

1. Einleitung

1.1. Das Kallikrein-Kinin-System

Kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen in der Morbiditätsstatistik fast aller Länder den ersten Rang ein (Holzner & Mathes, 1992), wobei die Herzinsuffizienz eines der größten Probleme im Gesundheitswesen der westlichen Länder ist. In 70% der Fälle ist heute zu Tage die ischämische Kardiomyopathie Ursache der chronischen Herzinsuffizienz (Tschöpe & Schultheiss, 2000). Auch die linksventrikuläre Hypertrophie als Ursache der Herzinsuffizienz, spielt eine große Rolle bei den kardiovaskulären Erkrankungen. Ebenso besitzen diabetische Patienten ein deutlich erhöhtes kardiales Risiko (Kannel *et al.*, 1974; Rytter *et al.*, 1985; Rösen *et al.*, 1992; Semenkovich & Heinecke, 1997). Bei der Herzinsuffizienz spielt die humorale Aktivierung eine entscheidende Rolle, bei der es zur Aktivierung zahlreicher Peptidsysteme kommt. Zu ihnen gehört auch das Kallikrein-Kinin-System (KKS), das verschiedenste physiologische und pathologische Funktionen des kardiovaskulären Systems beeinflussen kann (Kintsurashvili *et al.*, 2001).

1.1.1. Geschichte des Kallikrein-Kinin-Systems

Die Entdeckungsgeschichte des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS) beginnt 1909 mit den zwei Chirurgen Abelous und Bardier. Sie zeigten, dass eine aus menschlichem Urin isolierte Fraktion, intravenös appliziert, bei Hunden eine Senkung des Blutdruckes bewirkt (Abelous & Bardier, 1909). Eine vergleichbare Wirkung wurde 1920 von Pribam und Hernheiser bei Kaninchen beobachtet (Pribam & Hernheiser, 1920). Erst mit der Arbeit von Frey begann eine moderne Konzeption der Funktion und des Stoffwechsels von Kininen. Er isolierte 1926 eine instabile Substanz aus menschlichem Urin und bezeichnete diese wegen ihrer Wirkung auf die Blutgefäße als Kreislaufhormon (Frey, 1926; Frey & Kraut, 1928). In darauf folgenden Studien konnte die Substanz im Plasma, im Pankreas und den Speicheldrüsen nachgewiesen werden (Werle *et al.*, 1937; Frey *et al.*, 1950). Diese blutdrucksenkende Substanz wurde Kallikrein genannt, nach ihren Ursprungsort im Pankreas (Kallikreas griech. für Pankreas). Dann entdeckten Frey *et al.* 1932, dass Kallikrein bei oraler Gabe neben der blutdrucksenkenden Wirkung, auch eine Senkung der Glukosekonzentration im Blut bewirkt. Dieses geriet jedoch in Vergessenheit, da die Wirkung bei wiederholter Anwendung verblasste (Rett *et al.*, 1990). 1937 entdeckten Werle *et al.*, dass Kallikrein (KLK) aus der inaktiven Vorstufe, dem Kininogen, eine darmkontrahierende Substanz freisetzt, die eine Kontraktion der glatten Muskulatur bewirkt (Werle *et al.*, 1937; Werle & Grunz, 1939). Werle und Berek gaben 1948 dieser Substanz den Namen Kallidin (KL) und ihrer Vorstufe den Namen Kallidinogen. Etwa zur gleichen Zeit isolierte Rocha e Silva eine Substanz mit einer ähnlichen, aber langsameren Wirkung, die als ein Peptid identifiziert wurde. Das Peptid wurde als Bradykinin (BK) bezeichnet und führte zur Kontraktion von Meerschweinchen-Ileum (Rocha e Silva, 1949). Weitere Peptide mit einer

ähnlichen pharmakologischen Wirkung, wie das KL und das BK, wurden erstmals 1954 durch Jaque und Schachter entdeckt (Jaque & Schachter, 1954). Schachter und Thain bezeichneten diese nach weiteren Studien als Stoffklasse der Kinine (Schachter & Thain, 1954). Rigoli und Barabé beschrieben 1980 die physiologischen Wirkungen des BK und seines Analogons, des-Arg⁹-BK, in vielen verschiedenen Geweben. Sie postulierten, dass die physiologische Wirkung der Kinine über zwei unterscheidbare Plasmamembranrezeptoren vermittelt wird und nannten diese Bradykinin B₁-(B₁R) Rezeptor und Bradykinin B₂-(B₂R) Rezeptor (Rigoli & Barabé, 1980). Einige Jahre später kamen die ersten indirekten Beweise für den Einfluss der Kinine auf die Blutglukoseaufnahme im Skelettmuskel. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass unter Insulin-resistenten Bedingungen, wie Diabetes mellitus (DM) Typ II oder bei postoperativem Stress, die reduzierte muskuläre Insulinempfindlichkeit durch Kinine gesteigert und teilweise wieder hergestellt werden kann (Rett *et al.*, 1990). In diesem Jahrzehnt konnten zwei funktionell und morphologisch unterschiedliche KKS differenziert werden. Zum einen das plasmatische KKS, welches an der Gerinnungskaskade beteiligt ist und zum anderen das Gewebe-KKS, auch als renales KKS bezeichnet, welches unter anderem im Nervensystem, Endothel, Herzen und in der Niere zu finden ist (Bhoola *et al.*, 1992). Das komplexe Zusammenwirken der KKS mit anderen Systemen, wie dem Renin-Angiotensin-System (RAS) sind in der heutigen Zeit in vielen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen von großem Interesse (Tschöpe *et al.*, 2002).

1.1.2. Das Plasma- und das Gewebe-Kallikrein-Kinin-System

1.1.2.1. Das plasmatische Kallikrein-Kinin-System

Das plasmatische KKS ist an der Aktivierung der Koagulation, der Endzündung und am Kreislaufschock beteiligt (Damas, 1996). Auch bei Glukosestoffwechselstörungen, wie Diabetes mellitus Typ I und II spielt es eine Rolle. Bei diabetischen Patienten und Tiermodellen (induziert durch Alloxan oder Streptozotocin [STZ]) wurden erhöhte Kallikrein- und Kininogenspiegel im Plasma gefunden (Uehara *et al.*, 1988). Bei Diabetes mellitus ist das plasmatische KKS aktiviert (Tschöpe *et al.*, 1997a). Da im Plasma wesentlich geringere Kininkonzentrationen gefunden wurden als im Gewebe, geht man davon aus, dass Kinine auch über lokale para/autokrine Regulationsmechanismen wirken (Campbell, 1999).

1.1.2.2. Das Gewebe-Kallikrein-Kinin-System

Das Gewebe-KKS ist unter anderem an der Schmerz- und Entzündungsreaktion, sowie an den kardiovaskulären Regulationsmechanismen beteiligt. Beispielsweise ist es sowohl in die systemische Blutdruckregulation, als auch in die Perfusionsregulation der Niere und der Koronarien involviert. Dort können Kinine eine endothelabhängige Vasorelaxation oder direkte Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen auslösen (Campbell, 1999). Gewebe-KLK werden organspezifisch

exprimiert und unterscheiden sich in Substratspezifität und Kininogenaseaktivität (Carbini *et al.*, 1993; Carretero *et al.*, 1993; Scili *et al.*, 1993). Sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS), in der Niere, im Herzen und im Gefäßendothel konnten eigenständige Gewebe-KKS identifiziert werden (Tschöpe *et al.*, 1996).

1.1.2.3. Das endotheliale und das kardiale Kallikrein-Kinin-System

Die mRNA von Gewebe-KLK, ‚Angiotensin-Converting-Enzym‘ (ACE) und den Kininrezeptoren (B₁R, B₂R) konnte im Gefäßendothel nachgewiesen werden (Nolly *et al.*, 1985; Saed *et al.*, 1990). Vermutlich werden zirkulierende Kininogene an spezifischen endothelialen Kininogen-Bindungsstellen gebunden und zur Freisetzung der Kinine internalisiert. Stimuliert man isolierte Endothelzellen mit exogenem BK, kommt es zu komplexen intrazellulären Reaktionen. Diese führen zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freiem Kalzium. Dabei sind die vasodilatorischen Effekte des BK abhängig von der NO-Freisetzung und der darauf folgenden cGMP Erhöhung, vom Prostazyklin und vom ‚Endothelium-derived Hyperpolarized Factor‘ (EDHF) (Schini *et al.*, 1990; Wiemer *et al.*, 1991).

KLK wurde in den kardialen Vorhöfe und Ventrikeln nachgewiesen (Tschöpe *et al.*, 1999a). Auch Koronarien können KLK freisetzen (Britos & Nolly, 1981; Nolly *et al.*, 1985; Xiong *et al.*, 1990; Nolly *et al.*, 1994). Die Rolle des kardialen KKS wird schon lange diskutiert. In den 60er Jahren konnte gezeigt werden, dass lokal oder systemisch appliziertes Kinin zur Erhöhung des Koronarflusses und zur Verbesserung des myokardialen Metabolismusses führt (Lochner & Parrat, 1966; Lamonatgne *et al.*, 1992; Houel *et al.*, 1997). Somit scheint das KKS unter physiologischen Bedingungen an einer koronaren Vasomotorkontrolle beteiligt zu sein. In vielen Studien konnte die kardiale KLK-Aktivität und Expression anderer Mitglieder der KLK-Genfamilie bei Ratten nachgewiesen werden. Tschöpe *et al.* (1997b) wies die mRNA für den B₂-Rezeptor in Herzhomogenaten von normotensiven Ratten nach. Ebenfalls wurden dort Kallikrein 1 und 7 detektiert (Tschöpe *et al.*, 1997b). Auch bei neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten konnten BK-Bindungsstellen nachgewiesen werden (Nolly *et al.*, 1994).

1.1.3. Bestandteile und Organisation des Kallikrein-Kinin-Systems

Zu den Komponenten des KKS gehören die Kininogene, Kininogenasen, Kinine, Kininasen und die Bradykinin-Rezeptoren, wobei die B₁- und B₂-Rezeptoren, die am besten untersuchtesten sind. Die schematische Darstellung in Abb. 1.1 zeigt den Aufbau und das Zusammenspiel der Komponenten des KKS.

