Bradykinin durch die Verwendung von spezifischen Antagonisten bzw. Agonisten wieder aus der Bindung verdrängen lässt. Eingesetzt wurde einmal der selektive B<sub>2</sub> Rezeptor Antagonist HOE 140 sowie der B<sub>1</sub> spezifische Agonist [desArg<sup>10</sup>]-HOE 140, der in hohen Konzentrationen auch eine gewisse Affinität zum B<sub>2</sub> Rezeptor aufweist. Von beiden Substanzen sollte die Konzentration bestimmt werden, mit der 50% des maximal gebundenen Bradykinins aus der Bindung verdrängt werden kann (IC<sub>50</sub>). Prinzipiell unterschied sich das experimentelle Vorgehen nicht von dem Sättigungsversuch, allerdings befand sich hier eine feste Konzentration an [<sup>3</sup>H] Bradykinin im Bindungsansatz, während die Menge der verwendeten Agonisten bzw. Antagonisten variiert wurde. Die eingesetzten Konzentrationen sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Für die Extrapolation der Kurve aus den Messdaten wurde hier die Software Graph Pad Prism eingesetzt.

**Tabelle 9:** Konzentrationen der verwendeten Agonisten / Antagonisten

Agonist / Antagonist	eingesetzte Konzentrationen					
HOE 140	0,1nM	0,75nM	5nM	25nM	0,1µM	1µM
[desArg <sup>10</sup> ] HOE140	1nM	0,1 µM	10 µM	--	--	--

### 2.2.4 Statistik

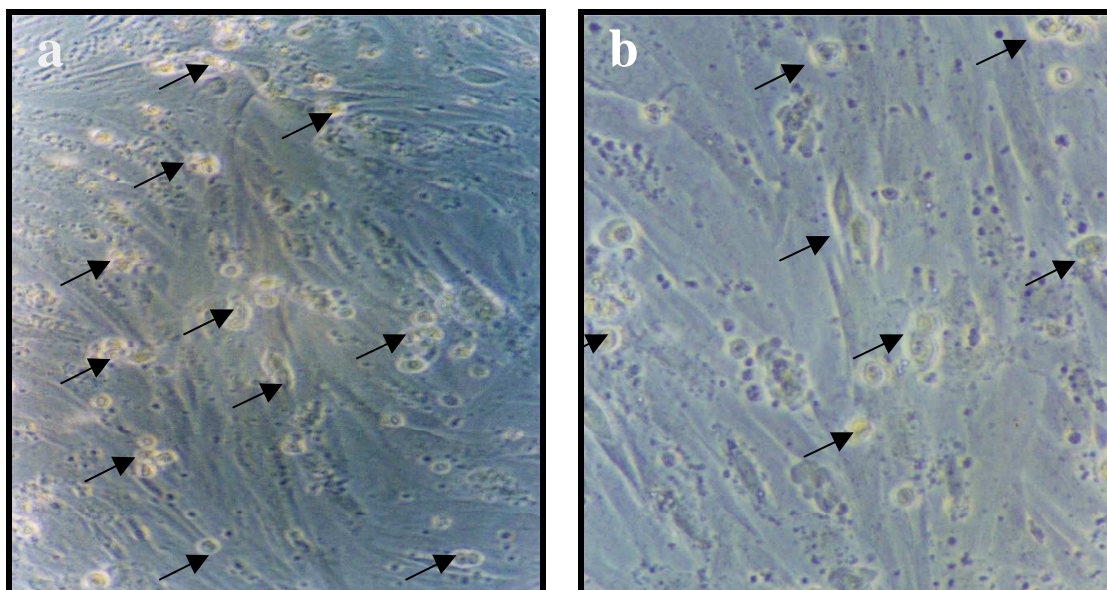
Alle Versuche wurden mindestens 3-5mal wiederholt. Dabei konnten jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Wenn nicht anders angegeben, ist jeweils ein repräsentatives Experiment dargestellt. Für die statistische Auswertung der Versuche zur cAMP-, cGMP- und IP<sup>3</sup>- Produktion (s.2.2.2.1 cAMP, 2.2.2.2. cGMP und 2.2.2.3. D-myo-Inositol 1,4,5 – Trisphosphat (IP<sub>3</sub>)) wurde ein zweiseitiger Student's t - Test durchgeführt. Die Symbole (\*) bzw. (\*\*) zeigen dabei ein Signifikanzniveau von p<0,05 und p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.



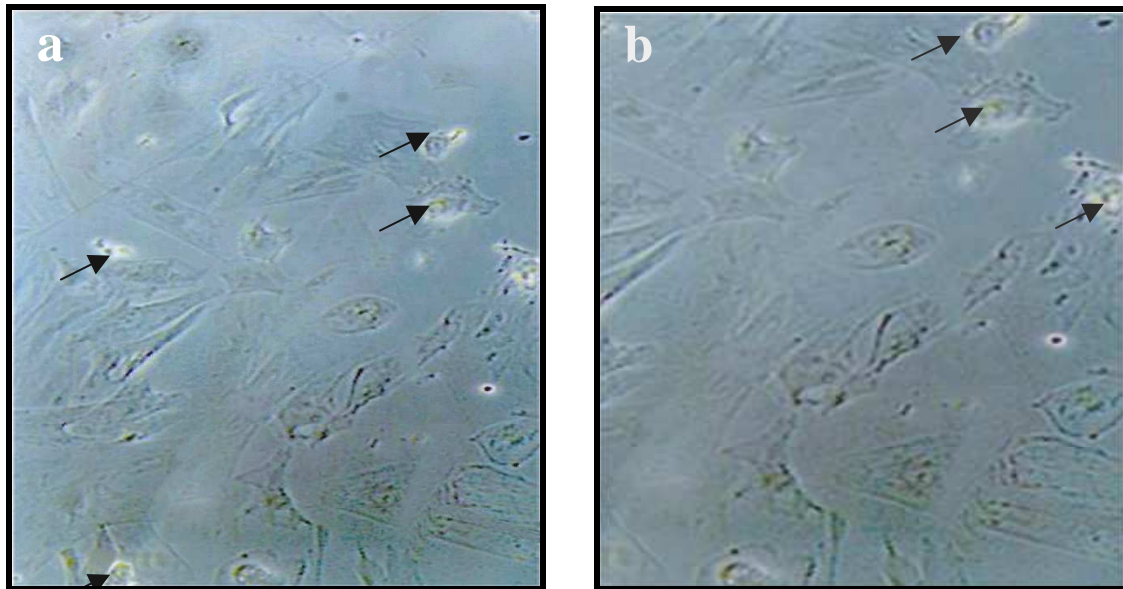
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zellkultur

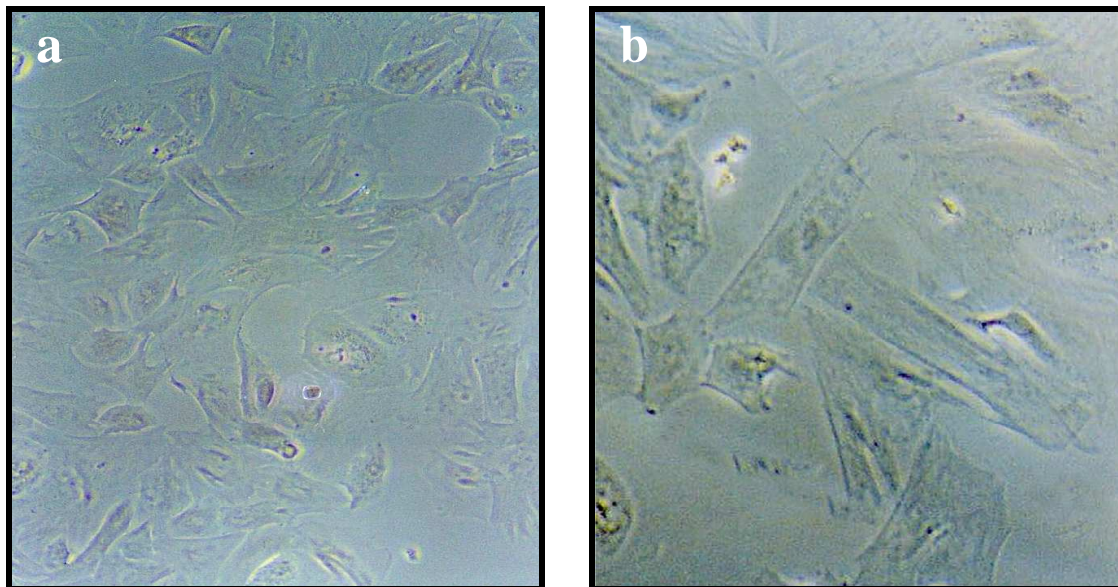
Wachstum und Zustand der für die Versuche isolierten Peritubulärzellkulturen wurden regelmäßig mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops kontrolliert und durch den Einsatz einer Kamera dokumentiert. Typisch für die Morphologie von Peritubulärzellen sind die unregelmäßigen Zellbegrenzungen mit langgezogenen Zytoplasmaausläufen. Die Reinheit der Peritubulärzellkultur stieg dabei deutlich bei jeder Passage an (s. Abbildung 13-16).



**Abbildung 13a, b:** Peritubulärzellkultur 2 Tage nach Aussaat (links 20x, rechts 32x). Die Kultur enthält noch eine deutliche Verunreinigung durch Spermatogenezellen (Pfeile zeigen Beispiele).



**Abbildung 14a, b:** Peritubularzellkultur 2 Tage nach der 1. Passage (links 20x, rechts 32x). Es zeigen sich nur noch vereinzelte Verunreinigungen (Pfeile zeigen Beispiele).



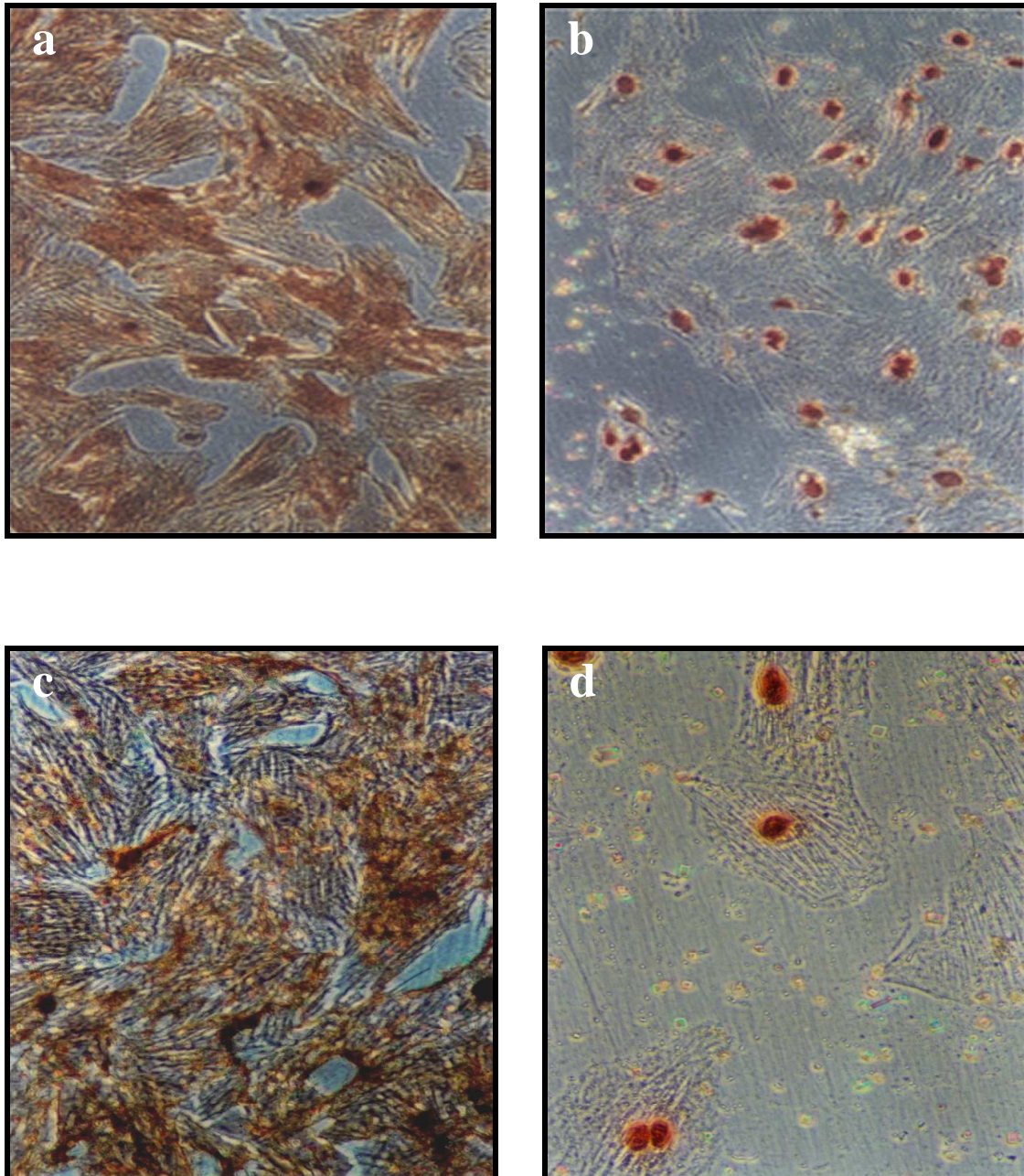
**Abbildung 15a, b:** Peritubularzellkultur 2 Tage nach der 2. Passage (links 20x, rechts 32x). Die Peritubularzellkultur hat einen Reinheitsgrad von ca. 95% erreicht.

---

### 3.1.1 Reinheitskontrolle durch Immuncytochemie zum Nachweis von $\alpha$ - smooth muscle Isoactin

Um die Reinheit der angelegten Peritubularzellkultur zu überprüfen, wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers das für glatte Muskelzellen spezifische  $\alpha$  - smooth muscle Isoactin angefärbt. Da Peritubulärzellen die einzigen glatten Muskelzellen im Testis sind, kann eine positive Farbreaktion als Beweis für das Vorliegen einer Peritubularzelle gewertet werden. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin - Mayer gegengefärbt. Durch Auszählen unter dem Mikroskop wurde für Kulturen in der zweiten Passage ein Reinheitsgehalt an Peritubulärzellen von ca. 95 % bestimmt. Da diese Reinheit für unsere Zwecke ausreichend war und die Zellen zu diesem Zeitpunkt ein noch gutes Wachstumsverhalten aufwiesen, wurde jeweils die zweite Passage der angelegten Kulturen für Versuche eingesetzt (s. Abbildung 15a und b).





**Abbildung 16a-d:** Immuncytochemischer Nachweis von  $\alpha$ -smooth muscle Isoactin als Reinheitskontrolle für die Peritubularzellkultur. Links (a,c) wurden die Actinfasern der Peritubulärzellen mittels eines monoklonalen Antikörpers spezifisch angefärbt. Rechts (b,d) wurde statt des Antikörpers Mausserum als Negativkontrolle verwendet. Die Zellkerne wurden jeweils mit Hämatoxylin-Mayer gegengefärbt. (a,b 32x; c,d 40x)

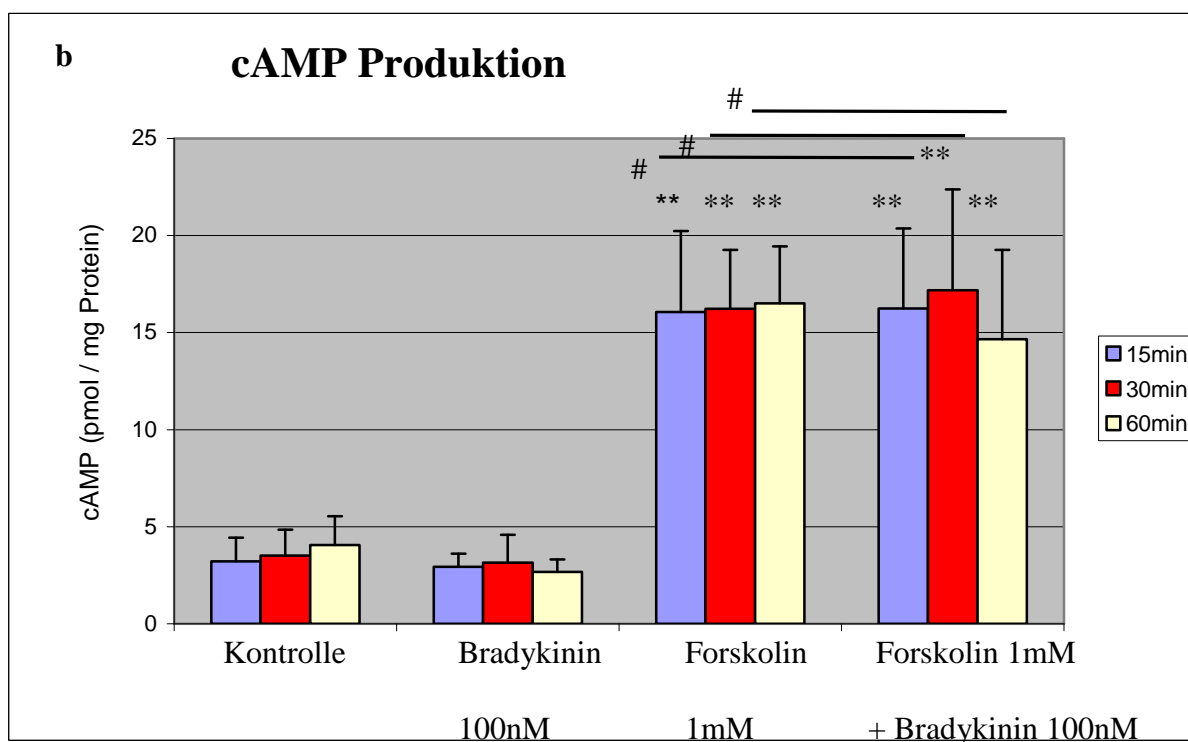
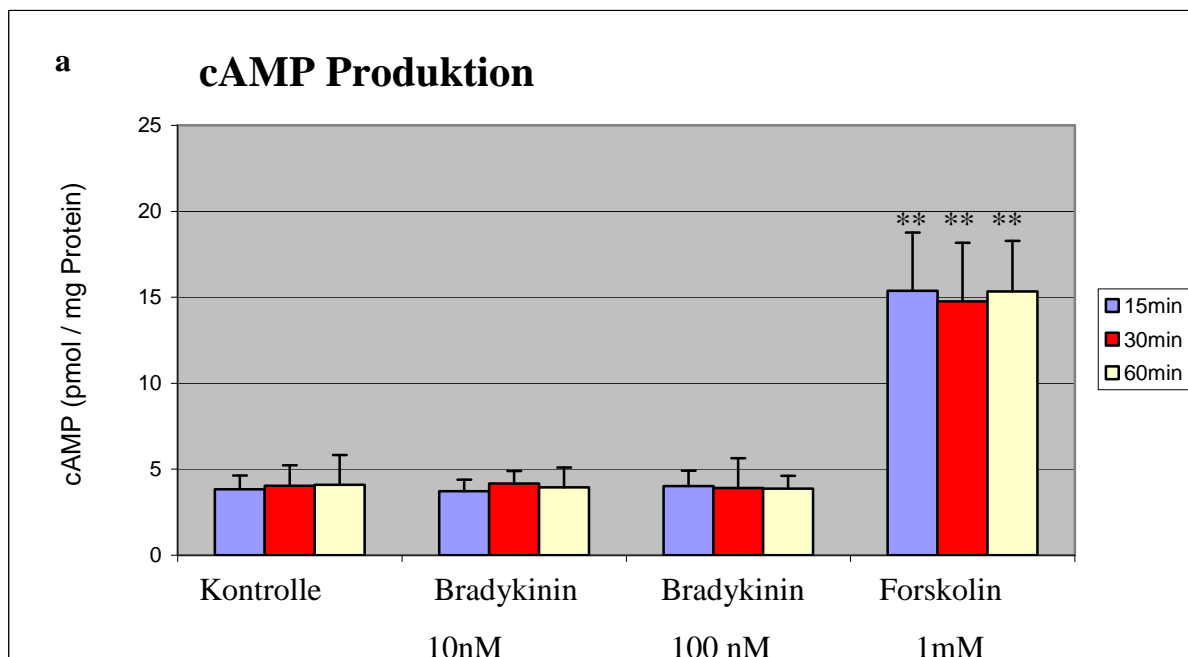
## 3.2 Signaltransduktion des B<sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen

### 3.2.1 cAMP

Um der Frage nachzugehen, ob die Adenylatcyclase durch eine Aktivierung des B<sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen zur cAMP Produktion stimuliert werden kann, wurden die Peritubulärzellen über verschiedene Zeiträume (15min, 30min, 60min) mit 2 verschiedenen Konzentrationen Bradykinin ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  mol/l) bzw. Forskolin in der Konzentration  $10^{-6}$  mol/l als Positivkontrolle inkubiert und auf ihren cAMP Gehalt hin untersucht. Da sich in jedem Well aufgrund natürlicher Wachstumsschwankungen nicht exakt die gleiche Zellzahl befindet, wurden die Proteinmenge pro Well bestimmt und die ermittelten cAMP Konzentrationen darauf bezogen.

Unabhängig von der Inkubationsdauer zeigte sich zwischen mit Bradykinin stimulierten Zellen und nichtstimulierten Zellen kein signifikanter Unterschied im cAMP Gehalt (s. Abbildung 17a). Wie erwartet reagierten die mit Forskolin inkubierten Zellen jedoch signifikant mit einem Anstieg der cAMP Konzentration um den Faktor 4,3 ( $p < 0,0001$ ). Dies zeigt, dass die Analyse des cAMP-Gehalt selbst korrekt durchgeführt worden ist.

In einigen Geweben kann die Adenylatcyclase auch durch eine Aktivierung des B<sub>2</sub> Rezeptors gehemmt werden (s. 1.1.2). Da der cAMP Gehalt des Zelllysates der Kontrollgruppe sich schon im unteren Messbereich des Assay Systems befindet, konnte mit dem bisherigen Versuchsaufbau ein eventuell inhibitorischer Effekt auf die Adenylatcyclase nicht nachgewiesen werden. In einer zweiten Versuchsreihe wurde deshalb überprüft, ob Bradykinin die Forskolin induzierte cAMP Produktion unterdrücken kann. Dazu wurden die Peritubulärzellen über die gleichen Zeiträumen wie zuvor entweder nur mit Forskolin oder mit Forskolin und Bradykinin ( $10^{-7}$  mol/l) inkubiert. Allerdings zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Forskolin Gruppe und der mit Forskolin und Bradykinin inkubierten Zellen (Abbildung 17b).

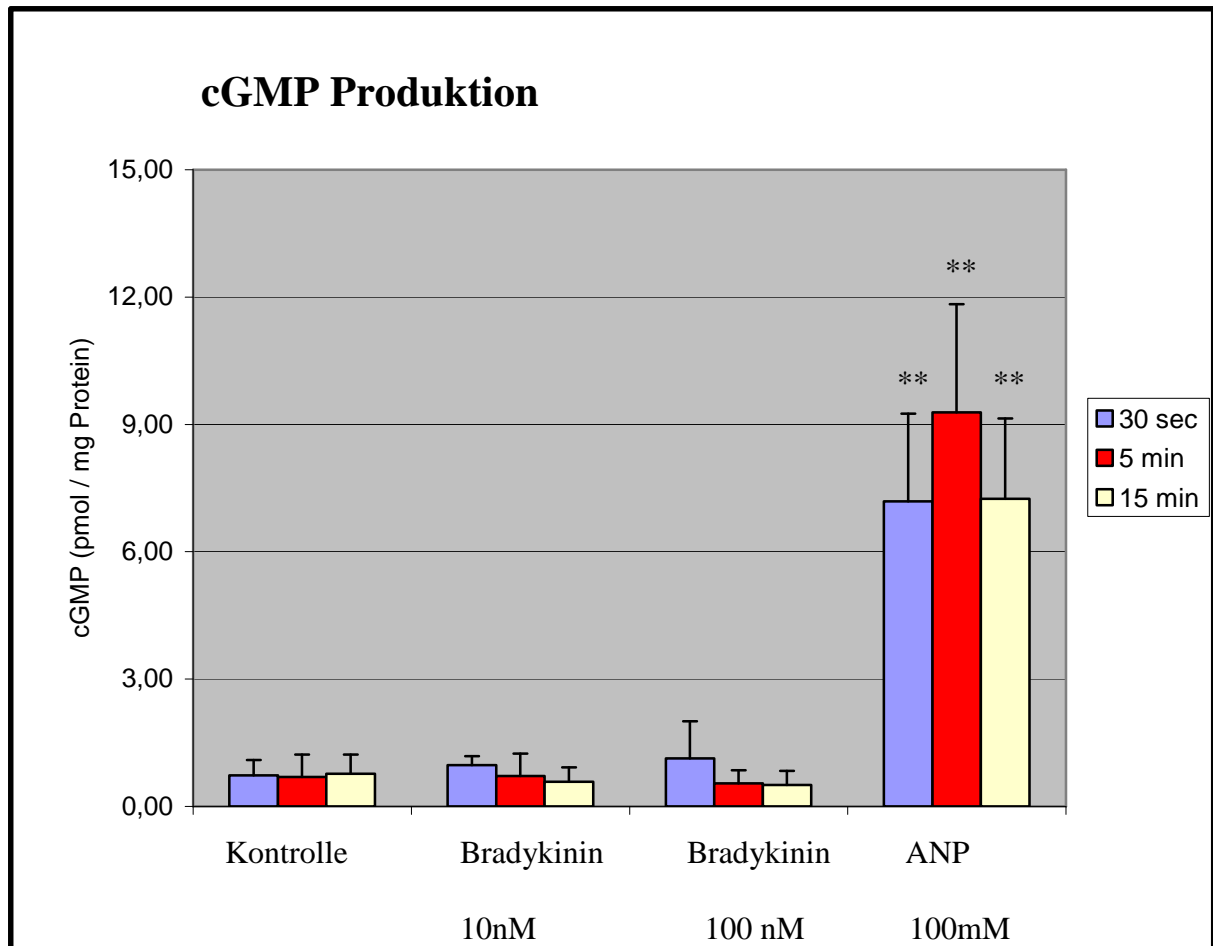


**Abbildung 17 a,b:** cAMP Konzentrationen in Peritubulärzellen nach Stimulation mit Bradykinin über verschiedene Zeiträume. Als Positivkontrolle wurde Forskolin verwendet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Symbole (\*) bzw. (\*\*) zeigen dabei ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle. Das Symbol (#) zeigt ein Signifikanzniveau von  $p > 0,4$  im Vergleich zur Forskolin-Gruppe.

### 3.2.2 cGMP

Der potentielle Einfluss des B<sub>2</sub>R auf die NO / cGMP Signalkaskade wurde mit dem praktisch gleichen Versuchsaufbau wie beim Adenylatcyclase / cAMP System untersucht. Weil das NO/cGMP- schneller als das cAMP - System reagiert, wurden hier Inkubationszeiten von 30 Sekunden, 5 und 15 Minuten gewählt. Als Positivkontrolle wurde Atrial Natriuretic Peptid (ANP) in der Konzentration 0,1 mol/l eingesetzt.

Im Vergleich zwischen den mit Bradykinin stimulierten Zellen und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung18). Die ANP Gruppe unterschied sich allerdings hochsignifikant von der unbehandelten Kontrollgruppe. Gegenüber dem basalen cGMP Level von 0,73pmol cGMP / mg Protein konnte eine Zunahme um den Faktor 10,98 auf 8,02 pmol cGMP / mg Protein bei den mit ANP stimulierten Zellen beobachtet werden. Dies belegt, dass auch die Analyse des cGMP-Gehalts selbst korrekt durchgeführt worden ist.



**Abbildung 18:** cGMP Konzentrationen in Peritubulärzellen nach Stimulation mit Bradykinin über verschiedene Zeiträume. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Symbole (\*) bzw. (\*\*) zeigen dabei ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle.

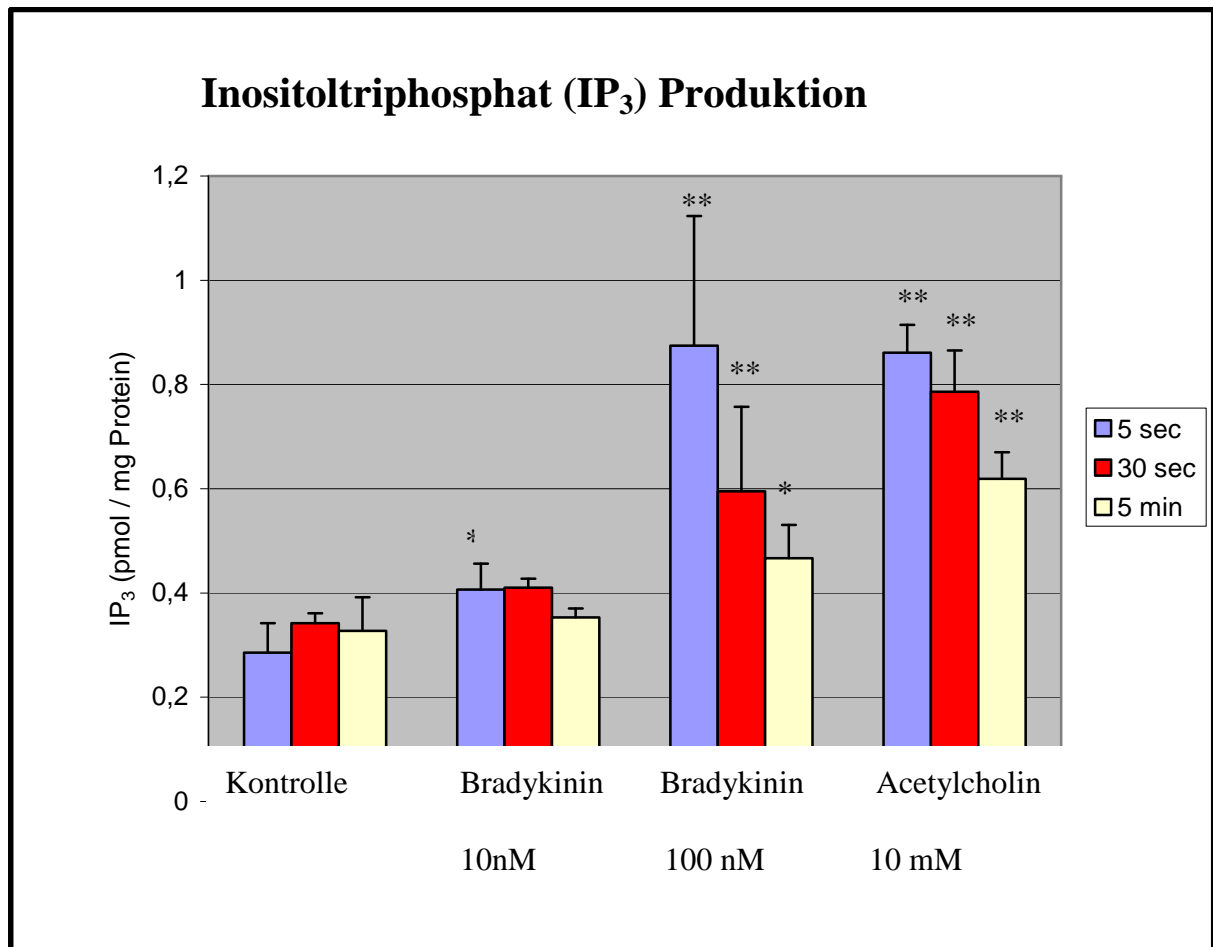


### 3.2.3 Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>)

Bei den Untersuchungen zur Beteiligung des Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) - Weges an der Signaltransduktion des B<sub>2</sub>R wurden Peritubulärzellen in Suspension untersucht, weil in Vorversuchen bei adhärennten Zellen keine ausreichende IP<sub>3</sub> -Konzentration erreicht werden konnte. Die Zellen wurden mit Bradykinin in den Konzentrationen 10<sup>-8</sup> und 10<sup>-7</sup> mol/l, sowie mit Acetylcholin (10<sup>-2</sup> mol/l) als Positivkontrolle stimuliert. Die Inkubationszeiten wurden wegen der Schnelllebigkeit des IP<sub>3</sub> - Systems mit 5, 30 und 300 Sekunden sehr kurz gewählt (Rabito et al., 1996; Lambert et al., 1986; Liebmann et al 1996).

Nach 5 Sekunden Stimulation mit Bradykinin reagierten die Zellen mit einem signifikanten, konzentrationsabhängigen Anstieg der IP<sub>3</sub> Konzentration (Abbildung 19): Bei 10nmol/l wurde eine um den Faktor 1,42 (p<0,02), bei 100nmol/l um den Faktor 2,87 (p<0,002) erhöhte IP<sub>3</sub> Konzentration gemessen. Schon nach 30 Sekunden sank die Konzentration des second messenger bereits wieder ab (10nmol/l: 1,14fache vom Basalwert, p<0,07; 100nmol/l: 1,69fache vom Basalwert, p<0,003). Nach 5 Minuten konnte bei 10nmol/l kein signifikanter Unterschied mehr beobachtet werden. Bei 100nmol/l wurde noch eine um den Faktor 1,37 (p<0,02) erhöhte Konzentration gefunden.

Bei Stimulation mit der Positivkontrolle Acetylcholin, wurde jeweils ein signifikanter Anstieg der IP<sub>3</sub> - Konzentration in dem Peritubularzelllysat gemessen. Wie auch nach Applikation vom Bradykinin, war bei den mit Acetylcholin stimulierten Zellen nach 5 Sekunden der IP<sub>3</sub>-Level am höchsten, nach 5 Minuten Reaktionszeit war dagegen bereits wieder ein deutlicher Abfall zu verzeichnen.