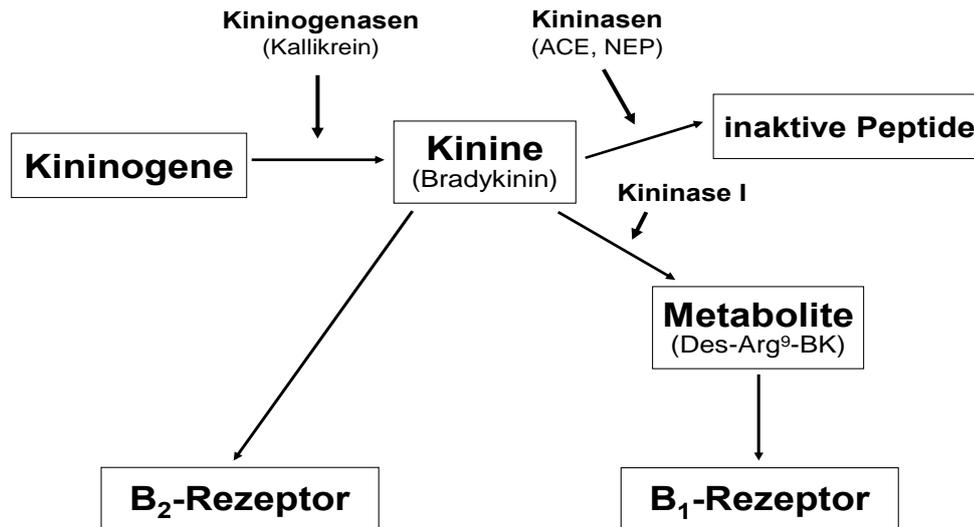


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Kallikrein-Kinin-Systems.

Die Kininogene

Kininogene sind Vorläuferpeptide, welche durch Kininogenasen zu Kininen gespalten werden. Sie werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert, konnten aber auch in der Niere (Figuroa *et al.*, 1988; Iwai *et al.*, 1988), sowie in den Endothelzellen (Schmaier *et al.*, 1988; van Iwaarden *et al.*, 1988) des Menschen gefunden werden. Bei Ratten fand man sie auch noch in den Blutplättchen (Schmaier *et al.*, 1986) und in den Speichelzellen (Chao *et al.*, 1988; Bhoola *et al.*, 1992). In Säugetieren konnten zwei verschiedene Kininogene, die sich in Größe, Struktur und Funktion unterscheiden, identifiziert werden. Das ‚High-molecular-weight‘-Kininogen (HMWK) weist je nach Ursprung ein Molekulargewicht zwischen 88.000 bis 114.000 Da auf. Es zirkuliert im Plasma als Komplex mit dem Prokallikrein und/oder dem Faktor XI und ist in die intrinsische Blutgerinnungskaskade involviert. Beim ‚Low-molecular-weight‘-Kininogen (LMWK) bewegt sich das Molekulargewicht zwischen 50.000 und 68.000 Da. Kininogene (HMWK und LMWK), die durch KLK gespalten werden, bezeichnet man als Kallikrein-sensitive Kininogene (K-Kininogen) (Müller-Esterl *et al.*, 1986 & 1989). Bei der Ratte konnten LMWK nachgewiesen werden, die nicht durch KLK sondern durch Trypsin oder Cathepsin D gespalten werden. Man bezeichnet diese LMWK auch als Trypsin-sensitive Kininogene (T-Kininogen). Das T-Kininogen gilt als Hauptvertreter der ‚Acute-Phase‘-Proteine und steigt bei der Entzündungsreaktion sprunghaft an (Müller-Esterl *et al.*, 1986 & 1989). Es gibt zwei Isoformen des T-Kininogens, das T-Kininogen I und II. Im Plasma konnten höhere T-Kininogen I-, als T-Kininogen II-Konzentrationen nachgewiesen werden (Bhoola *et al.*, 1992).

Die Kininogenasen

Kininogenasen gehören zur Gruppe der Kinin-bildenden Enzyme und werden im Allgemeinen als Kallikrein (KLK) bezeichnet. Die KLK unterteilen sich in zwei Gruppen, die sich in Ursprung, Molekulargewicht, biochemischen Eigenschaften und biochemischer Wirkung unterscheiden. Diese Gruppen werden als Plasma- und

Gewebe-KLK bezeichnet (Schachter, 1980). Das Gewebe-KLK gehört zu einer Multigenfamilie, deren Mitglieder organspezifisch exprimiert werden und unterschiedliche Substratspezifität und Kininogenaseaktivität besitzen (Carbini *et al.*, 1993; Carretero *et al.*, 1993; Scili *et al.*, 1993). Die Vorstufe des Gewebe-KLK ist das Präkallikrein (Prä-KLK) und die des Plasma-KLK das Prokallikrein (Pro-KLK).

Die Kinine

Kinine sind vasoaktive Oligopeptide, die aus den Kininogenen (Müller-Esterl *et al.*, 1989), durch die Kininogenasen, wie dem KLK (Seichi *et al.*, 1993), freigesetzt werden. Ein Vertreter der Kinine ist das Bradykinin (BK). Das BK hat eine Aminosäuresequenz, deren neun Aminosäuren für fast alle Kinine charakteristisch sind. Das Lys-BK, auch Kallidin (KL) genannt, ist z.B. nur am aminoterminalen Ende verlängert. Die Kinin-abbauende Kininase I, spaltet vom BK und KL den C-terminalen Arg⁹-Rest ab, wodurch desArg⁹-BK und desArg⁹-Lys-BK entstehen. Das BK wird im humanen Plasma aus dem HMWK freigesetzt, während das KL aus dem Gewebe-KLK (HMWK und LMWK) freigesetzt wird (Margolius, 1989). Damit der Organismus vor einem Überschuss an Kininen geschützt ist, werden diese *in vivo* durch Kininasen deaktiviert, womit ihre Halbwertszeit auf ca. 15 s beschränkt ist (Menke *et al.*, 1991; Pesquero *et al.*, 1996). Eine sehr wichtige Rolle spielen die Kinine bei der Regulation der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des kardiovaskulären Systems. Sie vermitteln ihre Wirkung über die Stimulation ihrer spezifischen Bradykininrezeptoren (BKR) (McLean *et al.*, 2000).

Zu den zahlreichen Kinin-Effekten zählen, die Wirkung auf die lokale Durchblutung und den Blutdruck, sowie auf den Glukosetransport und den Elektrolythaushalt der Zelle. Kinine spielen eine Schlüsselrolle bei der Inflammation. Injiziert man sie subkutan, rufen sie alle Zeichen einer Entzündung hervor. Ihre Wirkung entfalten sie dabei unter anderem durch die Freisetzung von Zytokinen wie IL1 β , IL-2 und dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α), sowie durch die Freisetzung Mediatoren wie Prostaglandin und Leukotrien (Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1997; Prado *et al.*, 2002). Sie fördern auch die Freisetzung von Substanz P und dem plättchenaktivierenden Faktor (Vanhoutte, 1989; Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1997; Kintsurashvili *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2002). Durch die Stimulation afferenter Nerven besitzen sie eine hohe schmerzhervorrufende Potenz. Des Weiteren sind sie an der renalen Reninsekretion, sowie an der Freisetzung von Katecholaminen und Vasopressin beteiligt. Kinine besitzen eine vasodilatatorische Wirkung und einen permeabilitätssteigernden Effekt auf die Gefäße (Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1997; Prado *et al.*, 2002). *In vitro* konnte eine Kontraktion der glatten Muskulatur des Darms und des Uterus durch Kinine gezeigt werden. Bei den meisten Säugetieren, einschließlich beim Menschen, reagiert *in vitro* auch die glatte Muskulatur der Atemwege. Während eine geringe Konzentrationen eine relaxierende Wirkung hat, bewirken höhere Konzentrationen eine Kontraktion. Die Wirkung der Kinine auf das Endothel und die glatte Muskulatur von Gefäßen hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen die Anwesenheit von Mediatoren wie Prostaglandin E₂, die Aktivität und Art der lokalen Kininasen, sowie der Typ des entsprechenden BK-Rezeptors.

Ein hypoglykämischer Effekt der Kinine wurde bereits 1932 durch Frey *et al.* bemerkt. Später konnte gezeigt werden, dass Kinine die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur steigern und auch den Glukosemetabolismus erhöhen (Rett *et al.*, 1990).

Die Kininasen

Kininasen gehören zu einer Gruppe von Enzymen die Kinine hydrolysieren. Zu den Kininasen, die beim kardialen KKS eine wichtige Rolle spielen, gehören die Kininase I, die Neutrale Endopeptidase 24.11 (NEP) und die Kininase II, die auch als ACE bezeichnet wird (Menke *et al.*, 1991; Pesquero *et al.*, 1996). Die Carboxypeptidasen, die das C-terminale Arginin (Arg) abspalten, werden unter der Bezeichnung Kininase I-Enzyme zusammengefasst. Hierzu zählen im Plasma die Carboxypeptidase N (CPN) und die Zellmembrangebundene Carboxypeptidase M (CPM). Die Kininase II-Peptidasen, ACE und NEP, setzen das C-terminale Peptid Phe-Arg frei. Weitere Kinin-hydrolysierende Enzyme sind Kininase A und B, sowie die Aminopeptidase P (Prolidase) (Erdös, 1990, Bhoola *et al.*, 1992).

Die Bradykinin-Rezeptoren

Die Bradykinin-Rezeptoren (BKR) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (siehe auch 1.4.) und werden durch Kinine aktiviert (siehe auch 1.2.). Sie vermitteln die Wirkung der Kinine über die Freisetzung von Mediatoren wie Prostaglandin, Stickstoffoxid (NO) und Ca^{2+} (Vanhoutte, 1989; Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1997; Kintsurashvili *et al.*, 2001; Prado *et al.*, 2002). Genauer wird auf die beiden Rezeptoren unter dem Punkt 1.2. eingegangen.

1.2. Die Bradykinin-Rezeptoren

Seit 1980 werden bei Säugetieren zwei Rezeptoren postuliert, über die Kinine ihre Wirkung ausüben. Sie wurden als Bradykinin B_1 -Rezeptor (B_1R) und als Bradykinin B_2 -Rezeptor (B_2R) bezeichnet. Bei Vögeln konnte ein weiterer Bradykinin-Rezeptor, der Bradykinin B_3 -Rezeptor, nachgewiesen werden (Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1997). Zur Differenzierung der Rezeptoren wurden unter anderem ihre unterschiedlichen Bindungseigenschaften für Kinine und synthetisch hergestellte Substanzen herangezogen. Sie unterscheiden sich durch verschiedene Agonisten, die an den Rezeptoren binden können. BK und KL besitzen eine hohe Affinität zum B_2R und gelten als dessen natürliche Agonisten (Hess *et al.*, 1992; Pesquero *et al.*, 1996a). Die Metaboliten des Arg^9 -BK und des Arg^9 -KL hingegen, sind natürliche Agonisten des B_1R und weisen nur eine geringe Affinität zum B_2R auf (Menke *et al.*, 1991; Pesquero *et al.*, 1996; Marceau *et al.*, 1998).

Der B_2R wurde basal ubiquitär in vielen Geweben und Zellarten nachgewiesen. Die im Allgemeinen bekannten Kininwirkungen werden zum großen Teil über den B_2R vermittelt (Bhoola *et al.*, 1992). Beim akuten Entzündungsgeschehen spielt der B_2R eine größere Rolle als der B_1R (Hall, 1997; McLean *et al.*, 2000). Der B_1R hingegen wird unter physiologischen Bedingungen normalerweise nicht exprimiert. Er wird *de*

novo unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. Sepsis, Inflammation, oxidativem Stress, Gewebeverletzung und Gewebereparatur unter Beteiligung des KKS gebildet (Marceau *et al.*, 1998; Kintsurashvili *et al.*, 2001). Er ist im Gegensatz zum B₂R, mehr am chronischen Entzündungsgeschehen beteiligt (Hall, 1997; McLean *et al.*, 2000).

Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptoren (siehe 1.4.) (Marceau *et al.*, 1998). Die BKR-Gene des Menschen sind beide auf dem Chromosom 14 zu finden (siehe 1.3.), unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer genomischen Sequenz und Organisation (Bachvarow *et al.*, 1996, 1998b; Chai *et al.*, 1996; Yang & Polgar, 1996). Untersuchungen zu Polymorphismen der BKR-Gene zeigten den Austausch einzelner Basen in der Promotorregion, in den Regionen der Exons und in der 3'-untranslatierten Region. Die verschiedenen Allele treten speziell bei bestimmten ethnischen Gruppen häufiger auf (Braun *et al.*, 1995; Lung *et al.*, 1997; Gainer *et al.*, 2000; Mukae *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) und könnten zum Beispiel mit dem Risiko der primären Hypertonie verbunden werden (Gainer *et al.*, 2000; Mukae *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Andere Allele scheinen wiederum eine protektive Rolle beim Nierenversagen und bei entzündlichen Darmkrankheiten zu spielen (Bachvarow *et al.*, 1998a, 1998b; Zychma *et al.*, 1999).

1.2.1. Der Bradykinin B₁-Rezeptor

Der B₁R ist induzierbar (Marceau *et al.*, 1998) und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptoren (Austin *et al.*, 1997; Pizard *et al.*, 1998; Faussner *et al.*, 1999). Gewöhnlich ist der B₁R in frischen Präparaten glatter Gefäßmuskulaturen nicht nachweisbar. *In situ* konnte jedoch die Expression des B₁R in manchen Zellkulturen nachgewiesen werden (Ni *et al.*, 1998). Bei der Inflammation wird der Rezeptor durch Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL1 β , IL-2, IL-8, sowie durch Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien deutlich hochreguliert (Ni *et al.*, 1998). Dies kann aber auch durch die ‚Mitogen-activated Protein‘ (MAP)-Kinase vermittelt werden (Larivée *et al.*, 1998). Hierbei steigt die Anzahl an B₁R proportional zur spezifischen Bindung des desArg⁹BK an den Rezeptor (Marceau *et al.*, 1998).

Kinine, denen am C-terminalen Ende der Arg-Rest abgespalten wurde, werden mit hoher Affinität vom B₁R gebunden, der dann ihre Wirkung vermittelt (Marceau *et al.*, 1998). Die B₁R von Rhesusaffen und afrikanischen grünen Meerkatzen zeigten eine ebenso hohe Selektivität für des-Arg¹⁰-Kallidin und des-Arg⁹-BK, wie für den humanen Rezeptor beschrieben (Hess *et al.*, 2002). Obwohl die Effekte der B₁R-Stimulation unter entzündlichen Bedingungen, oft denen der B₂R-Stimulation qualitativ sehr ähnlich sind, findet man bei der B₁R-Signalerkennung ein gegensätzliches Verhalten (Faussner *et al.*, 1999). Der B₁R wird *de novo* synthetisiert und nicht internalisiert. Er zeigt fast keine Desensitisation und eine nur sehr langsame Ligandenlösung (Marceau *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2000) (Abb. 1.2).

1.2.2. Der Bradykinin B₂-Rezeptor

Zahlreiche Studien zeigten, dass der B₂R nach der Interaktion mit BK an G-Proteine gekoppelt ist und seine Wirkung über die Signaltransduktion (1.4.) ausübt (Kyle *et al.*, 1992). Die funktionelle Antwort des B₂R unterscheidet sich deutlich von der des B₁R. Während der B₁R *de novo* synthetisiert wird, wurde gezeigt, dass der B₂R ein ‚Recycling-Rezeptor‘ ist (Faussner *et al.*, 1998). Die Kinine BK und KL haben eine hohe Affinität zum B₂R. Im Gegensatz dazu weisen desArg-Kinine, nur eine geringe Affinität zum B₂R auf (Marceau *et al.*, 1998). Studien mit 3T3-Fibroblasten zeigten, dass die Kininwirkung nicht nur über die Rezeptoranzahl reguliert wird, sondern auch auf der Signaltransduktionsebene. Die Behandlung mit Interleukin 1 β (IL1 β) steigerte die Fähigkeit des BK, die Eicosanoid-Synthese zu induzieren, ohne Anzahl und Affinität der BKR zu erhöhen (Burch *et al.*, 1988). Obwohl p53 bei chronischer Ischämie und Zellschädigung induziert und aktiviert wird (Arai *et al.*, 1999), wurde auch eine Beteiligung an der Regulation der B₂R-Genexpression bei der Entwicklung der Niere gezeigt. Die biologische Rolle ist noch nicht klar (El-Dahr *et al.*, 2000).

Die Anregung des B₂R führt zu einem kurzen, starken Signal, welches mit schnellem Verlust der Funktionsantwort, Empfängerinternalisation, Sequestration sowie mit einer Ligandentrennung verbunden ist. Bei einer langfristigen Stimulation des Rezeptors wird die mRNA- und Proteinexpression des B₂R runterreguliert (Abb. 1.2) (Pradaude *et al.*, 1995; Blaukat *et al.*, 1996; Faussner *et al.*, 1999, Zhou *et al.*, 2000).

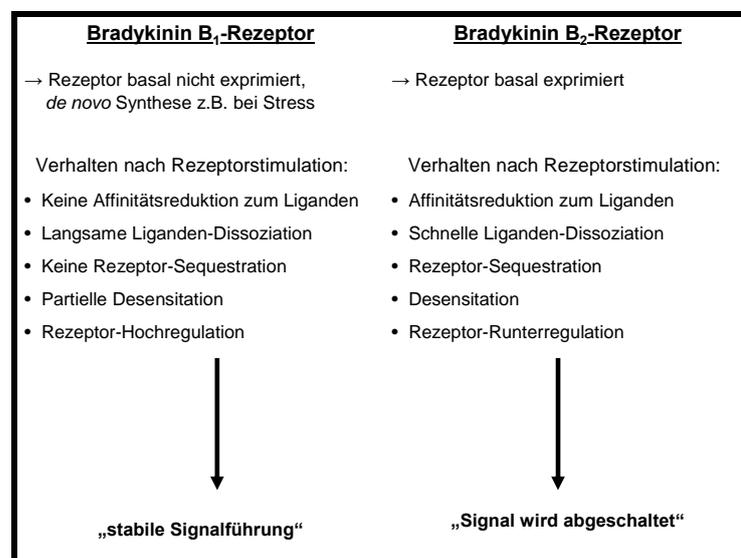


Abb. 1.2 Zusammenfassung der wichtigsten Unterschiede der Bradykinin Rezeptoren.

1.3. Genomische Organisation, Struktur und Expression des Bradykinin B₁- und B₂-Rezeptors

1.3.1. Lokalisation auf dem Genom

Die Gene, welche die beiden Bradykininrezeptoren kodieren, sind bei Mensch, Maus und Ratte eng auf demselben Chromosom lokalisiert. Beim Menschen

konnten die beiden Gene in Tandem-Orientierung auf Chromosom 14 in der Region 14q32.1-q32.2 identifiziert werden, wobei das B₁R-Gen dem B₂R-Gen folgt (Ma *et al.*, 1994; Kammerer *et al.*, 1995; Chai *et al.*, 1996; Cayla *et al.*, 2002). Beide Gene werden nur durch 12 kb auf dem Chromosom getrennt (Cayla *et al.*, 2002). In der Maus wurden beide Rezeptoren, ebenfalls in Tandem-Orientierung, auf dem distalen Arm des Chromosoms 12 identifiziert (Taketo *et al.*, 1995). Hier betrug der chromosomale Abstand nur 7,8 kb (Cayla *et al.*, 2002). Die Lage der Rezeptoren auf der Rattensequenz wurde auf Chromosom 6 in der Region q3.2 definiert (Gösele *et al.*, 2000). Bei dieser Spezies werden die beiden Gene durch 9,5 kb getrennt. Auch hier findet man die Gene in Tandem-Orientierung (Cayla *et al.*, 2002) (Abb.1.3).

Für die humanen BKR konnte nachgewiesen werden, dass sie als ‚single copy‘-Gen kodiert werden (Ma *et al.*, 1994; Chai *et al.*, 1996; Bachvarow *et al.*, 1996).

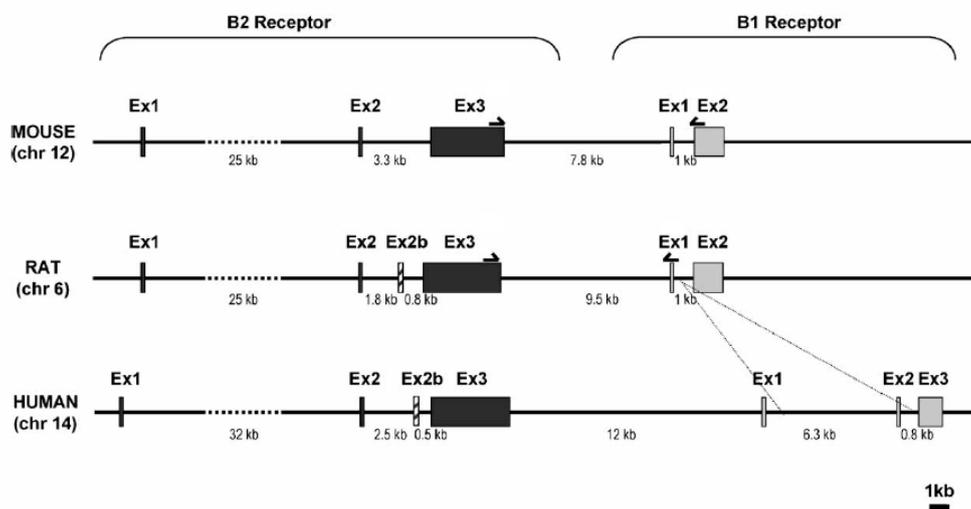


Abb. 1.3 Organisation der Bradykinin B₁- und B₂-Rezeptorgene der Maus auf Chromosom 12, der Ratte auf Chromosom 6 und des Menschen auf Chromosom 14. Exon 3 und Exon 4 wurden umbenannt in Exon 2b bzw. 3 (aus Cayla *et al.*, 2002). Die ausgefüllten Rechtecke stellen die Exons dar und die dünne Linie die Introns bzw. die 5'- und 3'-flankierende Region. Die schraffierten Rechtecke zeigen die alternativ gepleißten Exons. Die Segmente, bis auf Exon 1 des B₂R, sind skaliert.