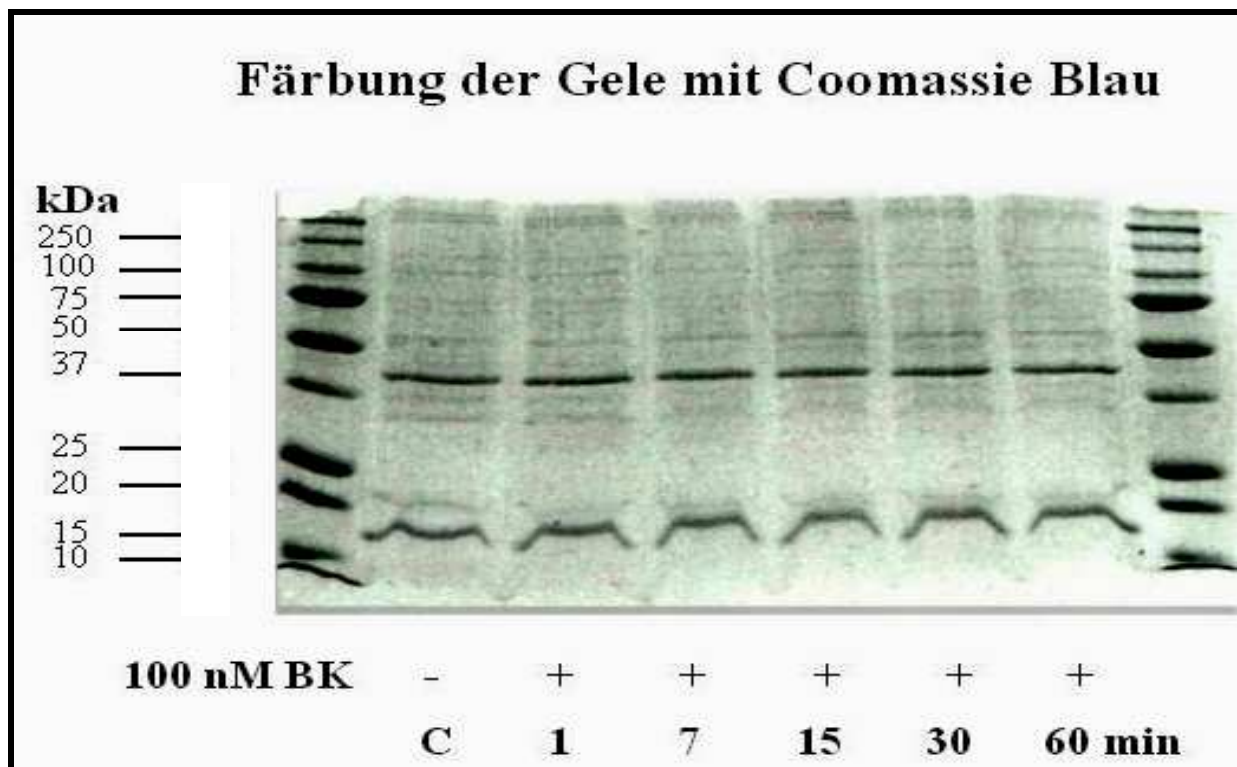
**Abbildung 19:** IP<sub>3</sub> Konzentrationen in Peritubulärzellen nach Stimulation mit Bradykinin über verschiedene Zeiträume. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Symbole (\*) bzw. (\*\*) zeigen dabei ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.2.4 Western Blot - Untersuchungen zum Nachweis Bradykinin induzierter Proteinphosphorylierungen

Zum Nachweis von Bradykinin induzierten Proteinphosphorylierungen wurden Peritubulärzellen mit Bradykinin über verschiedene Zeiträume inkubiert. Die Zellen wurden lysiert, das Lysat mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend folgte die immunologische Detektion von phosphorylierten Tyrosin-, Serin- und Threoninresten auf der Membran.

#### 3.2.4.1 Färbung der Gele mit Coomassie Blau

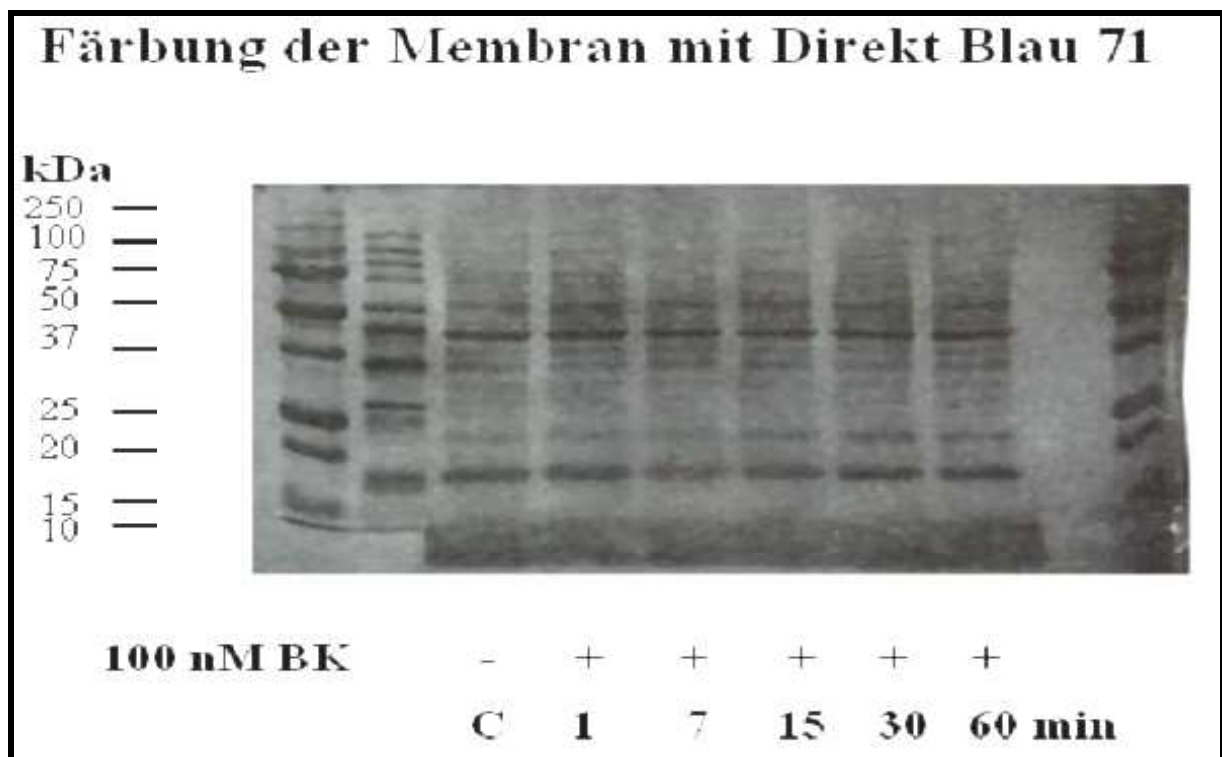
Um die korrekte Auftrennung des Lysates zu überprüfen, wurden die Gele nach der Elektrophorese mit dem Farbstoff Coomassie Blau gefärbt (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Polaroidaufnahme eines mit Coomassie Blau gefärbte SDS-PAGE Gels eines Lysates aus Peritubulärzellen nach Stimulation mit 100nM BK über verschiedene Zeiträume.

### 3.2.4.2 Färbung der Membran mit Direkt Blau 71

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese mit Direktblau 71 gefärbt (Abbildung 21). Auf diese Weise konnte der korrekte Transfer auf die Membran kontrolliert werden. Zudem diente diese Färbung als Kontrolle zur gleichmäßigen Beladung der einzelnen Spuren.



**Abbildung 21:** Polaroidaufnahme einer mit Direkt Blau 71 gefärbten Membran nach erfolgtem Transfer der Proteine

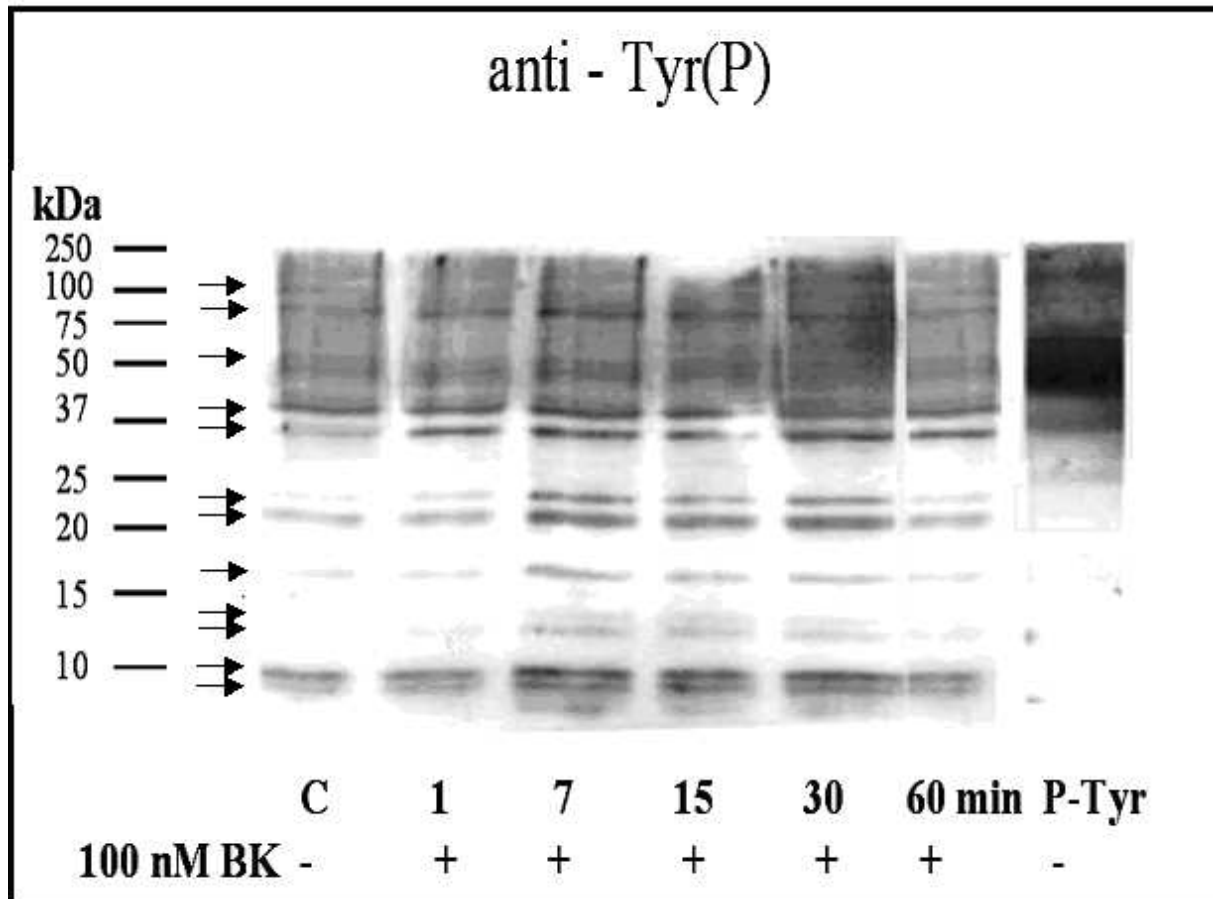
### **3.2.4.3 Immunologische Identifikation phosphorylierter Proteine auf der Nitrocellulosemembran**

Die immunologische Identifikation erfolgte durch den Einsatz von monoklonalen Antiphosphotyrosin, -serin und -threonin Antikörpern. Als Zweitantikörper fand ein HRP-konjugierter gegen die Maus gerichteter Antikörper (Ziege) Verwendung. Die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe des ECL Systems (Enhanced chemilumineszenz System, Amersham Pharmacia Biotech) visualisiert.

#### **3.2.4.3.1 Tyrosinphosphorylierungen**

Bereits nach einer Minute Inkubationsdauer ließen sich eindeutige Unterschiede im Tyrosinphosphorylierungsmuster im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennen (s. Abbildung 22). Besonders deutlich wurde der Unterschied nach 7 Minuten Stimulation mit Bradykinin. Zweifelfrei zu erkennen waren im Vergleich zur Kontrolle intensivere Banden im Bereich 100, 60, 40, 24, 22 kDa, sowie 2 unter 10kDa. Etwa 60 Minuten nach erfolgter Stimulation begannen die Banden teilweise wieder zu verschwinden.

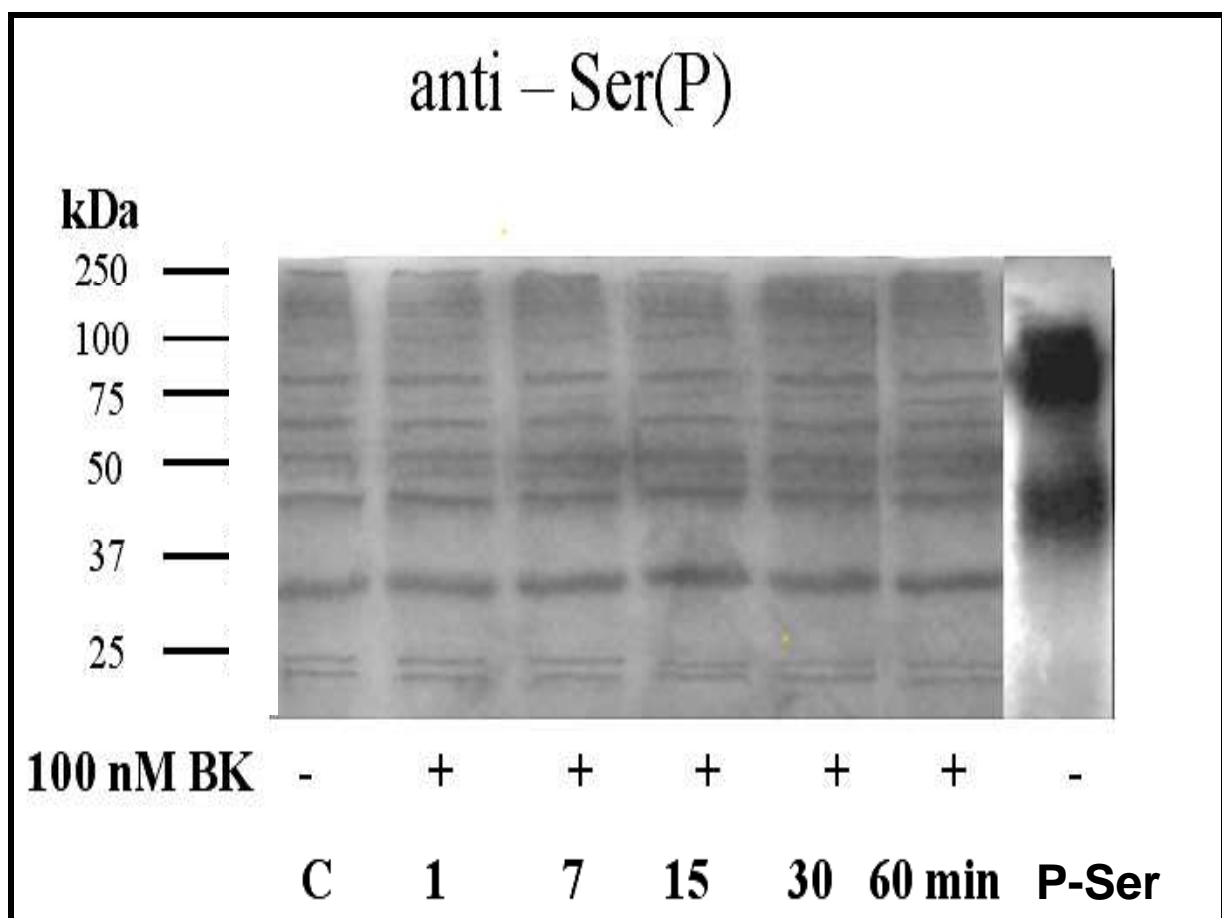
Eine genaue Identifikation der phosphorylierten Proteine bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, verschiedene Möglichkeiten werden in der Diskussion (s.4.1.) erörtert.



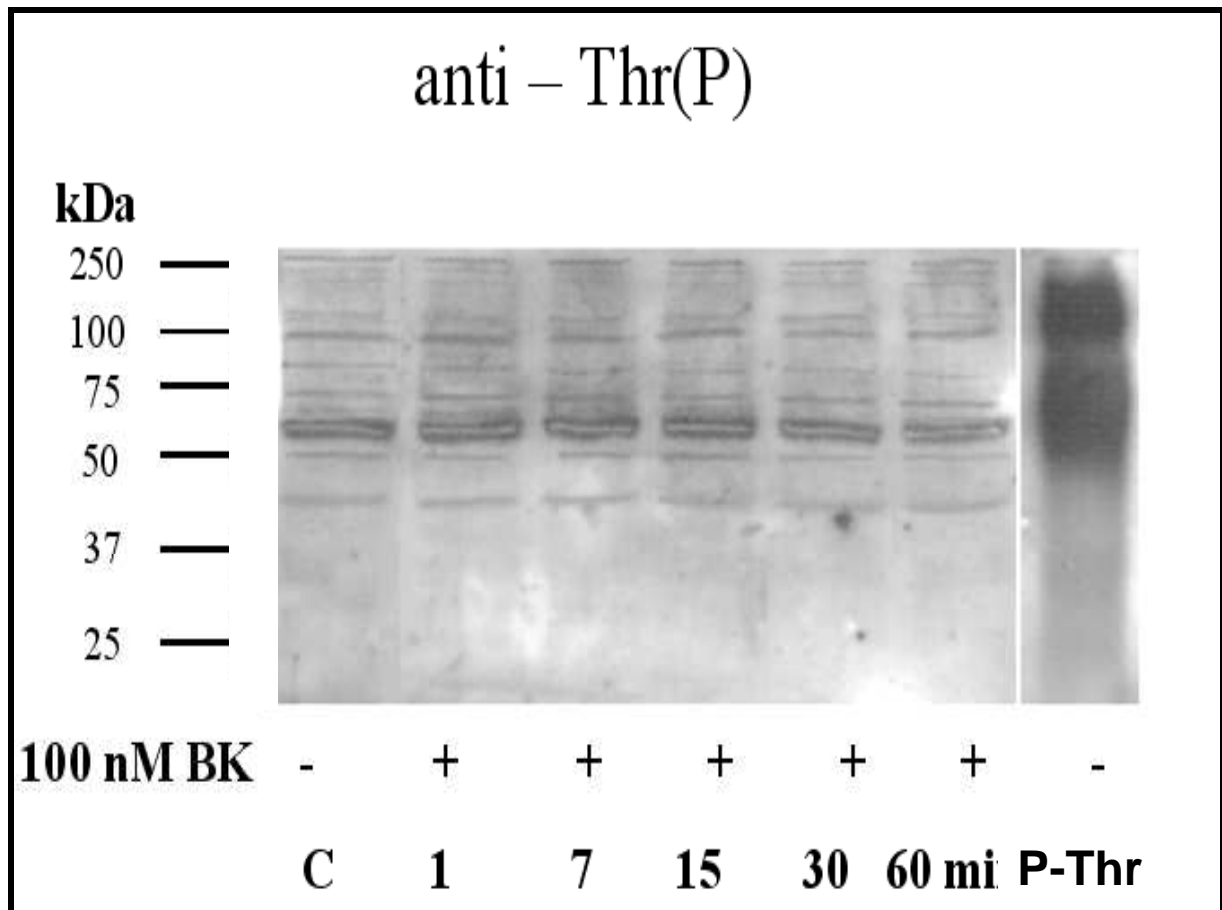
**Abbildung 22:** Immunoblot mit einem monoklonalen Antiphosphotyrosin Antikörper. Bereits eine Minute nach Stimulation mit Bradykinin zeigten sich eindeutig intensivere Banden im Bereich 100, 60, 40, 24, 22 kDa, sowie 2 unter 10kDa im Vergleich zur Kontrolle (→). Dieser Effekt erreicht ein Maximum ca. 7 Minuten nach Stimulation. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.2.4.3.2 Serin- und Threoninphosphorylierung

Weder im Serin- noch im Threoninphosphorylierungsmuster konnte ein Unterschied zwischen stimulierten Zellen und der Kontrolle festgestellt werden (s. Abbildung 23, 24).



**Abbildung 23:** Immunoblot mit einem monoklonalen Antiphosphoserin Antikörper. Es ist kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den stimulierten Zellen festzustellen. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.



**Abbildung 24:** Immunoblot mit einem monoklonalen Antiphosphothreonin Antikörper. Es ist kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den stimulierten Zellen festzustellen. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.



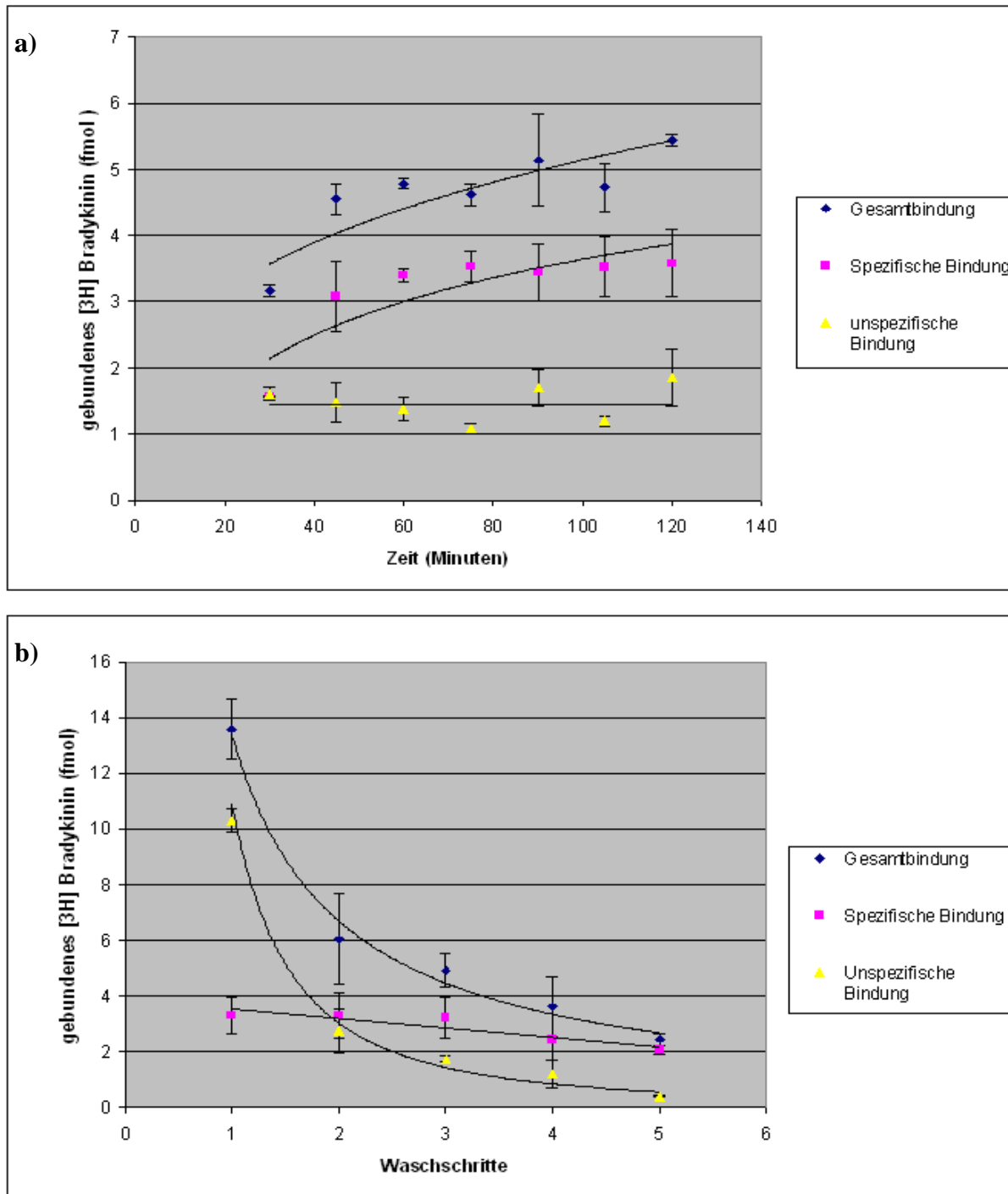
### **3.3 Pharmakologische Charakterisierung des B<sub>2</sub> Rezeptors in Peritubulärzellen**

Die Affinität der Bindung von Bradykinin an den B<sub>2</sub>R der Peritubulärzellen sowie die Dichte dieser Rezeptoren an der Zelloberfläche wurde durch Einsatz des radioaktiv markierten [<sup>3</sup>H] Bradykinin untersucht. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationszähler in der Einheit Zerfälle pro Minute (dpm) gemessen. Um daraus die gebundene Stoffmenge (in fmol) an [<sup>3</sup>H] Bradykinin zu bestimmen, wurde ein µl der Tracer-Stammlösung in Doppelbestimmung im Szintillationszähler gemessen. Aus den gemessenen Counts konnte mit der vom Hersteller gelieferten spezifischen Aktivität (67Ci/mmol) eine Umrechnungskonstante bestimmt werden:

$$\text{dpm} \times 0,0537 = \text{gebundenes } [^3\text{H}] \text{ Bradykinin in fmol}$$

#### **3.3.1 Vorversuche zur Pharmakologie**

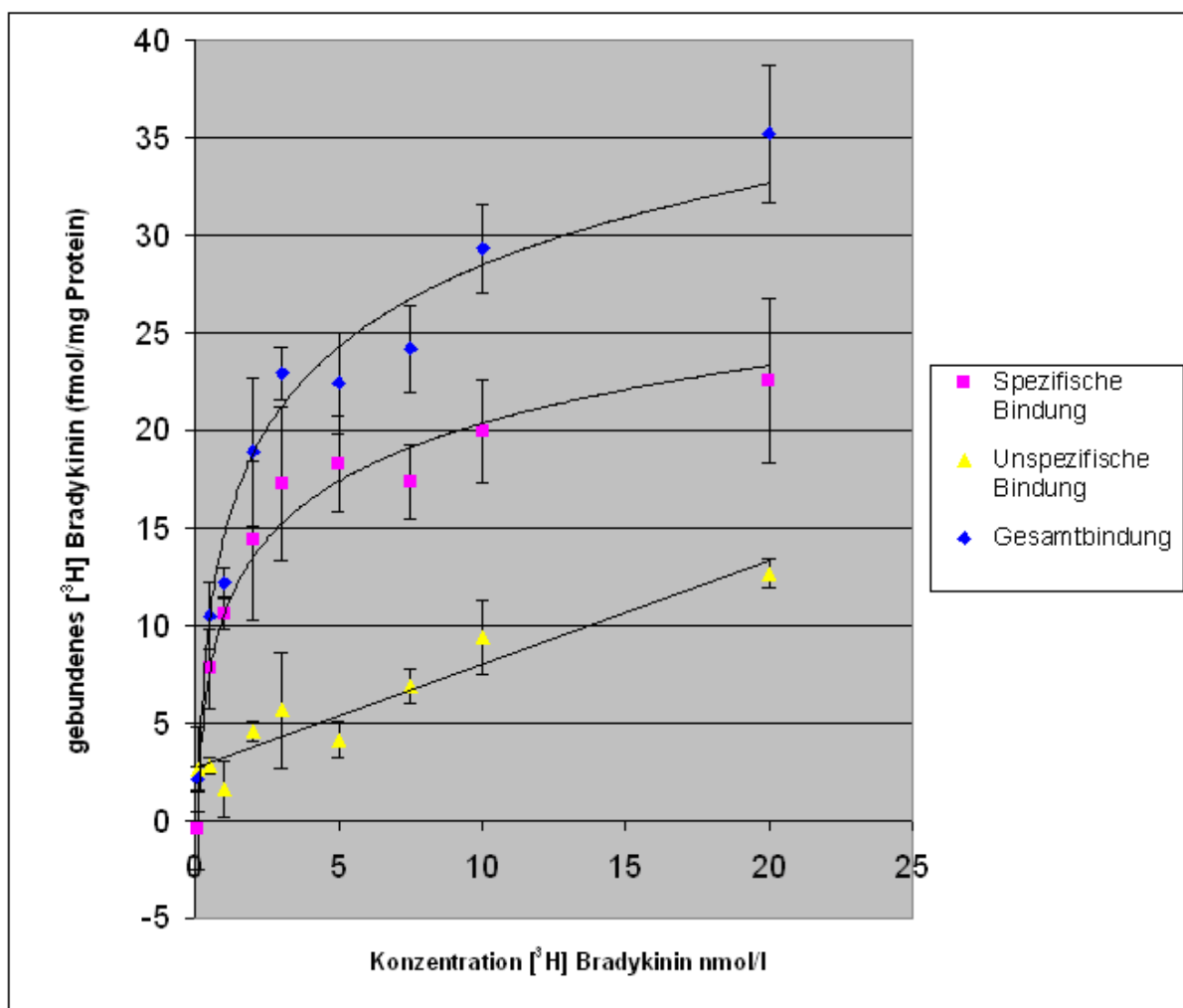
Vor der eigentlichen pharmakologischen Charakterisierung des B<sub>2</sub>R in Peritubulärzellen war es zum einen notwendig, die nötige Inkubationszeit bis zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts zwischen Bradykinin und dem B<sub>2</sub>-Rezeptor zu ermitteln. Zum anderen musste die optimale Anzahl an Waschsritten bestimmt werden, um ein möglichst gutes Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung bei ausreichender Gesamtbindung zu gewährleisten. Dabei zeigte es sich, dass nach 60 Minuten Inkubationszeit ein ausreichendes Gleichgewicht erreicht werden konnte (s. Abbildung 25a). Des Weiteren erwies es sich am günstigsten, nach der Inkubation 3 Waschsritte durchzuführen, da nach 2 Waschsritten eine noch sehr hohe unspezifische Bindung zu verzeichnen war (45,5% der Gesamtbindung), nach viermaligem Waschen hingegen die Gesamtbindung stark abnahm, ohne dabei den Anteil der unspezifischen Bindung nennenswert zu senken (3 x Waschen: 33,1% der Gesamtbindung; 4 x Waschen: 31,4% der Gesamtbindung; s. Abbildung 25b).



**Abbildung 25:** Vorversuche zur Pharmakologie: (a) Peritubulärzellen wurden über verschiedene Zeiträume mit [<sup>3</sup>H] Bradykinin inkubiert. Anschließend wurden jeweils die Gesamtbindung, die spezifische und die unspezifische Bindung ermittelt. Nach 60 Minuten war ein ausreichendes Bindungsgleichgewicht eingetreten. (b) Im Anschluß an die Inkubation wurden eine variable Anzahl an Waschschritten durchgeführt und wieder die Gesamtbindung, die spezifische und die unspezifische Bindung bestimmt. Dabei zeigte sich ein optimales Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung bei ausreichender Gesamtbindung nach 3 erfolgten Waschschritten.

### 3.3.2 Sättigbarkeit der [<sup>3</sup>H] Bradykinin Bindung

Um die Sättigbarkeit der [<sup>3</sup>H] Bradykinin Bindung zu überprüfen, wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen [<sup>3</sup>H] Bradykinin (0,1 - 20nmol/l) inkubiert und die gebundene Menge [<sup>3</sup>H] Bradykinin bestimmt. Die unspezifische Bindung wurde jeweils in Gegenwart von 10 µmol unmarkiertem Bradykinin gemessen. Der Anteil an spezifisch gebundenem [<sup>3</sup>H] Bradykinin betrug durchschnittlich 66% der Gesamtbindung. Die aus den erhaltenen Daten erstellte Kurve zeigte die typische hyperbolische Form einer Sättigungskurve bei einer Bindungsstelle (s. Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Peritubulärzellen wurden mit steigenden Konzentrationen an [<sup>3</sup>H] Bradykinin (0,1 nM – 20 nM) inkubiert. Im Anschluß wurden die Gesamtbindung, die spezifische und die unspezifische Bindung ermittelt. Die Kurve aus den Messdaten der spezifischen Bindung zeigt die typische hyperbolische Form einer Sättigungskurve bei einer Bindungsstelle. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

Im Gleichgewicht gilt für die Dissoziationskonstante  $K_d$  und die maximale Bindungskapazität  $B_{max}$ :

$$K_d = \frac{[\text{freie Rezeptoren}] \times [\text{freier Ligand}]}{[\text{gebundener Ligand}]}$$

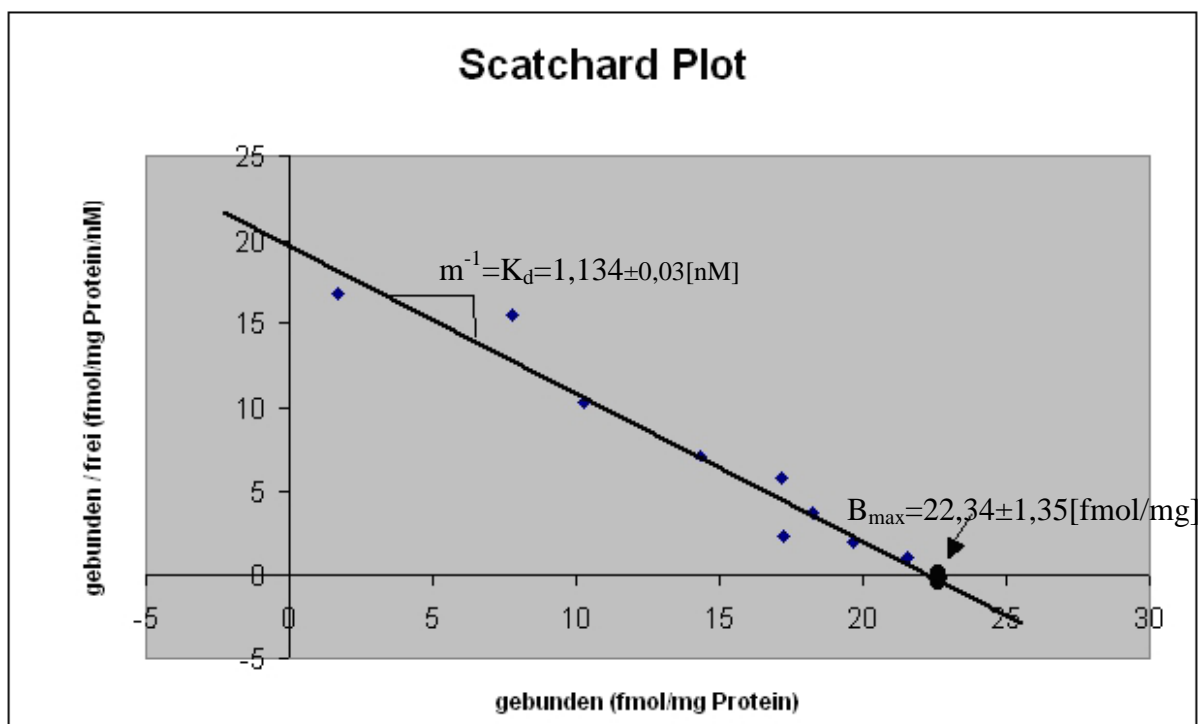
$$B_{max} = [\text{freie Rezeptoren}] + [\text{gebundener Ligand}]$$

Daraus folgt:  $[\text{gebundener Ligand}] = B_{max} \times \frac{[\text{freier Ligand}]}{K_d + [\text{freier Ligand}]}$