1.3.2. Die Exon-Intron-Struktur

Menke *et al.* (1994) isolierten einen humanen Klon des B₁R-Gens, der aus 1307 Nukleotiden mit einem offenen Leserahmen besteht und 353 Aminosäuren (AS) kodiert (Menke *et al.*, 1994). Das humane B₁R-Gen enthält drei Exons. Das erste und das zweite Exon sind nicht kodierend. Jedoch findet sich auf dem dritten Exon die gesamte kodierende Region und das 3'-untranslatierte Ende (Bachvarow *et al.*, 1996; Chai *et al.*, 1996; Yang & Polgar, 1996). Im Gegensatz zum humanen B₁R-Gen, findet man im Nagetiergen nur zwei Exons. Pesquero *et al.* (1996a) klonen ein mutmaßliches B₁R-Gen der Maus. In den Klonen, konnten ein 334 AS kodierender offener Leserahmen, der durch Introns unterbrochen wird, definiert

werden (Pesquero *et al.*, 1996a). Das B₁R-Gen der Ratte enthält ebenfalls zwei Exons, wobei auf dem zweiten Exon die gesamte kodierende Region zu finden ist (Ni *et al.*, 1998). Bei Nagetieren werden Exon 1 und Exon 2 durch ein 1 kb-Intron getrennt. Beim Mensch werden Exon 1 und 2 durch 6,3 kb und Exon 2 und 3 durch 0,8 kb unterbrochen (Abb.1.3). Das zusätzliche Exon 2 beim Menschen könnte durch Integration von *Alu-J*-Elementen, die nur beim Mensch und bei Primaten zu finden sind, entstanden sein (Cayla *et al.*, 2002).

Zunächst zeigten Park *et al.* (1994) und Ma *et al.* (1994a), dass der humane B₂R aus drei Exons zusammengesetzt ist (Park *et al.*,; Ma *et al.*, 1994a), wobei sich die kodierende Region auf Exon 2 und Exon 3 befindet (Kammerer *et al.*, 1995). Park *et al.* zeigten dies auch für die Ratte. Er postulierte für beide Spezies zwei 5'-Exons vor dem Translationsinitiations-Methionin in Exon 3 (Park *et al.*, 1994). Auch Wang *et al.* (1994) bestätigten dies für die Ratte (Wang *et al.*, 1994). Das Rattengen kodiert ein Protein mit 366 AS (Wang *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994b). Pesquero *et al.* (1994) hingegen definierten vier Exons für das Rattengen, bei der die 5'-untranslatierte Region über alle vier Exons verteilt ist und die 3'-untranslatierte Region sowie der kodierende Bereich komplett auf dem vierten Exon lokalisiert sind. In den untersuchten Geweben konnten zwei verschiedene mRNA des B₂R, mit und ohne Exon 3, nachgewiesen werden, was auf die Möglichkeit des alternativen Spleißens der 5'-untranslatierten Sequenz hindeutete (Pesquero *et al.*, 1994). Später überarbeitete dann Cayla *et al.* (2002) die Originalnomenklatur, um mehr Homogenität zwischen den Spezies zu generieren. Bei dieser Überarbeitung wurden Exon 3 und 4 in Exon 2b bzw. 3 umbenannt. Die intronische Sequenz zwischen Exon 1 und 2 ist bei der Maus und bei der Ratte 25 kb lang und beim Menschen 32 kb. Das zweite Intron bei der Maus umspannt 3,3 kb, bei der Ratte 2,8 kb und beim Menschen 2,5 kb. Die Sequenzen der Introns zwischen Exon 2b und Exon 3 ist bei der Ratte 0,8 kb lang und beim Menschen 0,5 kb (Abb.1.3) (Cayla *et al.*, 2002).

1.3.3. Expression der Bradykinin-Rezeptoren in verschiedenen Spezies und Geweben

Die beiden Rezeptoren, der B₁R und der B₂R, wurden bei verschiedenen Spezies nachgewiesen und geklont. Hierzu zählen der Mensch (Menke *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1994), die Maus (Pesquero *et al.*, 1996), die Ratte (Ni *et al.*, 1998), das Kaninchen (MacNeil *et al.*, 1995), der Hund (Hess *et al.*, 2001), und das Meerschweinchen (Farmer *et al.*, 1998; Bhoola *et al.*, 1992).

Die Verteilung des B₁R in verschiedenen Geweben wurde bei vielen Spezies unter pathophysiologischen Bedingungen aufgezeigt (Chai *et al.*, 1996; Marin-Castano *et al.*, 1998; Marceau *et al.*, 1998). Bei Menschen konnte der B₁R in der Niere und Bauchspeicheldrüse identifiziert werden (Chai *et al.*, 1996). Ferner wurde er in der Niere, der Leber, der Lunge und im Herzen der Ratte nachgewiesen (Pesquero *et al.*, 1996; Marin-Castano *et al.*, 1998; Schanstra *et al.*, 1999). Auch in verschiedenen Arterien und Venen diverser Spezies konnte der B₁R identifiziert

werden, gleichermaßen im kardialen Gewebe und zentralen Nervensystem (Raidoo *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2000).

Die Expression des B₂R wurde bei vielen Spezies in verschiedenen Geweben detektiert (Regoli *et al.*, 1980; Ma *et al.*, 1994; Pesquero & Bader, 1998; Marceau *et al.*, 1998). Dieser konnte, wie der B₁R, im kardialen Gewebe und im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Raidoo *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte in endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen von Arteriolen aus verschiedenen Arten, eine Expression des B₂R gezeigt werden (Raidoo *et al.*, 1997).

1.3.4. Die Promotorregion und die Regulationsmechanismen

Die B₁R-Genexpression ist stark reguliert und ein hervorragendes Model zum Studieren induzierbarer Gene. Für den humanen B₁R konnten zwei verschiedene Promotoren identifiziert werden (Bachvarow *et al.*, 1996; Chai *et al.*, 1996; Yang & Polgar, 1996). Andere Studien kartierten ein positiv regulierendes Element (PRE) mit einem klassischen, zellspezifischen, starken Enhancer und ein negativ regulierendes Element, das die Funktion des Enhancer verringert. Ferner wurden zahlreiche Transkriptionsfaktor (TF)-Bindungsstellen, eine TATA-Box und eine Transkriptionsinitiationsstelle kartiert (Bachvarow *et al.*, 1996; Yang & Polgar, 1996). Ebenso wurden bei der Ratte diverse Transkriptionselemente identifiziert (Angers *et al.*, 2000; Ni *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994). Ferner könnten andere Motive, wie *c-jun* und p53, an der Regulation der Expression beteiligt sein (Yang *et al.*, 2001). Die posttranskriptionale mRNA-Stabilisierung könnte auch, bei der Regulation der B₁R-Genexpression eine Rolle spielen (Zhou *et al.*, 1998). Des Weiteren erhöhte die Behandlung mit Proteinsyntheseinhibitoren sehr stark die Stabilität der mRNA und die zelluläre Wirkung (deBlois *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1998). Verschiedene isolierte mRNA-Transkripte des B₁R-Gen der Ratte deuten auf alternatives Spleißen der RNA (Ni *et al.*, 1998).

Die Regulation der Genexpression und die damit verbundenen TF, sind für den B₂R weitgehend unbekannt. Für das humane B₂R-Gen konnte eine Consensus-TATA-Box und verschiedene mögliche TF-Bindungsstellen in der 5'-flankierenden Region erkannt werden (Ma *et al.*, 1994). Bei der Ratte und der Maus wurden jedoch keine typische TATA- oder CCAAT-Box vor dem Transkriptionsstart gefunden (Ma *et al.*, 1994; Kammerer *et al.*, 1995). Trotzdem wurde der B₂R, als Konstrukt mit der 5'-flankierenden Region und einem Markergen, in NG108-15-Zellen exprimiert. Auch potentielle TF, wie cAMP-,response'-Element-Bindungsprotein, AP-1, NF-B, SP-1 und Egr-1 konnten identifiziert werden (Pesquero *et al.*, 1994, 1996). Eine Studie wies zwei p53-,like'-Bindungsstellen in der 5'-flankierenden Region nach. Die AP-1-,site' ist im humanen und murinen Gen konserviert, während die P2-,site' nicht in allen Spezies zu finden ist (Saifudeen *et al.*, 2000).

1.3.5. Die Proteinstruktur des B₁- und B₂-Rezeptors

Die B₁R und B₂R durchdringen die Membran mit sieben hydrophoben transmembranen Domänen (Abb. 1.4) und gehören damit zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPgR) (siehe 1.4.). Beide Rezeptoren besitzen eine 36%tige Homologie hauptsächlich in der transmembranen Region (Hall, 1997; Leeb-Lundberg *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 1994; Marceau *et al.*, 1998; Menke *et al.*, 1994; Schanstra *et al.*, 1999). Die intrazellulären Domänen weisen nur eine geringe Homologie auf, obwohl beide Rezeptoren überwiegend am selben G-Protein binden.

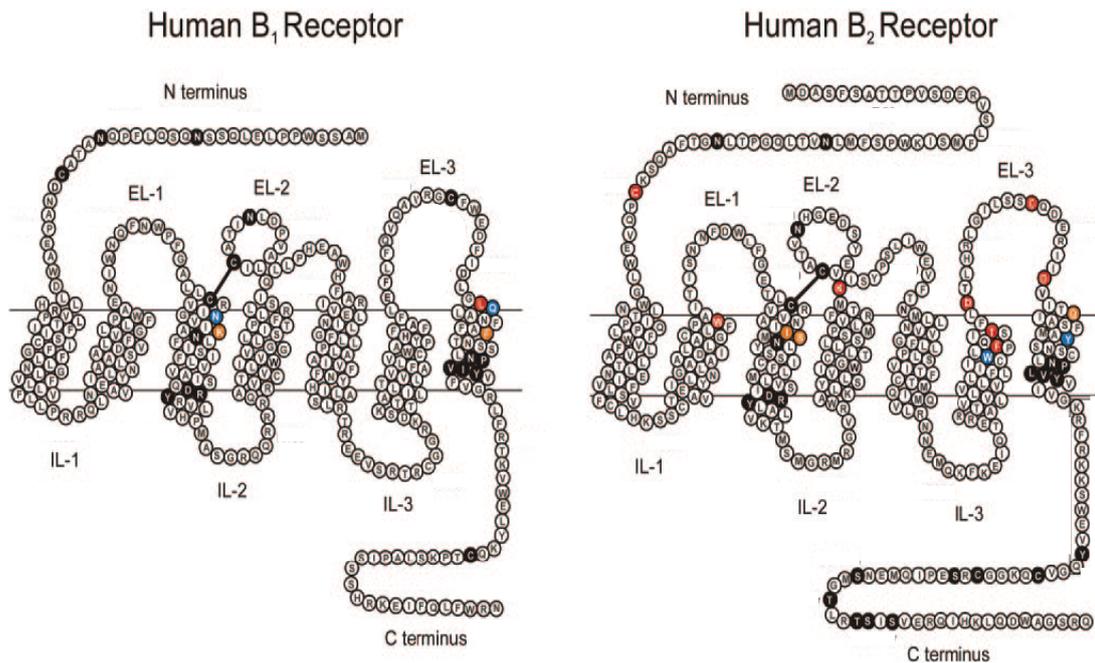


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der transmembranen Regionen, der Schleifen und des C- und N-Terminus des humanen B₁- und B₂-Rezeptors (aus Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). IL – intrazelluläre Domäne; EL – extrazelluläre Domäne.