Durch weitere Umformung erhält man die Lineartransformation nach Scatchard:

$$\frac{[\text{gebundener Ligand}]}{[\text{freier Ligand}]} = -\frac{[\text{gebundener Ligand}]}{B_{max}} + \frac{B_{max}}{K_d}$$

Trägt man die experimentellen Daten in der Form  $[\text{gebundener Ligand}]/[\text{freier Ligand}]$  gegen  $[\text{gebundener Ligand}]$  auf, erhält man folgende Gerade:



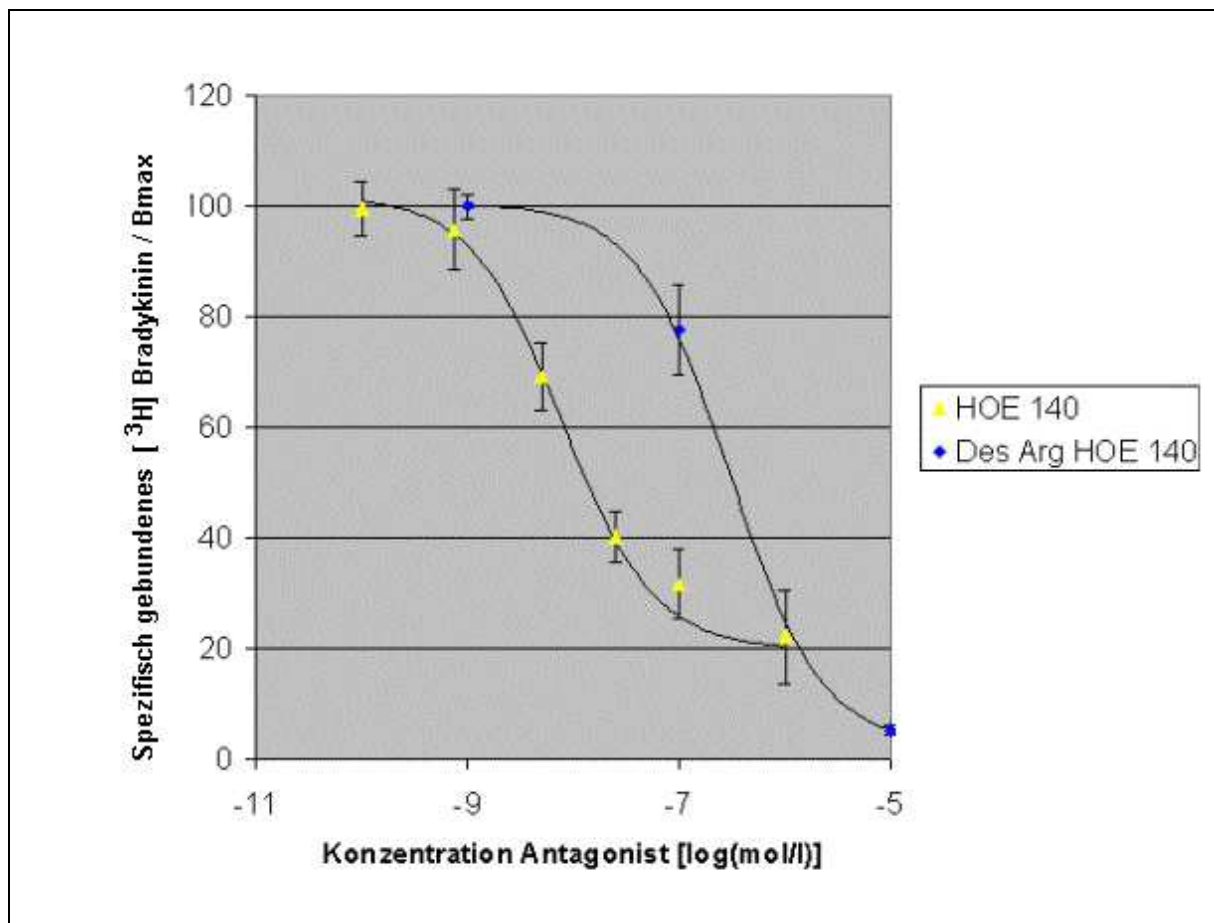
**Abbildung 27:** Darstellung der in den Sättigungsexperimenten erhaltenen Daten nach Scatchard. Die Schnittstelle zwischen der Ausgleichsgeraden und der x-Achse entspricht der maximalen Bindungskapazität  $B_{max}$ . Die Dissoziationskonstante  $K_d$  ergibt sich aus dem Reziprokwert der Steigung der Ausgleichsgeraden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

---

Dabei ist der Reziprokwert der Steigung der Ausgleichsgeraden gleich der Dissoziationskonstante  $K_d$ , die Schnittstelle mit der y - Achse die maximale Bindungskapazität  $B_{max}$ . Für  $K_d$  konnte ein Wert von  $1,134\text{nM} \pm 0,03$  ermittelt werden,  $B_{max}$  war  $22,34 \pm 1,35\text{fmol} / \text{mg Protein}$ . Es konnte weiterhin ein Hill Koeffizient von  $0,97$  bestimmt werden, was auf eine spezifische Bindungsstelle hinweist.

### 3.3.3 Verdrängbarkeit der [<sup>3</sup>H] Bradykinin Bindung

Durch den Einsatz des spezifischen B<sub>2</sub>R Antagonisten HOE 140 ließ sich die [<sup>3</sup>H] Bradykinin Bindung am B<sub>2</sub>R unterdrücken. Der B<sub>1</sub> selektive Antagonist Des-Arg-Hoe 140 war im einstelligen nanomolaren Bereich wie erwartet nicht in der Lage, das [<sup>3</sup>H] Bradykinin an seiner Bindung zu hindern. Erst in ca. 100fach höheren Konzentrationen konnte jedoch eine Verdrängung beobachtet werden.



**Abbildung 28:** Nach Erreichen eines Bindungsgleichgewichtes wurde durch den Einsatz von verschiedenen Antagonisten versucht, das [<sup>3</sup>H] Bradykinin aus der Bindung zu verdrängen. Für den B<sub>2</sub> spezifischen Antagonisten HOE140 wurde eine IC<sub>50</sub> von  $7,9 \pm 0,8$ nM ermittelt. Der B<sub>1</sub> spezifische Antagonist [desArg] HOE140 war erst in sehr viel höheren Konzentrationen in der Lage, das [<sup>3</sup>H] Bradykinin aus seiner Bindung zu verdrängen (IC<sub>50</sub>  $302 \pm 32$  nM).

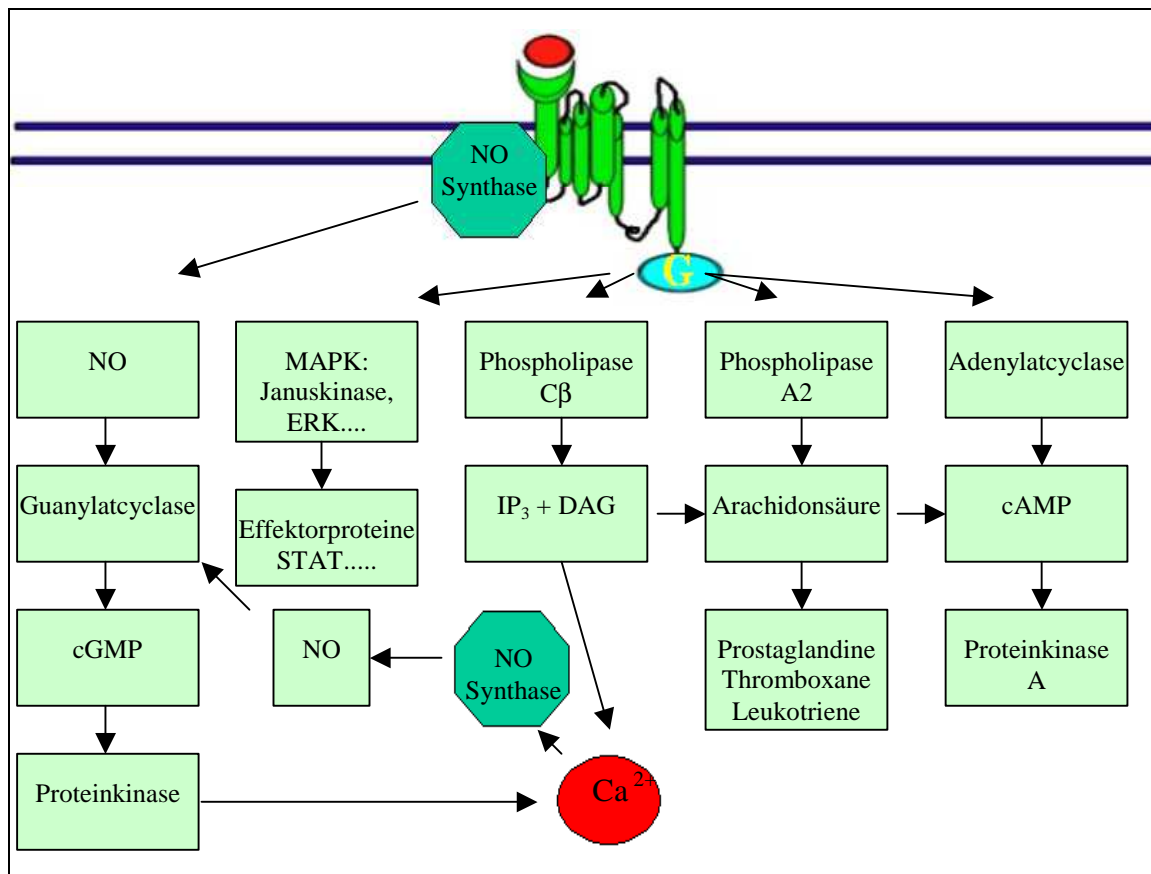
---

Durch Extrapolation der erhaltenen Messwerte mittels der Software Graph Pad Prism wurden als Maß für die mittlere Hemmkonzentration der  $IC_{50}$  Wert von  $7,9 \pm 0,8$  nM für HOE 140 bzw.  $302 \pm 32$  nM für [desArg] HOE140 bestimmt. Der  $IC_{50}$ -Wert entspricht der Wirkkonzentration, bei der die Meßgröße um 50% im Vergleich zur Kontrolle abgenommen hat.

## 4 Diskussion

Da eindeutig belegt wurde, daß der Bradykinin Typ 2 Rezeptor in Peritubulärzellen prä-pupertärer Ratten exprimiert wird (Monsees et al., 2003, 2002, 1999) und auch funktional ist (Wennemuth et al., 2003), wurden diese Zellen in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem genutzt, um den B<sub>2</sub> Rezeptor bezüglich der intrazellulären Signaltransduktion und der Pharmakologie weiter zu charakterisieren.

### 4.1 Signaltransduktion des B<sub>2</sub> Rezeptors



**Abbildung 29:** Schematischer Überblick über die wichtigsten in verschiedenen Geweben und Zelltypen an den B<sub>2</sub> Rezeptor gekoppelten Signaltransduktionspfade (eigene Skizze).



Wie bereits geschildert, unterliegen die an den Rezeptor gekoppelten Signalpfade und die Art der Quervernetzung zwischen den einzelnen Wegen einer hohen Variabilität in Abhängigkeit von der Art des Gewebes.

In Endothelzellen verschiedener Spezies und Lokalisationen konnte eine Signaltransduktion über den eNOS / NO / cGMP Transduktionspfad nachgewiesen werden (Marretero et al., 1999, Castro et al., 1998, Boulanger et al., 1990). Auch eine Triggerung der Phospholipase C und die Bildung von IP<sub>3</sub> (Lambert et al., 1986) wurde nach B<sub>2</sub>R Stimulation beobachtet. In bovinen Endothelzellen aus der Aorta zeigte sich auch eine Aktivierung der Jak/Stat Kaskade als Vertreter eines MAPK Pathways (Ju et al., 2000).

Bei Mesangialzellen der Ratte wurde die Bildung von Diacylglycerin und IP<sub>3</sub> über die Phospholipase C mit subsequentem Ca<sup>2+</sup> Anstieg, die Bildung von Prostaglandinen und eine indirekte Hemmung der Adenylatcyclase nach B<sub>2</sub>R Stimulation beschrieben (Bascands et al., 1993, Castano et al., 1998).

Demgegenüber zeigte sich eine direkte Hemmung der cAMP Bildung nach Stimulation durch Bradykinin bei Ileummembranen von Meerschweinchen (Liebman et al., 1994). Ein direkt über ein G-Protein der Subklasse G<sub>s</sub> vermittelter Anstieg der cAMP Konzentration wurde hingegen bei humanen epidermalen Karzinomzellen beobachtet (Liebman et al., 1996), während in trachealen glatten Muskelzellen eine indirekte Aktivierung der Adenylatcyclase und damit verbundener cAMP Anstieg über die Phospholipase D nachgewiesen wurde (Stevens et al., 1994).

Unter anderem in Fibroblasten und Keratinozyten konnte eine Änderung des Phosphorylierungsmuster nach Aktivierung des B<sub>2</sub>R dokumentiert werden (Tippmer et al., 1996; Coutant et al., 1995).

Neben der direkten Aktivierung von Signaltransduktionspfaden durch den B<sub>2</sub>R existiert ein vielfältiges System von Quervernetzungen und Rückkopplungsmechanismen, die bisher nur ansatzweise erforscht sind. Bereits erwähnt wurde die indirekte Aktivierung der Adenylatcyclase über die Phospholipase D (Stevens et al., 1994) und die indirekte Hemmung des Enzyms über die Phospholipase C (Bascands et al., 1993). In humanen epidermalen Karzinomzellen wiederum führt die Aktivierung der Adenylatcyclase über eine gesteigerte cAMP Produktion zu einer Inhibierung der Proteinkinase C (Liebmann et al., 1996). Im Falle von mesengialen Rattenzellen aktiviert eine erhöhte

cAMP Konzentration die Bildung von Prostaglandin E (Castano et al., 1998). Der für Endothelzellen beschriebene Anstieg der cGMP Konzentration wird durch eine Stickstoffoxid (NO) getriggerte Aktivitätssteigerung der Guanylatcyclase ausgelöst. Die NO Produktion kann zum einen durch die Aktivierung der NO Synthase nach Dissoziation vom Komplex mit dem B<sub>2</sub>R und die dadurch erhöhte NO Produktion zurückgeführt werden, zum anderen ist aber auch ein indirekter Weg über die Phospholipase C / IP<sub>3</sub> Kaskade beschrieben, wo die NO Synthase Ca<sup>2+</sup> und Calmodulin abhängig reguliert wird (Marrero et al., 1999).

Über die Bradykininsignaltransduktion in den Reproduktionsorganen existieren bisher nur wenige Daten. Im weiblichen Genitaltrakt ist bei Ovarialzellen ein biphasischer Ca<sup>2+</sup> Einstrom nach Stimulation des Rezeptors nachweisbar. Die erste Phase kann auf einen IP<sub>3</sub> getriggerten Ca<sup>2+</sup> Einstrom zurückgeführt werden, die zweite Phase erklärt sich durch einen durch Tyrosinphosphorylationen ausgelösten Ca<sup>2+</sup> Einstrom von extrazellulär. Im Myometrium des Uterus kann Bradykinin Kontraktionen auslösen, nach Stimulation des B<sub>2</sub>R wurde weiter eine Inhibierung der Adenylatcyclase nachgewiesen. Ob die Kontraktionen dabei durch die geänderte cAMP Konzentration ausgelöst werden, ist bisher nicht bekannt (Liebman et al., 1990). In Dezidualzellen des Uterus ist eine Signaltransduktion über eine Bildung von Arachidonsäure, Prostaglandinen und Interleukinen beschrieben (Buchinger et al., 1999). Auch beim Mann kann die Bildung von Prostaglandinen nach Stimulation des B<sub>2</sub>R in epididymalen Epithelzellen beobachtet werden (Pierucci-Alves et al., 2008). Neueste Studien berichten von einer Bradykinin abhängigen Regulation des Aquaporin 9 im Epididymis. Diese wird über eine Änderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration vermittelt (Belleannée et al., 2009).

In früheren Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass immature Peritubulärzellen auf nanomolare Bradykinin - Stimulation mit einem signifikanten Anstieg der Konzentration an Ca<sup>2+</sup> Ionen reagieren (Wennemuth et al., 2003). Dieser Effekt konnte durch Einsatz von spezifischen Agonisten / Antagonisten zweifelsfrei auf Aktivierung des B<sub>2</sub>R zurückgeführt werden. Der Einstrom von Ca<sup>2+</sup> Ionen war dabei deutlich konzentrationsabhängig. Weiter konnte eine Desensibilisierung des Rezeptors bei mehrfacher Stimulation nachgewiesen werden. Die Ca<sup>2+</sup> Antwort war bei der zweiten und dritten Stimulation noch nachweisbar, aber deutlich schwächer ausgeprägt. Durch Blockierung der Sarco(endo)plasmischenreticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) mittels Vor

behandlung mit Thapsigargin wurde der  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom vollständig unterbunden. Diese Tatsache deutet auf intrazelluläre Speicher als Quelle für das einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$  hin. Allerdings war der Calciumeinstrom bei Stimulation der Zellen in einem  $\text{Ca}^{2+}$  freien Medium deutlich schwächer ausgeprägt als in Anwesenheit von extrazellulären Calcium. Dies läßt vermuten, dass die Stimulation des  $\text{B}_2\text{R}$  einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Calciumspeichern triggert. Die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration wiederum öffnet konzentrationsabhängige Ionenkanäle und führt subsequent zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  von extrazellulär nach intrazellulär.

Da die Beteiligung von Calciumionen an der Signaltransduktion des  $\text{B}_2\text{R}$  feststand, interessierten uns bei den Untersuchungen vor allem Signaltransduktionswege, die an das  $\text{Ca}^{2+}$  System gekoppelt sind.

Zu nennen ist hier zunächst das System über das Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ), das zur Entleerung intrazellulärer Calcium Speicher führt, aber auch der NO/cGMP Transduktionspfad.

Da viele Proteinkinasen in ihrer Funktion von der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration abhängig sind, sollte zudem das Phosphorylierungsmuster der Zellproteine nach Stimulation betrachtet werden.

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich, konnte eine erhöhte cGMP Konzentration nach Stimulation des  $\text{B}_2$  - Rezeptors nicht festgestellt werden. Da die Peritubulärzellen allerdings auf Stimulation mit ANP mit verstärkter cGMP Produktion reagierten und somit eine Funktionsfähigkeit des Assay Systems sowie die Vitalität der Zellen demonstriert waren, kann ein Einfluss der Guanylatcyclase auf die Signaltransduktion des  $\text{B}_2\text{R}$  in Peritubulärzellen der Ratte nahezu ausgeschlossen werden. In vielen Geweben verläuft die Signaltransduktion auch über eine Regulation der Aktivität der Adenylatcyclase. Bei dem hier untersuchten  $\text{B}_2\text{R}$  konnte jedoch weder eine Aktivierung, noch eine Inhibierung der Adenylatcyclase festgestellt werden.

Dagegen zeigte sich eine eindeutige Beteiligung des  $\text{IP}_3$  Systems an der Signaltransduktion: Die Zellen reagierten auf Rezeptoraktivierung durch Bradykinin konzentrationsabhängig schon nach 5 Sekunden mit einem signifikant erhöhten Inositoltriphosphat-Gehalt. Der Anstieg des  $\text{IP}_3$  war nach 5 Minuten bereits wieder deutlich abgesunken. Diese Schnelllebigkeit ist typisch für das  $\text{IP}_3$  System. Wie aus vielen Geweben und

Zellarten bekannt, führt die erhöhte  $IP_3$  Konzentration zu einer Öffnung von Ionenkanälen des endoplasmatischen Retikulums und zu einem Einstrom von  $Ca^{2+}$  in den freien intrazellulären Raum.

Zu vermuten ist, dass bei der Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und der Bildung von Inositol -1,4,5- trisphosphat ( $IP_3$ ) durch Generierung von Diacylglycerin auch der hier nicht untersuchte Signaltransduktionspfad über die Arachidonsäure und die subsequente Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen getriggert wird, wie dies in verschiedenen Geweben bekannt ist (Pierrucci-Alves et al., 2008, Bascands et al., 1993, Castano et al., 1998).

Weiterhin konnte nach Inkubation der Zellen mit Bradykinin ein verändertes Tyrosinphosphorylierungsmuster dargestellt werden:

Banden im Bereich von 100, 60, 40, 24, 22 kDa sowie 2 unter 10kDa zeigten eine markante Zunahme der Intensität, die etwa eine Stunde nach Beginn der Stimulation wieder abnahm. Eine exakte Identifizierung der phosphorylierten Zielproteine ist ohne weitere Untersuchungen jedoch nicht möglich und bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

Denkbar sind die Produkte von  $Ca^{2+}$  abhängigen Proteinkinasen wie die Proteinkinase C, aber auch Bestandteile der MAP Kinase Kaskade (mitogen activated protein kinase), die auch direkt durch den  $B_2R$  aktiviert werden kann.

Schließlich ist auch vorstellbar, dass der  $B_2R$  als Folge seiner eigenen Aktivierung phosphoryliert und durch diesen Mechanismus desensibilisiert wird, wie dies in der Literatur für andere Gewebe bereits beschrieben worden ist (Blaukat et al., 1996). Allerdings läuft dieser Mechanismus typischerweise über die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten, nicht über Tyrosinphosphorylierungen. Eine Änderung im Serin- bzw Threoninphosphorylierungsmuster konnte jedoch von uns nicht beobachtet werden. Da aber bekannt ist, dass auch der  $B_2$  Rezeptor in Peritubulärzellen der Ratte schnell desensibilisiert wird (Wennemuth et al., 2003), liegt hier möglicherweise ein anderer Mechanismus der Desensibilisierung vor. Denkbar ist allerdings auch, dass die Phosphorylierung des  $B_2$  Rezeptor quantitativ so gering ausfällt, dass sie mit den verwendeten Methoden nicht nachzuweisen war.

## 4.2 Pharmakologie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine sättigbare [ $^3\text{H}$ ] Bradykinin Bindung an kultivierten Peritubulärzellen aufgezeigt werden. Die Bindung scheint dabei weitgehend durch eine einzige Bindungsstelle vermittelt zu werden, da keine Hinweise für das Vorliegen weiterer Bindungsstellen gefunden wurden. So zeigt die Bindungskurve die typische hyperbolische Form einer Sättigungskurve bei einer Bindungsstelle. Weiterhin war der zugehörige Scatchard Plot linear ( $r=0,97$ ) und der ermittelte Hill Koeffizient lag mit  $0,96$  in der Nähe von  $1$ .

Durch den Einsatz der selektiven Antagonisten HOE140 und [desArg]-HOE140 konnte der  $B_2$  Rezeptor als Bindungspartner identifiziert werden: Der selektive  $B_2$  Antagonist HOE140 konnte schon im einstelligen nanomolaren Bereich das [ $^3\text{H}$ ] Bradykinin fast vollständig an seiner Bindung hindern.

Der  $B_1$  selektive Antagonist Des-Arg-Hoe 140 verdrängte das [ $^3\text{H}$ ] Bradykinin erst in sehr viel höheren Konzentrationen. Es ist bekannt, dass dieser Antagonist in sehr hohen Konzentrationen auch eine gewisse unspezifische Affinität zu  $B_2$  Rezeptoren aufweist.

Die ermittelten pharmakologischen Parameter stimmen gut mit den in der Literatur publizierten Werten überein: Für die maximale Rezeptordichte  $B_{\text{max}}$  sind u.a. Werte von  $3,2$  fmol/mg Protein in Skelettmuskelzellen von adulten Meerschweinchen (Rabito et al., 1996),  $25,1 \pm 0,3$  fmol / mg Protein in Zellkulturen von trachealen glatten Muskelzellen von Hunden (Yang et al., 1995),  $22,75 \pm 1,3$  fmol / Protein bei humanen Umbilicalvenen (Gessi et al., 1997) sowie  $271 \pm 19$  fmol / mg Protein bei Skelettmuskelzellen der Ratte (Rabito et al., 1996) überliefert. Der von uns ermittelte Wert für Peritubulärzellen bei Ratten von  $22,34 \pm 1,35$  fmol / mg Protein liegt also zwischen den für andere Zellen ermittelten Werten. Auch die Dissoziationskonstante  $K_d$  war mit  $1,134 \pm 0,03$  nM vergleichbar mit für andere Gewebe publizierten Werten. Für die Skelettmuskelzellen von adulten Meerschweinchen wurde eine  $K_d$  von  $0,83 \pm 0,16$  nM (Rabito et al., 1996) ermittelt, bei den humanen Umbilicalvenenendothelzellen zeigte sich eine  $K_d$  von  $0,51 \pm 0,02$  nM (Gessi et al., 1997).

---

Die pharmakologische Charakterisierung von trachealen glatten Muskelzellen von Hunden lieferte eine  $K_d$  von  $2,5 \pm 0,3 \text{ nM}$  (Yang et al., 1995).

### 4.3 Postuliertes Modell

Bei Peritubulärzellen aus dem Testis von praepubertären Ratten fanden sich alle Bestandteile eines vollständigen Kallikrein-Kinin-Systems. So konnten Kininogene wie das LMWK (low molecular weight kininogen), verschiedene membranständige Kininasen, das den Kininogenasen zugerechnete Gewebskallikrein und der B<sub>2</sub> Rezeptor nachgewiesen werden. Bei adulten Ratten hingegen zeigte sich an den Peritubulärzellen keine Expression von Gewebskallikrein und des B<sub>2</sub> Rezeptors mehr (Monsees et al., 2003, 2002, 1999, 1998, 1997; Saitoh et al 1987, Takano et al., 1997, 2000; Kos, 2001).

Bei einer pharmakologischen Charakterisierung des B<sub>2</sub> Rezeptors an kultivierten Peritubulärzellen von praepubertären Ratten konnte in der vorliegenden Arbeit eine maximale Rezeptordichte B<sub>max</sub> von  $22,34 \pm 1,35$  fmol / mg Protein ermittelt werden. Die Dissoziationskonstante K<sub>d</sub> betrug  $1,134 \pm 0,03$  nM. Die gemessene Bindung konnte durch Verdrängungsstudien mit spezifischen Antagonisten eindeutig auf den B<sub>2</sub> Rezeptor zurückgeführt werden.

Bei Aktivierung des B<sub>2</sub> Rezeptors zeigte sich bei den aktuellen Versuchen ein rascher und signifikanter Anstieg der intrazellulären Inositoltrisphosphatkonzentration. In vorherigen Studien (Wennemuth et al., 2003) war bereits eine deutlich erhöhte Ca<sup>2+</sup> Konzentration nach Stimulation des Rezeptors nachgewiesen worden. Diese kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die für viele Gewebe beschriebene Öffnung von Ca<sup>2+</sup> Ionenkanälen des endoplasmatischen Retikulums durch das Inositoltrisphosphat zurückgeführt werden, was wiederum zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> Ionen nach intrazellulär führt.

Bei wiederholter Stimulation war die beschriebene Reaktion quantitativ schwächer ausgeprägt. Dies belegt eine Desensibilisierung bei multipler Stimulation.

Weiter zeigten im Rahmen der aktuellen Arbeit angefertigte Westernblotstudien, dass die an den B<sub>2</sub>R gekoppelten Signaltransduktionswege zu einem geänderten Tyrosinphosphorylierungsmuster der Zellproteine von Peritubulärzellen führen. Im Serin- und Threoninphosphorylierungsmuster konnte keine Bradykinin induzierte Änderung nachgewiesen werden. Die Identifikation der phosphorylierten Proteine und der zur Phosphorylierung führende Transduktionswege bleibt weiteren Studien vorbehalten.

## 5 Zusammenfassung

In der Literatur konnten alle Komponenten eines funktionierenden Kallikrein-Kinin-Systems im männlichen Reproduktionstrakt nachgewiesen werden. Die Expression der einzelnen Komponenten hängt dabei vom Alter des Tieres und vom Stadium der Spermatogenese ab. Dies lässt eine Beteiligung des Kallikrein-Kininsystems an der Regulation der Spermatogenese vermuten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den bereits in Peritubulärzellen aus dem Testis praepubertärer Ratten nachgewiesenen B<sub>2</sub> Rezeptor pharmakologisch zu charakterisieren und auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege zu untersuchen.

Alle Versuche wurden an Peritubulärzellen durchgeführt, die in Primärkultur aus den Testis praepubertärer Ratten isoliert wurden. Bei den Versuchen zur Signaltransduktion wurden die Zellen mit Bradykinin und geeigneten Kontrollen stimuliert und anschließend lysiert. Das Lysat wurde dann per ELISA, RIA bzw. Westernblot untersucht, um Rückschlüsse auf die Signaltransduktionsmechanismen ziehen zu können.

Die pharmakologische Charakterisierung erfolgte durch Einsatz von [<sup>3</sup>H] Bradykinin. Adhärente Peritubulärzellen wurden mit ansteigenden Tracerkonzentrationen inkubiert, um die Sättigbarkeit zu demonstrieren und die Rezeptorbindung zu charakterisieren. Die pharmakologische Spezifität wurde durch Verdrängungsexperimente mit den spezifischen Antagonisten HOE140 bzw. Des-Arg-HOE140 nachgewiesen.

Nach Stimulation des B<sub>2</sub>R mit Bradykinin konnte eine dosisabhängige signifikant erhöhte IP<sub>3</sub> Konzentration gemessen werden. Der Gehalt der Peritubulärzellen an cAMP und cGMP blieb hingegen unverändert.

Mit Westernblotuntersuchungen wurden durch Bradykinin induzierte Tyrosinphosphorylierungen im Bereich 100, 60, 40, 24, 22 und unter 10kDa nachgewiesen. Das Serin- und Threoninphosphorylierungsmuster zeigte dagegen keine Änderung nach Stimulation mit Bradykinin.

An pharmakologischen Parametern konnte eine Dissoziationskonstante K<sub>d</sub> von 1,13nM und eine maximale Rezeptordichte B<sub>max</sub> von 22,34fmol / mg Protein bestimmt werden. Der ermittelte Hill Koeffizient war 0,97. Die Werte für die mittlere



---

Hemmkonzentration  $IC_{50}$  waren 7,9nM für HOE 140 bzw. 302nM für Des-Arg-HOE140.

Die Form der ermittelten Sättigungskurve und des zugehörigen Scatchard Plot sowie der bestimmte Hillkoeffizient von 0,97 sprechen dafür, dass die Bradykinin Bindung an Peritubulärzellen an einer spezifischen Bindungsstelle erfolgt. Durch den Einsatz spezifischer Antagonisten konnte der  $B_2$  Rezeptor als Bindungsstelle verifiziert werden.

Die ermittelten pharmakologischen Parameter des  $B_2R$  in Peritubulärzellen der Ratte waren mit den in der Literatur für andere Gewebe publizierten Werten vergleichbar.

Die Signaltransduktion des  $B_2$  Rezeptors in Peritubulärzellen erfolgt unserer Ansicht nach über eine Spaltung von Phosphatidyl inositol-4,5-diphosphat in Diacylglycerol und Inositoltriphosphat, welches wiederum zu einer Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher führt. Die veränderte  $Ca^{2+}$  Konzentration aktiviert dann verschiedene Kinasen, was sich in einem geänderten Phosphorylierungsmuster niederschlägt. Auch eine direkte Aktivierung von verschiedenen Kinasen durch den  $B_2R$  scheint wahrscheinlich.

## 6 Abstract

Previous studies have shown that all components of a functional Kallikrein-Kinin system can be detected in the male reproductive tract. Expression of these individual components depends on the animal's age and the stage of spermatogenesis. This may suggest an involvement of the Kallikrein-Kinin system in the regulation of spermatogenesis.

Functional B<sub>2</sub> receptors were detected in peritubular cells of the testes of prepubescent rats. The objective of this work was to pharmacologically characterize these B<sub>2</sub> receptors and to investigate their downstream signal transduction pathways.

All experiments were conducted using peritubular cells that had been isolated in primary culture from the testes of prepubescent rats. In the signal transduction experiments the cells were first stimulated using bradykinin and suitable controls and then subsequently lysed. The lysate was analyzed using ELISA, RIA or western blots to gain insights into the underlying signal transduction mechanisms.

The pharmacological characterization was carried out using radioactive [<sup>3</sup>H] bradykinin.

Adherent peritubular cells were incubated with rising tracer concentrations to demonstrate saturability and to characterize the receptor binding. The pharmacological specificity was demonstrated using substitution experiments with the specific antagonists HOE140 and Des-Arg HOE 140, respectively.

Following stimulation of the B<sub>2</sub>R with bradykinin, a dose dependent significantly elevated IP<sub>3</sub> concentration was measured. In contrast, the concentration of cAMP and cGMP in peritubular cells was not affected.

Using western blots, we demonstrated bradykinin-induced tyrosin phosphorylations in the 100, 60, 40, 24, 22 kDa range and also below 10 kDa. In contrast, no change was seen in serin and threonin phosphorylation patterns after bradykinin stimulation.

As pharmacological parameters we determined a dissociation constant K<sub>d</sub> of 1.13 and a maximum receptor density B<sub>max</sub> of 22,34 fmol/mg protein. The Hill coefficient was calculated to be 0.97. The measurements for the medium inhibitor concentration IC<sub>50</sub>

---

yielded 7.9nM for HOE and 302 nM for Des-Arg-HOE140, respectively.

The shape of the saturation curve, the corresponding Scatchard plot and the value found for the Hill coefficient suggest that bradykinin binds to peritubular cells at one specific binding location. Using specific antagonists, we were able to identify the B<sub>2</sub> receptor as this binding location.

The measured pharmacological parameters of the B<sub>2</sub>R in peritubular cells of the rat were in excellent agreement with values published in literature for other tissue types.