Menke *et al.* (1994) isolierten einen humanen B₁R-Klon, der 353 AS kodiert (Menke *et al.*, 1994). Zwei Jahre später isolierten Pesquero *et al.* (1996) einen Klon der Maus mit 334 AS. Dieses Protein zeigte sieben potentielle Transmembrandomänen und war mit dem humanen und dem Kaninchen-B₁R bis zu 68% identisch (Pesquero *et al.*, 1996). Das Ratten-B₁R-Gen wies eine bis zu 71%ige Homologie zum Pendant des humanen und Kaninchengens auf. Auch zur Maus zeigte sich eine 89%ige Homologie (Ni *et al.*, 1998). Trotz des hohen Grades an identischen AS zeigen die B₁R verschiedener Spezies auffällige Unterschiede in der ersten extrazellulären Schleife und am C-terminalen Ende. Dadurch könnte die unterschiedliche Pharmakologie der Nagetier- und humanen Rezeptoren begründet sein (Chai *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 1996; MacNeil *et al.*, 1995; Pesquero *et al.*, 1996a, 1996b; Yang und Polgar, 1996). Mutagenese-Studien des humanen B₁R zeigten, dass die extrazelluläre Domäne IV (Abb.1.4, EC3), eine wichtige Determinante für die Ligandenselektivität ist (Hess *et al.*, 2002).

Wang *et al.* (1994) isolierten einen B₂R-Klon der Ratte, der ein Protein mit 366 AS kodiert und eine hohe Sequenzidentität mit dem humanen und dem Maus-B₂R-Gen aufwies (Wang *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu, fanden Park *et al.* (1994) nur bei Mensch und Ratte eine hohe Homologie des B₂R-Gens (Park *et al.*, 1994). Später isolierten Farmer *et al.* (1998) einen Meerschweinchen-Klon mit 372 AS und 80%iger Homologie zum humanen, Kaninchen- und Maus-B₂R (Farmer *et al.*, 1998). Der C-Terminus erwies sich für die Internalisation des B₂R als wichtig. Der Austausch der C-Termini des B₁R und B₂R führten zu einer sehr beschränkten Internalisation des chimären B₂R-Rezeptors (Faussner *et al.*, 1998). Das Entfernen der letzten 34 AS des distalen C-Terminus, inklusive des S/T-Clusters, führten zu fehlerhafter Signalübertragung und Erhaltung des B₂R. Somit ist diese Region an der Rezeptorendozytose beteiligt (Prado *et al.*, 1997). Auch Austausch oder Deletion einzelner AS führte zu fehlerhafter Rezeptorinternalisation. Solche Mutanten konnten zum Teil keine BK-induzierte Rezeptorphosphorylierung durchführen, warum Phosphorylierung und Internalisation funktional verbunden werden (Blaukat *et al.*, 2001). Ferner zeigten Mutationen in anderen intrazellulären Schleifen Zusammenhänge zwischen Rezeptorfunktion und Internalisation (Pizard *et al.*, 1999; Prado *et al.*, 1997, 1998, 2001; Soskic *et al.*, 1999)

1.4. Bradykinin-Rezeptoren als Mitglieder der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

1.4.1. Allgemeine Merkmale der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Der B₁R und der B₂R gehören aufgrund ihrer Sieben-Transmembran-Domänen-Proteinstruktur (Abb 1.4) zur bekanntesten und mit 1000 Mitgliedern (Hofmann & Ernst, 2001) auch größten Rezeptorfamilie, den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPgR) (Austin *et al.*, 1997; Faussner *et al.*, 1999; Marceau *et al.*, 1997, 1998; Pizard *et al.*, 1998; Vaidehi *et al.*, 2002). Etwa 60% aller vermarkteten Pharmaka üben ihre Wirkung über GPgR aus, was die Bedeutung dieser Rezeptorklasse am besten widerspiegelt (Gurrath, 2001; Vaidehi, *et al.*, 2002). Sie sind an vielen Kommunikationsprozessen der Zelle beteiligt, wie dem Sehen, dem Geruchs- und Geschmackssinn und dem Schmerz etc., indem sie extrazelluläre Signale in die Zelle weiterleiten. Matsunami *et al.* (2000) konnten bei Mäusen ca. 50 GPgR bestimmen, die an der Vermittlung des Geschmackssinnes beteiligt sind (Matsunami *et al.*, 2000). Ebenso sind sie an der Neurotransmission, am Wachstum, an der Differentiation, an der Transformation und an der Onkogenese beteiligt (Ram & Iyengar, 2001; Whitehead *et al.*, 2001). Beispiele für die Transformation und Onkogenese sind die Transformation von NIH3T3-Zellen durch mutierte α 1B-adrenergische Rezeptoren (Allen *et al.*, 1991) und die Agonist-abhängige Transformation von NIH3T3-Zellen durch den Serotonin-5/HTB1b-Rezeptor und M1-, M3- und M5-Subtypen des muskarinen Acetylcholin-Rezeptors (Gutkind *et al.*, 1991; Julius *et al.*, 1989; Ram & Iyengar *et al.*, 2001).

Die GPgR werden durch ihre strukturellen und funktionellen Charakteristika definiert (Vaidehi *et al.*, 2002). Obwohl sie sich deutlich in der Primärstruktur unterscheiden, teilen sie gemeinsame strukturelle Merkmale, die ihren gemeinsamen Wirkungsmechanismus reflektieren. Liganden, von extrazellulären gering-molekularen Agonisten und Antagonisten bis hin zu Peptiden (Aminosäuren, ungesättigte Fettsäuren etc.), binden an extrazellulären und/ oder transmembranen Domänen und aktivieren die Rezeptoren durch unterschiedlichste Mechanismen (Strader *et al.*, 1995). Dies erklärt die große Anzahl verschiedenster physiologischer Reaktionen nach der Bindung (Ram & Iyengar, 2001; Selbie & Hill, 1998; Strader *et al.*, 1995). Zusätzlich können die GPgR auch zum Teil gleichzeitig verschiedene intrazelluläre Stoffwechselwege aktivieren (Ram & Iyengar, 2001; Selbie & Hill, 1998). Eine einwandfreie Funktion des GPgR, erfordert ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Moleküle und Mechanismen (Schöneberg *et al.*, 1999).

Es gibt auch Hinweise, dass Rezeptoren als Homo- oder Heterodimere bzw. Oligomere existieren können (Zeng & Wess, 1999; Bouvier, 2001). Dimere von GPgR wurden visualisiert und durch biochemische und physiologische Methoden bewiesen (Rio *et al.*, 2001). Beispiele der Heterodimerisation sind der muskarine M₃-Rezeptor (Zeng & Wess, 1999) und der AT₁-Rezeptor, der mit dem AT₂-Rezeptor und dem B₂R ein Dimer bilden kann (AbdAlla *et al.*, 2000, 2001). Obwohl die Homodimerisation noch grundlegende Fragen aufwirft, ermöglicht die Heterodimerisation faszinierende Kombinationsmöglichkeiten für die pharmakologische Vielfalt und die ‚cross-talk‘-Regulation der Übertragungssysteme (Bouvier, 2001).

1.4.2. Die Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Da nur sehr kleine, ungeladene Moleküle ohne weiteres in Zellen diffundieren können, besitzen diese spezielle Transportsysteme, mit denen die biologische Wirkung von größeren und geladenen Molekülen in die Zelle vermittelt werden kann. So lösen Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und auch Pharmaka (‚first messenger‘) ihre Wirkung nicht direkt in der Zelle aus, sondern entfalten diese über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor. Oft spielen GPgR eine entscheidende Rolle bei der Übertragung eines extrazellulären Signals ins Zellinnere. Die extrazellulären Signale können durch die Signaltransduktion in der Zelle zusätzlich verstärkt werden (Marinissen & Gutkind, 2001). Durch die Bindung eines ‚first messengers‘ an den GPgR werden in der Zelle am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, je nach Rezeptor, verschiedene G-Protein-Komplexe aktiviert. Diese Bindung führt dazu, dass das an der α -Untereinheit gebundene GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Dadurch spaltet sich das G-Protein-Heterotrimer in eine $G\alpha$ - und in eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit (Selbie & Hill, 1998; Streyer, 1991). Diese Untereinheiten stimulieren dann verschiedene sekundäre Enzyme, wie die Adenylatcyclase (AC), Guanylatcyclase, Phosphodiesterase, Phospholipase A₂ (PLA₂), Phospholipase C (PLC) und Phosphoinositid 3-Kinase. Sie ändern dann die

Konzentrationen von ‚second messengern‘ im Zellinneren, die somit letztendlich für die biologische Wirkung des zu übermittelnden Signals verantwortlich sind (Marinissen & Gutkind, 2001; Abb. 1.5). Zu den wichtigsten ‚second messengern‘ gehören neben Ca^{2+} , unter anderem cAMP, cGMP, Diacylglycerol (DAG), Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Stickstoffmonoxid (NO). Diese sind an der Signalübertragung in allen eukariontischen Zellen beteiligt (Berridge, 1993; Davis, 1992; Karlson *et al.*, 1994; Streyer, 1991).

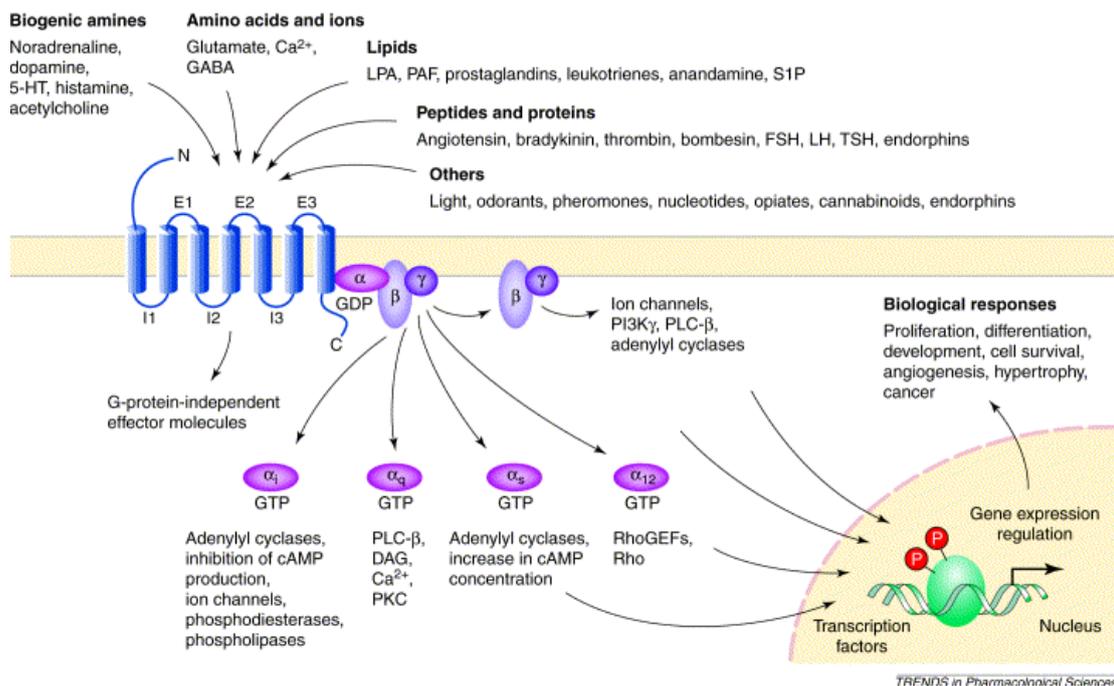


Abb. 1.5 Mögliche Wege der Signaltransduktion nach Bindung eines Liganden an den GPgR (aus Marinissen & Gutkind, 2001). Viele verschiedene Liganden (z.B. biogene Amine, Aminosäuren, Ionen, Lipide, Peptide und Hormone) benutzen GPgR um cytoplasmatische und nukleare Vorgänge zu stimulieren. Über diese Signalstoffwechselwege werden biologische Schlüsselfunktionen wie Zellproliferation, Angiogenese, Hypertrophie und Zelldifferenzierung reguliert. DAG – Diacylglycerol; FSH – Follikel-stimulierendes Hormon; GEF – guanine nucleotide exchange factor; LH – leuteinizing hormone; LPA – lysophosphatidic acid; PAF – platelet-activating factor; PI3K – Phosphoinositide 3-Kinase; PKC – Protein-kinase C; PLC – Phospholipase C; S1P – Sphingosin-1-Phosphat; TSH – thyroid-stimulating hormone.

Wird durch den entsprechend aktivierten $\text{G}\alpha$ -Protein-Komplex die AC stimuliert, kann dieses zur Bildung von cAMP führen (z.B. β -adrenerger Rezeptor, Dopaminrezeptor) (Berridge, 1993; Davis, 1992; Karlson *et al.*, 1994; Streyer, 1991). Die AC kann sowohl durch $\text{G}\alpha_i$ als auch durch $\text{G}\alpha_s$ stimuliert werden (Karlson *et al.*, 1994) (Abb. 1.5). Das cAMP beeinflusst wiederum viele zelluläre Prozesse, wie z. B. die Stimulierung des Glykogenabbaus und Hemmung der Glykogensynthese im Muskel. Kommt es durch die $\text{G}\alpha$ -Untereinheit zur Stimulierung der PLC, die sowohl durch $\text{G}\alpha_i$ - als auch $\text{G}\alpha_q$ -Proteine aktivierbar ist (Selbie & Hill, 1998), werden aus einem Inositol-Phospholipid, dem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), gleichzeitig zwei ‚second messenger‘, das IP_3 und DAG, gespalten. IP_3 stimuliert die

Freisetzung von Ca^{2+} im Cytosol (Abb. 1.5). Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel kann Prozesse wie Kontraktion von glatten Muskelzellen, Glykogenabbau und Endozytose auslösen. Das DAG verbleibt in der Zellmembran und aktiviert dort die Ca^{2+} -Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC). Diese phosphoryliert dann weitere Proteine, die wichtige biologische Prozesse, wie die Hemmung der Glykogensynthese, gesteuert werden (Streyer, 1991; Davis, 1992; Berridge, 1993; Karlson *et al.*, 1994). Auch die Phospholipasen A_2 (PLA_2) und D (PLD) werden durch $G\alpha$ -Untereinheiten stimuliert. Sie spalten nicht nur PIP_2 , sondern auch andere Phospholipide, die neben IP_3 und DAG auch noch Arachidonsäure und Phosphatidsäure freisetzen, um damit direkt oder indirekt die PKC steuern.

Die $G\beta\gamma$ -Untereinheit bindet an einen durch G-Proteine-aktivierbaren Kaliumkanal, aktiviert diesen und beeinflusst so den Herzmuskel (Streyer, 1991; Karlson *et al.*, 1994).

1.4.3. Die Signaltransduktion des B_1 - und B_2 -Rezeptors

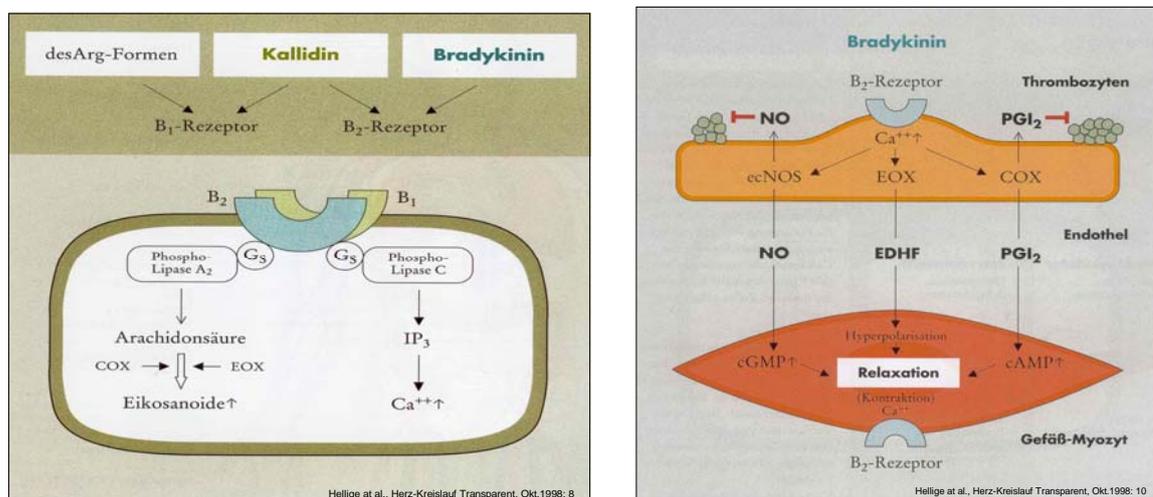


Abb. 1.6 Stimulation der Phospholipase C und A_2 durch B_1R und B_2R vermittelte Signaltransduktion nach Bindung der Agonisten über die Phosphoinositid-Kaskade (aus Hellige *et al.*, 1998). COX – Zyklooxygenase; EOX – Epoxygenase; IP_3 – Inositol-1,4,5-Trisphosphat; NO – Stickstoffmonoxid; EDHF – ‚endothelium-derived hyperpolarizing factor‘; PGI_2 – Prostaglandin 2.

Der B_1R und der B_2R binden an die G-Proteine $G\alpha_q$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ (Austin *et al.*, 1997; Liao & Homcy, 1993; Xie *et al.*, 2000; Yanaga *et al.*, 1991) und dies aktiviert die PLC und die PLA_2 . Die aktivierte PLC bewirkt eine IP_3 -Erhöhung und führt so zum Anstieg der intrazellulären der Ca^{2+} -Freisetzung. Die aktivierte PLA_2 jedoch führt zur Freisetzung von Arachidonsäure und ferner zur Bildung von Eikosanoiden (Abb. 1.6) (Austin *et al.*, 1997; Bastian *et al.*, 1997; Faussner *et al.*, 1999; Linz *et al.*, 1995; Pizard *et al.*, 1998; Tropea *et al.*, 1993; Voino-Yasenetskaya *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 2000). Die Synthese von endothelial freigesetzten Mediatoren wie NO, ‚Endothelium-derived Hyperpolarizing‘ Faktor (EDHF) und Prostaglandin 2 (PGI_2)

wird durch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der entsprechenden Schlüsselenzyme verursacht, der endothelialen NO-Synthetase (eNOS), Epoxygenase (EOX) und Zyklooxygenase (COX). Diese bewirken einen Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) (Burch *et al.*, 1988; Zhiou *et al.*, 2000). Dies bewirkt eine Relaxation, antiischämische Effekte und Hemmung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Abb. 1.6) (Linz *et al.*, 1995).

In 3T3-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der Kinine über die Rezeptoranzahl und auf Signaltransduktionsebene reguliert wird. BK steigerte bei der Gabe von $\text{IL1}\beta$ die Eicosanoid-Synthese, ohne die Anzahl und die Affinität der BKR zu erhöhen (Burch *et al.*, 1988). In endothelialen Zellen (EC) von Rindern konnten Wang *et al.* (1997) eine Ca^{2+} -abhängige Wirkung auf den Filamin-Transport bei Stimulierung des B_1R und B_2R feststellen. Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration war in EC von Ratten und Kaninchen stärker und weniger tachyphylaktisch, wenn er durch den B_1R vermittelt wurde (Bascand *et al.*, 1993; Mathis *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1995). Einige Daten deuten darauf, dass die beiden Rezeptoren verschiedene Wege zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration stimulieren. Die B_2R -Aktivierung scheint eher antifibrotisch zu wirken (Border & Noble, 2001), der B_1R stimuliert Kollagen- und ‚connective tissue growth factor‘ (CTGF)-Synthese in Fibroblasten (Ricupero *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002).

Vermutlich sind die Kininrezeptoren noch mit anderen als oben beschriebenen Transduktionswegen verbunden. Sowohl der B_1R als auch der B_2R könnte die durch den ‚platelet-derived growth factor‘ (PDGF) induzierte DNA-Synthese in glatten Muskelzellen (SMC) von Ratten unterdrücken. Dieser Mechanismus ist nicht PLC, PGI_2 oder cAMP bedingt (Dixon & Dennis, 1997). Wang *et al.* (2001) zeigten, dass nicht nur die PLC durch BK-vermittelte B_2R -Stimulation aktiviert wird, sondern dass die Ca^{2+} -Konzentration auch teilweise über einen Pertussistoxin-empfindlichen Transduktionsweg gesteigert werden konnte.

1.5. Interaktion des Kallikrein-Kinin- und des Renin-Angiotensin-Systems

Das Kallikrein-Kinin- (KKS) und Renin-Angiotensin-System (RAS) spielen unter anderem im vaskulären Endothelium bei der Regulation des Tonus eine Schlüsselrolle. Daran sind Vasodilatoren, wie BK, NO und PGI_2 , sowie Vasokonstriktorsubstanzen, wie ANG II, Thromboxan A₂, freie Radikale und Endothelin beteiligt (Cervenka *et al.*, 2001). Diese Funktionen des KKS und RAS zeigen beispielhaft, wie vielschichtig beide Systeme miteinander verbunden sind (Campbell, 2002; Linz & Busch, 2003; Schmaier, 2003; Tschöpe *et al.*, 1997b, 2002). Sie tragen zur Homöostase der Blutdruckkontrolle und vielen anderen biologischen Prozessen bei (Siragy *et al.*, 1996).