We conclude that the signal transduction of the B<sub>2</sub> receptor in peritubular rat cells involves splitting Phosphatidyl inositol-4,5-diphosphate into Diacylglycerol and Inositol-triphosphate which in turn leads to a depletion of the intracellular calcium storage. The rising Ca<sup>2+</sup> concentration then activates various kinases, which results in a modified phosphorylation pattern. In addition, a direct activation of different kinases by B<sub>2</sub>R appears probable.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ABP	androgen <b>b</b> inding <b>p</b> rotein
APS	<b>A</b> mmonium <b>p</b> ersulfat
B <sub>0</sub>	maximum <b>b</b> inding
B <sub>1</sub> R	<b>B</b> radynin <b>B</b> <sub>1</sub> <b>R</b> ezeptor
B <sub>2</sub> R	<b>B</b> radynin <b>B</b> <sub>2</sub> <b>R</b> ezeptor
cAMP	cyclic <b>A</b> denosine-3'5'- <b>M</b> on <b>p</b> hosphate
cGMP	cyclic <b>g</b> uanosine <b>m</b> on <b>p</b> hosphate
ECL System	<b>e</b> nanced <b>c</b> hemilumineszenz <b>S</b> ystem
EDTA	<b>E</b> thylendiamintetra <b>a</b> acetat
ELISA	<b>E</b> nzyme- <b>L</b> inked- <b>I</b> mmunosorbent- <b>A</b> ssay
ER	<b>E</b> ndoplasmatische <b>R</b> etikulum
ERK	<b>e</b> xtracellular <b>a</b> ctivated <b>k</b> inase
FCS	<b>f</b> etal <b>c</b> alf <b>s</b> erum
FSH	<b>f</b> ollikelstimulierenden <b>H</b> ormon
GnRH	<b>G</b> onadotropin <b>r</b> eleasing <b>h</b> ormon
HMWK	high <b>m</b> olecular <b>w</b> eight <b>k</b> ininogen
HPLC	<b>h</b> igh <b>p</b> erformance <b>l</b> iquid <b>c</b> hromatography
HRP	<b>H</b> orseradish <b>p</b> eroxidase
IBMX	3- <b>I</b> sobutyl-1- <b>M</b> ethyl <b>x</b> anthin
IGF-1	<b>I</b> nsulin-like- <b>G</b> rowth <b>F</b> actor <b>1</b>
IP <sub>3</sub>	D-my <sup>o</sup> - <b>I</b> nositol 1,4,5 - <b>T</b> ris <b>p</b> hosphat

---

kDa	<b>Kilo Dalton</b>
KKS	<b>K</b> allikrein- <b>K</b> inin- <b>S</b> ystem
LH	<b>l</b> uteinisierendes <b>H</b> ormon
LMWK	<b>l</b> ow <b>m</b> olecular <b>w</b> eight <b>k</b> ininogen
MAPK	<b>m</b> itogen <b>a</b> ctivated <b>p</b> rotein <b>k</b> inase
mRNA	<b>m</b> essenger <b>r</b> ibonucleic <b>a</b> cid (Ribonukleinsäure)
NSB	<b>N</b> on <b>s</b> ubstrate <b>b</b> inding
PAGE	<b>P</b> olyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<b>P</b> hosphat- <b>b</b> uffered- <b>s</b> aline
Pmod-S	<b>p</b> eritubular cell factor that <b>m</b> odulates <b>S</b> ertoli cell function
RIA	<b>R</b> adio- <b>i</b> mmuno- <b>a</b> ssay
SDS	<b>S</b> odium <b>d</b> odecylsulfate
SERCA	<b>S</b> arco( <b>e</b> ndo)plasmischenreticulum <b>C</b> a <sup>2+</sup> - <b>A</b> TPase
Stat	<b>s</b> ignal <b>t</b> ransducer and <b>a</b> ctivator of <b>t</b> ranscription
TA	<b>T</b> otal <b>a</b> ctivity
TBS	<b>T</b> ris <b>b</b> uffered <b>s</b> aline
TEMED	<b>N</b> ′, <b>N</b> ′, <b>N</b> ′, <b>N</b> ′- <b>T</b> etramethylethylendi <b>a</b> min
TGF-β	<b>T</b> ransforming <b>G</b> rowth <b>F</b> actor β
Tris	<b>T</b> ris-hydroxymethyl-aminomethan

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schematischer Überblick über das Kallikrein-Kinin-System.....	3
<b>Abb. 2:</b> Querschnitt aus einem humanen Tubulus seminiferus.....	13
<b>Abb. 3:</b> Typische hyperbole Bindungskurve bei Sättigungsexperimenten.....	22
<b>Abb. 4:</b> Typischer resultierender Scatchard Plot.....	24
<b>Abb. 5:</b> Typische Verdrängungskurve beim Einsatz von Antagonisten.....	25
<b>Abb. 6:</b> Entnahme der Hoden aus der Ratte.....	31
<b>Abb. 7-10:</b> Mikroskopaufnahmen beim Verdau der Tubuli seminiferi.....	32-33
<b>Abb. 11:</b> Verwendete cAMP Standards.....	39
<b>Abb. 12:</b> Prinzip der ECL Reaktion.....	52
<b>Abb. 13a+b:</b> Mikroskopaufnahmen von kultivierten Peritubulärzellen zwei Tage nach der Aussaat.....	57
<b>Abb. 14a+b:</b> Mikroskopaufnahmen von kultivierten Peritubulärzellen zwei Tage nach der ersten Passage.....	58
<b>Abb. 15a+b:</b> Mikroskopaufnahmen von kultivierten Peritubulärzellen zwei Tage nach der zweiten Passage.....	58
<b>Abb. 16:</b> Mikroskopaufnahmen des immuncytochemischen Nachweis von $\alpha$ -smooth muscle Isoactin.....	60
<b>Abb. 17a+b:</b> Ergebnisse cAMP.....	62
<b>Abb. 18:</b> Ergebnisse cGMP.....	63
<b>Abb. 19:</b> Ergebnisse IP <sub>3</sub> .....	65
<b>Abb. 20:</b> Polaroidaufnahme eines mit Coomassie Blau gefärbten PAGE Gels.....	67

---

<b>Abb. 21:</b> Polaroidaufnahme einer mit Direkt Blau 71 gefärbten Membran.....	68
<b>Abb. 22:</b> Immunoblot mit einem Antiphophotyrosin Antikörper.....	70
<b>Abb. 23:</b> Immunoblot mit einem Antiphophoserin Antikörper.....	71
<b>Abb. 24:</b> Immunoblot mit einem Antiphophothreonin Antikörper.....	72
<b>Abb. 25a+b:</b> Vorversuche zur Pharmakologie.....	74
<b>Abb. 26:</b> Sättigungskurve.....	75
<b>Abb. 27:</b> Zugehöriger Scatchard Plot.....	76
<b>Abb. 28:</b> Verdrängungskurve.....	78
<b>Abb. 29:</b> Schema typischer an den B <sub>2</sub> R gekoppelter Signaltransduktionspfade.....	80

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Beispiele für durch Kinine vermittelte Wirkungen in verschiedenen Organen.....	5
<b>Tab. 2:</b> Protokoll zum immuncytochemischen Nachweis von $\alpha$ smooth muscle isoactin.....	36
<b>Tab. 3:</b> Protokoll zur Adaption an serumfreie Kulturbedingungen.....	37
<b>Tab. 4:</b> Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.....	46
<b>Tab. 5:</b> Größe und Zusammensetzung der verwendeten MG Marker.....	47
<b>Tab. 6:</b> Verwendete Phosphoantikörper und eingesetzte Konzentrationen.....	50
<b>Tab. 7:</b> Protokoll zur Immunreaktion zum Nachweis von phosphorylierten Proteinen.....	51
<b>Tab. 8:</b> Verwendete Kininaseinhibitoren.....	54
<b>Tab. 9:</b> Konzentration der verwendeten Antagonisten und Agonisten.....	56

## 9 Literaturverzeichnis

Abe H, Ogata N (1982). Ionic mechanism for osmotically-induced depolarization in neurones of the guinea-pig supraoptic nucleus in vitro. *J Physiol* 327 :157- 171.

Abelous JE, Bardier E (1909). Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C R Soc Biol* 66:511.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH S 1001.

Anthony CT und Skinner MK (1989). Cytochemical and biochemical characterization of testicular peritubular myoid cells. *Biol Reprod* 40: 811-823.

Atanassova N (2003). B<sub>2</sub> bradykinin receptor mediates the stimulatory effect of bradykinin on rat germ cell proliferation in vitro. *Andrologia* 35: 13-16.

Barnes PJ (1992). Bradykinin and asthma. *Thorax* 47(11): 979-983.

Bascands JL, Pecher C, Girolami JP (1993). Indirect inhibition by bradykinin of cyclic AMP generation in isolated rat glomeruli and mesangial cells. *Mol Pharmacol* 44(4): 818-826.

Bathon JM, Manning DC, Goldman DW, Towns MC, Proud D (1992). Characterization of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor number by interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 384-392.

Belleannée C, Da Silva N, Shum WW, Marsolais M, Laprade R, Brown D, Breton S (2009). Segmental expression of the bradykinin type 2 receptor in rat efferent ducts and epididymis and its role in the regulation of aquaporin 9. *Biol Reprod* 80(1): 134-143.

Bhoola KD, Elson CJ, Dieppe PA (1992). Kinins--key mediators in inflammatory arthritis? *Br J Rheumatol* 31(8):509-518.

Biyashev D, Tan F, Chen Z, Zhang K, Deddish PA, Erdoes EG, and Hecquet C (2006). Kallikrein activates bradykinin B<sub>2</sub> receptors in absence of kininogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H1244–H1250.



- Blaukat A (2003). Structure and signaling pathways of kinin receptors. *Andrologia* 35: 17-23.
- Blaukat A, Abd Alla S, Lohse MJ, Müller-Esterl W (1996). Ligand-induced phosphorylation/ dephosphorylation of the endogenous bradykinin B<sub>2</sub> receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem* 271: 32366-32374.
- Blaukat A, Barac A, Cross MJ, Offermanns S, Dikic I (2000). G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of G $\alpha_q$  and G $\alpha_i$  signals. *Mol Cell Biol* 20: 6837-6848.
- Borkowski JA, Ramson RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD, and Hess JF (1995). Targeted disruption of a B<sub>2</sub> bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscles and neurons. *J Biol Chem* 270, 13706–13710.
- Boulanger C, Schini VB, Moncada S, Vanhoutte PM (1990). Stimulation of cyclic GMP production in cultured endothelial cells of the pig by bradykinin, adenosine diphosphate, calcium ionophore A23187 and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 101(1): 152-156.
- Buchinger P, Rehbock J (1999). The bradykinin B<sub>2</sub>-receptor in human decidua. *Semin Thromb Hemost* 25(6): 543-549.
- Castaño A, Herrera AJ, Cano J, Machado A (1998). Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem* 70(4): 1584-1592.
- Castro AF, Amorena C, Müller A, Ottaviano G, Tellez-Iñon MT, Taquini AC (1998). Extracellular ATP and bradykinin increase cGMP in vascular endothelial cells via activation of PKC. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): C113-119.
- Cayla C, Todiras M, Iliescu R, Saul VV, Gross V, Pilz B, Chai G, Merino VF, Presque-ro JB, Baltatu OC, and Bader M (2007). Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin induced hypotension. *Faseb J* 21, 1689–1698.

- Chao J, Hang Y, Gao L, Hagiwara M, Shen B, Yang ZR, and Chao L (2008). Tissue kallikrein elicits cardioprotection by direct kinin B<sub>2</sub> receptor activation independent of kinin formation. *Hypertension* 52, 715–720.
- Churchill L, Pongracic JA, Reynolds CJ, Naclerio RM, Proud D (1991). Pharmacology of nasal provocation with bradykinin: studies of tachyphylaxis, cyclooxygenase inhibition, alpha-adrenergic stimulation, and receptor subtype. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 95(4): 322-331.
- Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD (1973). Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 1;138(6): 1564-1583.
- Corthorn J, Rey S, Chacón C, Valdés G (2007). Spatio-temporal expression of MMP-2, MMP-9 and tissue kallikrein in uteroplacental units of the pregnant guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrinol* 5: 27.
- Coutant KD, Corvaia N, Ryder NS (1995). Bradykinin induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor-receptor and focal adhesion proteins in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3): 774-780.
- Cyr M, Eastlund T, Blais C Jr, Rouleau JL, Adam A (2001). Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. *Transfusion* 41(1): 136-50.
- Dietze GJ, Wicklmayr M, Rett K, Jacob S, Henriksen EJ (1996). Potential role of bradykinin in forearm muscle metabolism in humans. *Diabetes* 45 Suppl 1: S110-114.
- Dlamini Z, Raidoo D, Bhoola K (1999). Visualisation of tissue kallikrein and kinin receptors in oesophageal carcinoma. *Immunopharmacology* 43(2-3): 303-310.
- Doggrell SA (2005). Bradykinin B<sub>2</sub> receptors-a target in diabetic nephropathy. *Expert Opin Ther Targets* 9(2): 411-414.
- Emanuelli C, Maestri R, Corradi D, Marchione R, Minasi A, Tozzi MG, Salis MB, Straino S, Capogrossi MC, Olivetti G, Madeddu P (1999). Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation* 100(23): 2359-2365.
- Erdös EG, Schulz WW, Gafford JT, Defendini R (1985). Neutral metalloendopeptidase in human male genital tract. Comparison to angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest* 52(4): 437-447.

- Frenette G, Deperthes D, Tremblay RR, Lazure C, Dubé JY (1997). Purification of enzymatically active kallikrein hK2 from human seminal plasma. *Biochim Biophys Acta* 1334(1):109-115.
- Frey EK, Kraut H (1928). Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkungen. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 133: 1-56.
- Gessi S, Rizzi A, Calò G, Agnello G, Jorizzo G, Mollica G, Borea PA, Regoli D (1997). Human vascular kinin receptors of the B<sub>2</sub> type characterized by radioligand binding. *Br J Pharmacol* 122(7): 1450-1454.
- Girolami JP, Emond C, Bascands JL (1992). Signal transduction pathways of BK<sub>2</sub> receptor in the renal glomerulus and mesangial cells: a mini review. *Agents Actions Suppl* 38 ( Pt 2): 23-30.
- Glezermann M, Huleihel M, Lunenfeld E, Soffer Y, Potashnik G, Segal S (1993). Efficacy of kallikrein in the treatment of oligozoospermia and asthenozoospermia: a double-blind trial. *Fertil Steril* 60: 1052-1056.
- Gnessi, L., Fabbri, A. und Spera, G. (1997). Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment *Endocr Rev* 18, 541-609.
- Guimarães JA, Borges DR, Prado ES, Prado JL (1973). Kinin-converting aminopeptidase from human serum. *Biochem Pharmacol* 22(24): 3157-3172.
- Hamet P, Pang SC, Tremblay J (1989). Atrial natriuretic factor-induced egression of cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem* 264(21): 12364-12369.
- Harris GC, Nicholson HD (1998). Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin. *J Endocrinol* 157(2): 251-257.
- Hedin L, Rosberg S (1983). Forskolin effects on the cAMP system and steroidogenesis in the immature rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 33(1): 69-80.
- Hoeben E, Briers T, Vanderstichele H, De Smet W, Heyns W, Deboel L, Vanderhoydonck F, Verhoeven G (1995). Characterization of newly established testicular peritubular and prostatic stromal cell lines: potential use in the study of mesenchymal-epithelial interactions. *Endocrinology* 136(7): 2862-2873.

Holstein AF (2008). Männliche Geschlechtsorgane. In: Benninghoff Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1. 17. Auflage. (Hrsg.: Benninghoff, Drenckhahn). Elsevier Urban&Fischer Verlag. 799-836.

Hong HY, Yoo GS, Choi JK (2000). Direct Blue 71 staining of proteins bound to blotting membranes. *Electrophoresis* 21(5): 841-845.

Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC (2000). Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signaling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* 351(Pt 1): 257-264.

Keck C, Behre HM, Jockenhövel F, Nieschlag E (1994). Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 9: 325-329.

Kiehne K, Rozengurt (1994). Synergistic stimulation of DNA synthesis by bradykinin and vasopressin in Swiss 3T3 cells. *J Cell Physiol* 160: 502-510.

Köhn FM, Müller C, Drescher D, Neukamm C, El-Mulla KF, Henkel R, Hägele W, Hinsch E, Habenicht UF, Schill WB (1998). Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensins on human sperm functions. *Andrologia* 30: 207-215.

Kos P (2001). Diplomarbeit. Charakterisierung proteolytischer Aktivitäten von peritubulären Zellen des Rattentestis mittels HPLC Analyse am Beispiel des Bradykininabbaus. FB Biologie, Chemie und Geowissenschaften, JLU Giessen.

Krassnigg F, Niederhauser H, Fink E, Frick J, Schill WB (1989). Angiotensin converting enzyme in human seminal plasma is synthesized by the testis, epididymis and prostate. *Int J Androl* 12: 22-28.

Kraut H, Frey E, Werle E (1930). Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Zeylers Z Physiol Chem* 175: 97-114.

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage (1970). *Nature* 227: 680-685.