1.5.1. Das Renin-Angiotensin-System

Das RAS ist neben dem catecholaminergen System das bedeutendste hormonelle System zur Regulation des Blutdruckes. Es spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes (Forth *et al.*, 2001) (Abb. 1.7). Zusätzlich zum endokrinen RAS werden auch lokale RAS beschrieben, wie im Herzen und in der Vene. Diese lokalen Systeme sind nicht komplett, nutzen das zirkulierende Renin und möglicherweise das Angiotensinogen zur Synthese des lokalen ANG II (Linz & Busch, 2003; Young & Funder, 2000). Das RAS übt seine Funktion hauptsächlich über das Effektorpeptid ANG II aus (Tschöpe *et al.*, 1997b).

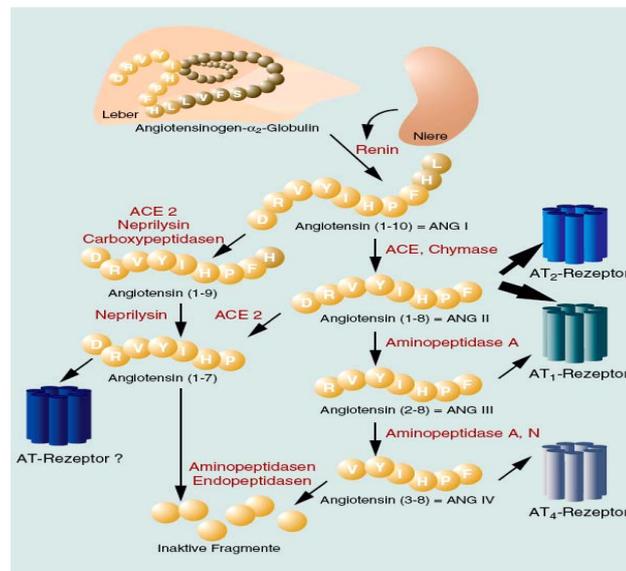


Abb. 1.7 Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-System (aus Linz & Busch, 2003) . ACE – Angiotensin-Konversions-Enzym; ACE2 – Angiotensin-Konversions-Enzym 2.

Der hauptsächliche Ort der Synthese, Speicherung und Freisetzung des Renins, sind die glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole des Nephrons (Abb. 1.7). Die Reninausschüttung wird durch verminderte Durchblutung der Nieren (verringertes Perfusionsdruck steigert die Reninausschüttung, erhöhter Perfusionsdruck senkt sie), durch die Zusammensetzung der Flüssigkeit im distalen Tubulus (Verringerung der NaCl-Konzentration erhöht die Reninfreisetzung, Erhöhung senkt sie), über Beta-2-Rezeptoren, die auf zirkulierendes Adrenalin ansprechen (Stimulation der β_1 -Adrenozeptoren, damit die Stimulation der cAMP-Bildung führt zur Aktivierung cAMP-sensitiver Proteinkinasen, was wiederum die Reninausschüttung erhöht) (Friis *et al.*, 2002) und durch Prostaglandine (PGI_2 und PGE_2 steigern die Reninfreisetzung) reguliert. Das Renin ist eine Aspartyl-Protease, die aus Angiotensinogen, einem α_2 -Globulin, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird, ANG I abspaltet (Abb. 1.7). Das 10-AS-Peptid hat keine Wirkung auf die Gefäße. Aus ihm spaltet das ACE, das ANG II. Dieses Oktapeptid bindet dann an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, dem AT₁- (AT₁R) und AT₂-Rezeptor (AT₂R) (Abb. 1.7). Die beiden Rezeptoren weisen die gleiche Affinität zu ANG II auf (De Gasparo & Siragy, 1999), unterscheiden sich aber in ihrer Affinität zu anderen

Angiotensin-Peptidfragmenten. ANG II-Rezeptoren besitzen eine unterschiedliche Affinität für nicht-peptidische Antagonisten. Den AT₁R findet man als hauptsächlichen Angiotensinrezeptor bei Erwachsenen. Die meisten Wirkungen des ANG II werden über diesen Rezeptor vermittelt. Bei Ratten und Mäusen, jedoch nicht bei Menschen, konnten zwei Formen des AT₁R, der AT₁A- und der AT₁B-Rezeptor, mit ähnlichen Eigenschaften isoliert werden (Campbell, 2001). Über den AT₂R ist nur wenig bekannt, er wird mehr mit der fötalen Entwicklung verbunden und scheint bei der Gewebeheilung hochreguliert zu werden (Meffert *et al.*, 1996; Stoll *et al.*, 1995). ANG II, auch als Angiotensin (1-8) bezeichnet, wird durch verschiedene Peptidasen zu Bruchstücken, dem Angiotensin (2-8) (ANG III), dem Angiotensin (3-8) (ANG IV) und dem Angiotensin (1-7) (ANG (1-7)), abgebaut (Cesari *et al.*, 2002; Forth *et al.*, 1998; Linz & Busch, 2003) (Abb. 1.7). ANG III und ANG IV binden an den postulierten AT₄-Rezeptor (Cesari *et al.*, 2002; Forth *et al.*, 1998; Linz & Busch, 2003) (Abb. 1.7). Das ANG (1-7) bindet nach neuesten Untersuchungen an einen eigenen Rezeptor, den Mas-Rezeptor (Santos *et al.*, 2003). Es wird direkt aus ANG I durch die Neutrale Endopeptidase (NEP), die Prolylcarboxypeptidase und aus ANG II durch ACE2 gebildet (Erdös & Skidgel, 1997; Ferrario & Iyer, 1998; Gafford *et al.*, 1983; Santos *et al.*, 2000) (Abb. 1.7). Es ist ein biologisch aktives Peptid des RAS (Ody *et al.*, 1978; Santos *et al.*, 2000; Vickers *et al.*, 2002) und kann durch ACE abgebaut werden (Schmaier *et al.*, 2003). ANG (1-7) reduziert die Neointima-Bildung nach einer vaskulären Schädigung (Freeman *et al.*, 1996) und steigert die urinale Prostaglandinausschüttung (Benter *et al.*, 1995; Strawn *et al.*, 1999). Das ACE 2, ein Homolog des ACE weist eine andere Spezifität als das ACE (Bernstein, 2002; Marcic *et al.*, 1999). Es spaltet einerseits aus ANG I das Angiotensin (1-9) (ANG (1-9)), aber auch das ANG II zu ANG (1-7) (Crackower *et al.*, 2002; Linz *et al.*, 1999; Linz & Busch, 2003; Tipnis *et al.*, 2000) (Abb. 1.7). Des Weiteren baut es desArg-BK ab, jedoch kein BK (Donoghue *et al.*, 2000). Somit könnte das ACE2 ein wichtiges Enzym zur Regulation der Herzfunktion sein (Crackower *et al.*, 2002; Linz *et al.*, 1999; Linz & Busch, 2003). Es ist hauptsächlich im Herzen, in der Niere und im Hoden zu finden (Bernstein, 2002; Crackower *et al.*, 2002; Donoghue *et al.*, 2000; Marcic *et al.*, 1999; Tipnis *et al.*, 2000).

Neben dem ACE bilden auch Herzchymase, Tonin, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren (t-PA) und Cathepsin G, das ANG II. Im Gegensatz zum ACE ist die Herzchymase spezifisch für ANG I und kann somit BK und Substanz P nicht abbauen. Die genaue Rolle dieser alternativen ANG II-Quellen ist nicht bekannt, jedoch gibt es Hinweise, dass die Herzchymase im ischämischen Herzen ansteigt. Das lokal gebildete ANG II könnte zusammen mit dem lokal erhöhten Noradrenalin eine klinische Relevanz haben (Linz & Busch, 2003; Maruyama *et al.*, 2000).

1.5.2. Kardiovaskuläre Bedeutung der Interaktion der Systeme

Das Kallikrein-Kinin- (KKS) und das Renin-Angiotensin-System (RAS) bilden zwei interaktive und voneinander abhängig regulierende Systeme, die mit einer Vielzahl

von physiologischen und pathophysiologischen Funktionen verbunden sind. Funktionell sind die verschiedenen Wirkungen beider Systeme oft entgegengesetzt, jedoch sind die Interaktionen zwischen den Systemen komplex und nicht immer nur gegensätzlich (Bao *et al.*, 1992; Danckwardt *et al.*, 1990; Dendorfer *et al.*, 1999; Gohlke *et al.*, 1994; Linz *et al.*, 1995; Tschöpe *et al.*, 1997b, 2002).

Die erste wichtige Verbindung zwischen dem KKS und dem RAS ist die Kininase II, das hauptsächliche Abbauenzym des BK, die dem ACE gleich ist (Erdös & Yang, 1967; Yang *et al.*, 1970, 1971; Yang & Erdös, 1967). Das ACE spaltet neben ANG I und BK, auch KL und Substanz P. So ist neben der Verringerung des ANG II, auch die Anreicherung der anderen Peptide direkt oder indirekt mit der antihypertensiven, kardioprotektiven Wirkung der ACE-Inhibitoren verbunden (Linz *et al.*, 1999; Linz & Busch, 2003). ACE-Inhibitoren zeigten in einer großen klinischen Studie, dass sie bei kardiovaskulären Krankheiten den Tod, Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz reduzieren. Auch Diabetes-bezogene Komplikationen wurden verringert (Heart Outcomes Prevention Evaluation [HOPE] Studie, 2000). Sie haben nicht nur einen Einfluss auf die BK-Degradierung, sondern auch auf die BK-Aktivität. Durch Interaktion des ACE mit den B₂R-Molekülen wird die intrinsische Aktivität der unbesetzten B₂R-Moleküle gesteigert, indem das ACE und die B₂R-Moleküle ein Heterodimer bilden (Hecker *et al.*, 1994, 1997; Marcic *et al.*, 2000; Minshall *et al.*, 1997). ACE-Inhibitoren könnten in die Sequestration des B₂R verwickelt sein (Benzig *et al.*, 1999). Die B₂R-Aktivierung wird durch die ACE-Inhibitor-vermittelte Zunahme der ACE-Konzentration gesteigert (Marcic *et al.*, 2000). Dies stützt die Hypothese, dass viele Wirkungen der ACE-Inhibitoren durch BK vermittelt werden (Schmaier, 2003). Neben dem Einfluss auf den B₂R, zeigte ACE auch Einflüsse auf den B₁R. Der Einfluss der ACE-Inhibitoren auf inflammatorische Systeme ist bekannt (Schmaier, 2003). Die andauernde Behandlung bewirkt eine Induktion des funktionellen, vaskulären und renalen B₁R (Marin-Castano *et al.*, 2002). Das Homolog des ACE, ACE2, kann kein BK abbauen, aber desArg-BK (Donoghue *et al.*, 2000).