- Lambert TL, Kent RS, Whorton AR (1986). Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 15; 261(32): 15288-15293.
- Leitman DC, Andresen JW, Catalano RM, Waldman SA, Tuan JJ, Murad F (1988). Atrial natriuretic peptide binding, cross-linking, and stimulation of cyclic GMP accumulation and particulate guanylate cyclase activity in cultured cells. *J Biol Chem* 15; 263(8): 3720-3728.
- Liebmann C, Graness A, Ludwig B, Adomeit A, Boehmer A, Boehmer FD, Nürnberg B, Wetzker R (1996). Dual bradykinin B<sub>2</sub> receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. *Biochem J* 313 ( Pt 1): 109-118.
- Liebmann C, Mammery K, Graness A (1994). Bradykinin inhibits adenylate cyclase activity in guinea pig ileum membranes via a separate high-affinity bradykinin B<sub>2</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 288(1): 35-43.
- Liebmann C, Offermanns S, Spicher K, Hinsch KD, Schnittler M, Morgat JL, Reissmann S, Schultz G, Rosenthal W (1990). A high-affinity bradykinin receptor in membranes from rat myometrium is coupled to pertussis toxin-sensitive G-proteins of the Gi family. *Biochem Biophys Res Commun* 30; 167(3): 910-917.
- Liebmann C, Reissmann S (1990). Bradykinin inhibits rat myometrial adenylate cyclase activity via a high-affinity receptor. *Biomed Biochim Acta* 49(11): 1231-1234.
- Löbbecke EA (1972). Effect of kallikrein on the proliferation of various cell types. In: *Kininogenases. Kallikrein. Pt. 1.* (Hrsg.: Haberland GL, Rohen JW). Schattauer Verlag. 161-169.
- Loureiro-Silva MR, Molina HM, Borges DR.J (2001). Portal hypertensive response to bradykinin in inflamed or cirrhotic rat livers is mediated by B<sub>2</sub>-type receptors. *Gastroenterol Hepatol* 16(1): 41-45.
- Makhlouf GM. (1988). Ca<sup>2+</sup> release and contraction induced by IP<sub>3</sub> and contractile agonists in mammalian gastric smooth muscle. *Mol Cell Biochem* 82(1-2): 137-143.
- Marceau F, Tremblay B (1986). Mitogenic effect of bradykinin and of des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin on cultured fibroblasts. *Life Sci* 39, 2351-2358.

Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, Venema RC (1999). Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 343 Pt 2: 335-340.

McDonald RJ, Southard-Smith EM, Kroon E (1996). Disparate tissue-specific expression of members of the tissue kallikrein multigene family of the rat. *J Biol Chem* 271: 13684-13690.

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, McNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ramson RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF (1994). Expression cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269: 21583-21586.

Monsees TK (2003). Habilitationsschrift. Beiträge zur Bedeutung von Proteasen im männlichen Reproduktionstrakt am Beispiel des Gewebeskallikrein-Kinin-Systems. FB Humanmedizin, JLU Giessen.

Monsees TK, Blöcher S, Heidorn F, Winkler A, Siems WE, Müller-Esterl W, Hayatpour J, Miska W, Schill WB (2002). Expression and location of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor in rat testis. *Biol Reprod* 67:1832-1839.

Monsees TK, Blöcher S, Loddo C, Steger K, Schill WB (2003). Tissue kallikrein and bradykinin B<sub>2</sub> receptors in the reproductive tract of the male rat. *Andrologia* 35(1) :24-31.

Monsees TK, Görnig M, Schill WB, Miska W (1998). Possible involvement of proteases in the regulation of spermatogenesis. *Andrologia* 30: 185-191.

Monsees TK, Miska W, Blöcher S, Schill WB, Winkler A, Siems WE (1999). Elements of the kallikrein kinin system are present in rat seminiferous epithelium. *Immunopharmacology* 45: 107-114.

Monsees TK, Miska W, Schill WB (1996). Enzymatic digestion of bradykinin by rat Sertoli cell cultures. *J Androl* 17: 375-381.

Monsees TK, Schill WB, Butendeich S, Bloecher S (2012). Developmental-dependent expression of the tissue kallikrein-kinin system in the rat reproductive tract. 39<sup>th</sup> Annual conference of the Physiological Society of Southern Africa, Bellville, South Africa. *Scientific Research Essays*.

- Monsees TK, Schill WB, Miska W (1997). Protease-Protease inhibitor interactions in Sertoli cell-germ cell crosstalk. *Adv Exp Med* 424: 111-123.
- Moriwaki C, Kaneko S (1979). Some properties of acrosin, a kininogenase from sperm acrosome. *Adv Exp Med Biol* 120A: 351-361.
- Nakamura F, Minshall RD, Le Breton GC, Rabito SF (1996). Thromboxane A<sub>2</sub> mediates the stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate production and intracellular calcium mobilization by bradykinin in neonatal rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 28(3): 444-449.
- Ohkura R, Kimura A, Kihara T, Ogiwara K, and Takahashi T (2003). Expression of bradykinin B<sub>2</sub> receptors in the mouse ovary. *Zoological Sci* 20, 847–854.
- Olmos L, Mombouli JV, Illiano S, Vanhoutte PM (1995). cGMP mediates the desensitization to bradykinin in isolated canine coronary arteries. *Am J Physiol* 268(2 Pt 2): H865-870.
- Palombi F, Farini D, Salanova M, de Grossi S, Stefanini M (1992). Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. *Anat Rec* 233(1):32-40.
- Parsch EM, Schill WB (1988). Captopril-a new approach for treatment of male subfertility? *Andrologia* 20(6): 537-538.
- Peredo HA, and Celuch SM (2001). Bradykinin and electrical stimulation increase prostaglandin production in the rat vas deferens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 9–14.
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva ACM, Calixto JB, Lewin GR, and Bader M (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B<sub>1</sub> receptors. *PNAS* 97: 8140–8145.
- Phagoo SB, Reddi K, Anderson KD, Leeb-Lundberg LM, Warburton D (2001). Bradykinin B<sub>1</sub> receptor up-regulation by interleukin-1beta and B<sub>1</sub> agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 298(1): 77-85.

- Pierucci-Alves F, Schultz BD (2008). Bradykinin-stimulated cyclooxygenase activity stimulates vas deferens epithelial anion secretion in vitro in swine and humans. *Biol Reprod* 79(3): 501-509.
- Pisano JJ, Austen KF, eds. (1972) *Chemistry and biology of kallikrein: kininsystems in health and disease*. Washington: PHEW 174:176
- Pizard A, Blaukat A, Müller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM (1999). Bradykinin-induced internalization of the human B<sub>2</sub> receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem* 274(18): 12738-12747.
- Polosa R, Djukanovic R, Rajakulasingam K, Palermo F, Holgate ST (1993). Skin responses to bradykinin, kallidin, and [desArg<sup>9</sup>]-bradykinin in nonatopic and atopic volunteers. *J Allergy Clin Immunol* 92(5): 683-689.
- Rabito SF, Minshall RD, Nakamura F, Wang LX (1996). Bradykinin B<sub>2</sub> receptors on skeletal muscle are coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate formation. *Diabetes* 45 Suppl 1: 29-33.
- Regoli D, Barabé J (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Review* 32: 1-46.
- Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1;348(1):1-10.
- Rehm H. (2002). Ligandenbindung. In: *Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. 29-93.
- Roberts RA, Gullick WJ (1989). Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant ras oncogene. *J Cell Sci* 94: 527-535.
- Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*, 156(2): 261-273.
- Rohen JW, Buschhüter H (1975). Karyometric measurements on the Sertoli cell nuclei in kallikrein-treated albino rats. In: *Kininogenases. Kallikrein*. Pt. 2. (Eds: Haberland GL, Rohen JW, Schirren C, Huber P). Schattauer Verlag. 85-97



- Rohen JW, Peterhoff I (1972). Stimulation of mitotic activity by kallikrein in the gastrointestinal tract of rats. In: Kininogenases. Kallikrein. Pt. 1. (Eds: Haberland GL, Rohen JW). Schattauer Verlag. 147-157.
- Rohen JW, Stuttman R (1977). The early postnatal development of the germinative epithelium of the testis in the albino rat under the influence of kallikrein. In: Kininogen. Kallikrein. Pt. 4. (Eds: Haberland GL, Rohen JW, Suzuki T). Schattauer Verlag. 217-223.
- Saitoh S, Kumamoto Y, Shimamoto K, Iimura O (1987). Kallikrein in the male reproductive system. Arch Androl 19: 133-147.
- Saitoh S, Mikuma N, Kumamoto Y (1989). Effect of kallikrein on the Sertoli cell function. Urol Int 44: 87-89.
- Schack L, Rohen JW, Haberland GL (1980). Experimental studies on the influence of the kallikrein-kinin system on glucose utilization. Agents Actions 10(4): 344-348.
- Schill WB (1979). Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double-blind study. Arch Androl 2: 163-170.
- Schill WB, Haberland GL (1974). Kinin-induced enhancement of sperm motility. Hoppe Seyler's Z Physiol Chem 355: 229-231.
- Schill WB, Preissler G, Dittmann B, Müller WP (1979). Effect of pancreatic kallikrein, sperm acrosin and high molecular weight (HMW) kininogen on cervical mucus penetration ability of seminal plas-free human spermatozoa. In: Advances in experimental medicine and biology, Vol 120B; Kinins-II. Systemic proteases and cellular function. (Eds: Fujii S, Moriya H, Suzuki T). Plenum Press New York. 305-310.
- Schill WB, Rjosk HK (1979). Serum levels of LH, FSH, prolactin and testosterone in oligo- and asthenozoospermia men during kallikrein treatment. Acta Endocr Suppl 225: 96.
- Schill WB, Rjosk HK, Krizic A (1980). Andrologische, biochemische und endokrinologische Untersuchungen an subfertilen Männern während Kallikreinthherapie. Hautarzt 31: 191-197.
- Schilling L, Wahl M (1997). Brain edema: pathogenesis and therapy. Kidney Int Suppl 59: 69-75.

Sheikh IA, Kaplan AP (1986). Studies of the digestion of bradykinin, lysyl bradykinin, and kinin-degradation products by carboxypeptidases A, B, and N. *Biochem Pharmacol* 35(12): 1957-1963.

Sheng H, Ishii K, Förstermann U, Murad F (1995). Mechanism of bradykinin-induced cyclic GMP accumulation in bovine tracheal smooth muscle. *Lung* 173(6): 373-383.

Skinner MK, Moses HL (1989). Transforming growth factor beta gene expression and action in the seminiferous tubule: peritubular cell-Sertoli cell interactions. *Mol Endocrinol* 3, 625-634.

Skinner MK, McLachlan RI, Bremner WJ (1989). Stimulation of Sertoli cell inhibin secretion by the testicular paracrine factor PmodS. *Mol Cell Endocrinol* 66: 239-249.

Norton JN, Vigne JL, Skinner MK (1994). Regulation of Sertoli cell differentiation by the testicular paracrine factor PModS: analysis of common signal transduction pathways. *Endocrinology* 134(1): 149-157.

Stevens PA, Pyne S, Grady M, Pyne NJ (1994). Bradykinin-dependent activation of adenylate cyclase activity and cyclic AMP accumulation in tracheal smooth muscle occurs via protein kinase C-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 1;297 ( Pt 1): 233-239.

Sudo J, Tanabe T (1984). Distribution of aminopeptidases in various nephron segments isolated from rat kidney. *Chem Pharm Bull* 32(8): 3235-3243.

Takano M, Kondo J, Yayama K, Otani M, Sano K, Okamaoto H (1997). Molecular cloning of cDNA for mouse low-molecular-weight and high-molecular-weight prekini-nogens. *BBA* 1352: 222-230.

Takano M, Sakanaka F, Yayama K, Okamaoto H (2000). Tissue-specific expression of rat kininogen mRNAs. *Biol Pharm Bull* 23: 1239-1242.

Taketo M, Yokoyama S, Kimura Y, Higashida H (1997).  $Ca^{2+}$  release and  $Ca^{2+}$  influx in Chinese hamster ovary cells expressing the cloned mouse  $B_2$  bradykinin receptor: tyrosine kinase inhibitor-sensitive and- insensitive processes. *Biochim Biophys Acta* 1355(1): 89-98.

Tiffany CW, Burch RM (1989). Bradykinin stimulates tumour necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett* 247: 189-192.

Tippmer S, Bossenmaier B, Häring H (1996). Bradykinin induces tyrosine phosphorylation in human foreskin fibroblasts and 293 cells transfected with rat B<sub>2</sub> kinin receptor. *Eur J Biochem* 236(3): 953-959.

Tomita K, Pisano JJ, Burg MB, Knepper MA (1986). Effects of vasopressin and bradykinin on anion transport by the rat cortical collecting duct. Evidence for an electroneutral sodium chloride transport pathway. *J Clin Invest* 77(1):136-141.

Trifilieff A, Da Silva A, Gies JP (1993). Kinins and respiratory tract diseases. *Eur Respir J* 6(4): 576-587.

Tschesche H, Wittig B, Decker G, Müller-Esterl W, Fritz H (1982). A new acrosin inhibitor from boar spermatozoa. *Eur J Biochem* 126(1): 99-104.

Valdés G, Corthorn J, Scicli GA, Gaete V, Soto J, Ortiz ME, Foradori A, Saed G (1993). Uterine kallikrein in the early pregnant rat. *Biol Reprod* 49: 802-808.

Valdés G, Figueroa CD, Corthorn J (1996). Temporospatial changes of kallikrein-like enzymes during the estrous cycle and pregnancy in the rat uterus. *Biol Reprod* 55: 236-245.

Wachtfogel YT, DeLa Cadena RA, Colman RW (1993). Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res* 72(1): 1-21.

Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, Young AR (1996). Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 33(1-3): 257-263.

Walsh DA, Fan TPD (1997). Bradykinin as a growth factor. In: *The kinin system* (SG Farmer, Hrsg.), Academic Press. 301-314.

Weinbauer G, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E (2009). Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie-Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 3.Auflage (Hrsg.: Nieschlag E und Behre H) Springer Verlag. 15-56.

Wennemuth G, Aumüller G, Bacher M, Meinhardt A (2000). Macrophage migration inhibitor factor-induced  $\text{Ca}^{2+}$  response in rat testicular peritubular cells. *Biol Reprod* 62: 1632-1639.

Wennemuth G, Blöcher S, Schill WB, Aumüller G, Monsees TK (2003). Bradykinin increases intracellular calcium levels in rat peritubular cells via the  $\text{B}_2$  receptor subtype. *Brit J Pharmacol* 138: 351-358.

Werle, E. & Berek, U. (1948). Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angew. Chem.* 60A, 53.

Werle E, Götze W, Kappler A (1937). Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem Z* 289: 217 - 233.

Yamamoto M, Katsuno S, Hibi H, Miyake K (1996). The lack of effectiveness of kallikrein in the treatment of idiopathic oligozoospermia: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Jpn J Fertil Steril* 41: 1-6.

Yang CM, Chou SP, Wang YY, Hsieh JT, Ong R (1993). Muscarinic regulation of cytosolic free calcium in canine tracheal smooth muscle cells:  $\text{Ca}^{2+}$  requirement for phospholipase C activation. *Br J Pharmacol* 110(3): 1239-1247.

Yang CM, Luo SF, Hsia HC (1995). Pharmacological characterization of bradykinin receptors in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 114(1): 6.

## **10 Anhang**

### **10.1 Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation**

Teile der vorliegenden Dissertation wurden durch Posterpräsentationen oder Vorträge auf folgenden Kongressen vorgestellt:

**3rd European Congress of Andrology, Münster, 2004**

**38. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Zürich, 2005**

**4th Congress of the DFG-Graduate Seminar “Cell-Cell Interaction in Reproduction”, Giessen, 2005**

In den entsprechenden Kongressbänden wurden folgende Abstracts publiziert:

**Ihmels M., Schill W.B., Monsees T.K. 2004. Signal transduction of kinin receptors in rat testis peritubular cells. *Andrologia* 36(4) 250 Po 151**

**Ihmels M., Schill W.B., Monsees T.K. 2005. Pharmacology of kinin receptors in rat testis peritubular cells. *Sat asmv* 147(2) 47-87**

**Ihmels M., Schill W.B., Monsees T.K. 2005. Pharmacology and signaltransduction of kinin – receptors in peritubular cells of rat testis. *Andrologia* 37:146.**

## **10.2 Eidesstattliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Giessen, den 21.8.2012

Malte Ihmels

### 10.3 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Professor Dr. T.K. Monsees für die Überlassung des interessanten Themas und der trotz schwieriger Umstände guten Betreuung. Auch danke ich Professor Dr. Dr. W.B. Schill und Dr. W. Miska für die Bereitstellung des Labors und die Vielzahl konstruktiver Anregungen. Weiter möchte ich mich bei Frau G. Thiele bedanken, deren Unterstützung und Erfahrung, insbesondere bei der Zellkultur, die tägliche Arbeit ungemein erleichtert hat. Auch moralisch war sie mir jederzeit eine große Stütze.

Besonders möchte ich auch allen Beteiligten des DFG Graduiertenkollegs „Zell-Zell-Interaktionen im Reproduktionsgeschehen“ danken. Ohne die finanzielle Unterstützung durch die DFG, die vielfältigen Fortbildungsmöglichkeiten, den regelmäßigen konstruktiven Austausch und die vielen Gelegenheiten zur Präsentation meiner Ergebnisse wäre die vorliegende Dissertation in dieser Form nicht möglich gewesen.

Hervorheben möchte ich auch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. E. Hirsch sowie Herrn Prof. Dr. K.- D. Hirsch für die Hilfe bei der Etablierung der Westernblotuntersuchungen sowie die Erlaubnis zur Nutzung verschiedener Gerätschaften.

Ebenfalls sei der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. A. Meinhardt, vor allen Frau Dr. Ruth Müller, für die Unterstützung bei der Kultivierung der Peritubulärzellen herzlich gedankt.

Besonderen Dank schulde ich auch der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. B. Hoffmann für die Bereitstellung des  $\beta$ -Szintillationscounters und die Unterstützung bei dessen Nutzung insbesondere durch Herrn W. Damm.

Vielen Dank auch an meinen Bruder Jan für seine Hilfe bei der Übersetzung. Auch bedanke ich mich bei den fleißigen Helfern, die so nett waren, Korrektur zu lesen.

Last but not least danke ich meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich bedingungslos in allen Lebenslagen unterstützt haben.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6093-0