ANG II ist nicht nur ein starker Vasokonstriktor, der zu Bluthochdruck führt (Kintsurashvili *et al.*, 2001; Tschöpe *et al.*, 1997b), sondern auch ein starkes Mitogen. Es bewirkt Wachstum und Proliferation bei vaskulären glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten. Außerdem besitzt ANG II oxidative, prothrombotische und Ionenkanal-ändernde Eigenschaften (Kintsurashvili *et al.*, 2001). Des Weiteren ist es für die Salz- und Wasserspeicherung verantwortlich (Bao *et al.*, 1992; Danckwardt *et al.*, 1990; Gohlke *et al.*, 1994). Die klassischen Wirkungen des ANG II werden über den AT₁R vermittelt. So wird Noradrenalin aus den sympathischen Nervenenden freigesetzt, ebenso Adrenalin aus dem Nebennierenmark, was die vasokonstriktive und proliferative Wirkung potenziert (Linz *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum ANG II ist BK ein Vasodilator, der zur Natriuresis führt. Es weist antithrombotische, antimitotische, antiproliferative und antioxidative Wirkungen auf (Bao *et al.*, 1992; Danckwardt *et al.*, 1990; Gohlke *et al.*, 1994; Kintsurashvili *et al.*, 2001). Sowohl ANG II, als auch BK können Prostaglandine generieren (Bao *et al.*, 1992; Danckwardt *et al.*, 1990; Gohlke *et al.*, 1994). Bei großen Mengen ANG II kommt es mit der Hochregulation des B₂R zu einer

offensichtlichen Gegenregulation. Ist der B₂R nicht vorhanden, kommt es, wenn dieser bereits vorhanden ist, zur Erhöhung des B₁R, (Kintsurashvili *et al.*, 2001). Das ANG (1-7), ein ANG II-Metabolit, kann die BK-Wirkungen potenzieren (Abbas *et al.*, 1997; Bronihan *et al.*, 1996; Deddish *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2001; Tsutsumi *et al.*, 1999), indem es an die aktive Stelle des ACE am ACE/B₂R-Heterodimer bindet (Deddish *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Marcic *et al.*, 1999). Somit kommt es nach der Peptidstimulation zur direkten oder indirekten Interaktion seines Rezeptors mit dem B₂R (Dendorfer *et al.*, 1999). Dass ANG (1-7), den B₂R ohne direkte Wirkungen auf seinen eigenen Rezeptor resensibilisieren kann, demonstrierten auch weitere Studien (Campagnole-Santos *et al.*, 1992; Dendorfer *et al.*, 1999; Gerken & Santos, 1992; Paula *et al.*, 1995). Ebenso sind andere ACE-Substrate, wie BK (1-8) und ANG (1-9) in der Lage den B₂R zu resensibilisieren (Skidgel & Erdös, 1998). Genauso könnte ANG (1-7) über die Stimulierung des AT₂R die BK-Ausschüttung stimulieren (Ferrario and Iyer, 1998).

Weitere Bindeglieder der Systeme sind die ANG II-Rezeptoren AT₁ (AT₁R) und AT₂ (AT₂R) (Schmaier, 2003; Siragy *et al.*, 1996). Der AT₁R und AT₂R verhalten sich antagonistisch zueinander. Während der AT₁R traditionell mit dem Wachstumsfaktor und den Zytokinreptoren verbunden wird, Proliferation und Vasokonstriktion bewirkt, schreibt man dem AT₂R, Antiwachstums-, antihypertrophische und proapoptotische Effekte zu (Kagiyama *et al.*, 2002; Meffert *et al.*, 1996; Stoll *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2002). Bei fötalen Fibroblasten und myometrialen Biopsien konnten Heterodimere des AT₁R und AT₂R gezeigt werden. In diesem Verbund kann der AT₂R, den AT₁R-Effekten ohne Aktivierung und ‚signaling‘ entgegenwirken (AbdAlla *et al.*, 2001a). Die Verbindung des AT₂R mit dem KKS und seine kardiovaskuläre Relevanz zeigen viele Studien (Carey *et al.*, 2001; Cervenka *et al.*, 2001; Dedio *et al.*, 2001; Gohlke *et al.*, 1998; Katada & Majima, 2002; Siragy *et al.*, 1996, 2001; Tsutsumi *et al.*, 1999; Vanhoutte, 2002). Die Fähigkeit von ANG II, die renale BK-Produktion direkt zu stimulieren, wird dem AT₂R zugeschrieben (Lui *et al.*, 1997; Siragy & Carey, 1999). Unter normalen physiologischen Bedingungen entwickelten 12 Monate alte B₂R-defiziente Mäuse eine Hypertonie mit Zunahme des linksventrikulären Wachstums. Die reparative Fibrose konnte durch ACE-Inhibition oder AT₁R-Blockade verhindert werden (Emanuelli *et al.*, 1999; Madeddu *et al.*, 1997, 2000; Yang *et al.*, 2001). Bei AT₁R-defizienten Mäusen konnte ein aktiviertes KKS beobachtet werden, was den Schweregrad bei renalen vaskulären Krankheiten verbesserte (Tsuchida *et al.*, 1999). Auch die Heterodimerisierung des AT₁R und B₂R stellt eine Achse zwischen dem KKS und dem RAS dar. Die Dimere verbessern die Aktivierung der zwei Hauptsignalproteine, G_{αq}- und G_{αi}-Protein, und damit das AT₁R-‚signaling‘. Dies wird nicht durch BK beeinflusst (AbdAlla *et al.*, 2000, 2001b). BK könnte für die Effekte des AT₁R-Antagonismus verantwortlich sein, da B₂R-Antagonisten einige Effekte verhindern können. Aber auch die Aktivierung des AT₂R während der AT₁R-Blockade könnte zur erhöhten BK-Bildung führen und die Effekte der AT₁-Blockade vermitteln. So könnte auch die AT₂R-vermittelte Vasodilatation herbeigeführt werden, welche die vasokonstriktiven Wirkungen des AT₁R ausgleichen (Katada *et al.*, 2002; Lui *et al.*, 1997).

Weiterhin stimuliert BK die Reninexpression. Das renale KLK wird durch eine negative ‚feedback‘-Schleife reguliert, welche durch den B₂R vermittelt wird (Yosipiv *et al.*, 2001). Das Plasmakallikrein stellt eine weitere Verbindung der Systeme dar. Es ist in die Proreninaktivierung verwickelt (Bader & Ganten, 2000; Diamandis & Yousef, 2002; Derkx *et al.*, 1987; Kikkawa *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1991; Morris & McGirr, 1981; Neves *et al.*, 1996; Sealey *et al.*, 1978; Wong *et al.*, 1983) und kann zusätzlich Angiotensinogen direkt in ANG II umwandeln (Santos *et al.*, 2001). Obwohl es wenig Information über die Aktivierung des Gewebeprenin durch das Gewebekallikrein gibt, sieht man das Gewebekallikrein als Prorenin-Konversionsenzym an (Hummerich *et al.*, 1979). Zusätzlich könnte das Gewebekallikrein die Genexpression des Renins fördern (Schmaier, 2003).

1.6. Pathophysiologie des Herzens

Die Herzerkrankungen nehmen eine gewisse Sonderstellung unter den internistisch zu behandelnden Krankheiten ein, da das Herz einen „speziellen“ Wert besitzt (Gross *et al.*, 1987). Die Herzinsuffizienz ist die führende Ursache für den Tod in den industrialisierten Ländern und stellt die Epidemie des 21. Jahrhunderts dar (Braunwald, 1997; Gordon & Rempher, 2003). Zu den Ursachen der Herzinsuffizienz zählen die linksventrikuläre Hypertrophie, die diabetische sowie die ischämische Kardiomyopathie.

1.6.1. Linksventrikuläre Hypertrophie

Ist das Herz einer hämodynamischen Last ausgesetzt, kann es diese mit Zunahme der Muskelmasse und/oder Steigerung der Kontraktilität durch Rekrutierung neuronaler Mechanismen kompensieren (Lorell & Carabello, 2000). So entwickelt sich durch die Hypertonie neben der Wandhypertrophie, schließlich eine Dilatation des linken Ventrikels und es kommt zur degenerativen Schädigung des Myokards. Da die Hypertonie die koronare Herzkrankheit begünstigt, tritt bei diesen Patienten als Folge, häufig ein Myokardinfarkt auf. Ebenso findet man in Kombination mit der Hypertonie, Krankheiten wie Diabetes mellitus (Gross *et al.*, 1987). Jedoch gibt es keine lineare Verbindung zwischen Hypertonie und dem Grad der LVH, da auch noch andere Faktoren als der hämodynamische Stress, eine Rolle spielen. Übergewicht, Insulinresistenz und genetische Neigung spielen ebenfalls eine signifikante Rolle bei der Entwicklung der LVH (Lavie *et al.*, 1991).

Einige Studien untersuchten die Verbindung vom Deletions (D)-Polymorphismus des ACE-Gens mit der LVH. Es zeigte sich bei männlichen Probanden eine Verbindung zwischen dem DD-Genotypus und der LVH, bei Frauen jedoch nicht (Iwai *et al.*, 1994; Lindpaintner *et al.*, 1996; Marian *et al.*, 1993; Shunkert *et al.*, 1994). Es folgten weitere Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen (Celentano *et al.*, 1999; Lindpaintner *et al.*, 1996; Myerson *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2002). Die Verbindung zwischen dem DD-Genotyp und der LVH erklärt sich damit, dass ANG II

kardiale Hypertrophie verursacht (Higashimori *et al.*, 1993; Ohishi *et al.*, 1994; van Berlo & Pinto, 2003). Verschiedene Studien deuten auf eine signifikante Rolle des RAS bei der Vermittlung der LVH (Furrkh *et al.*, 1997). Dabei stimuliert die verstärkte lokale Aldosteronsynthese, die durch ANG II getriggert wird, wiederum den AT₁R (Young & Funder, 2000). Auch das vaskuläre KKS mit seinen lokal produzierten Kininen ist mit der Entwicklung der Hypertonie und mit der Entwicklung der LVH verbunden (Duka *et al.*, 2001; Emanuelli *et al.*, 1999; Rhaleb *et al.*, 2001; Schölkens *et al.*, 1996). Viele experimentelle Ergebnisse, im Einklang mit klinischen Beobachtungen, deuten auf die Wichtigkeit der Interaktion des KKS mit RAS hin, um den Schaden am Herzen zu reduzieren oder zu verhindern (Schölkens, 1996).

1.6.2. Diabetische Kardiomyopathie

Der Diabetes mellitus ist unabhängig von koronaren Herzerkrankungen und der potentiell daraus resultierenden ischämischen Kardiomyopathie, die mit einem deutlich erhöhten Herzinsuffizienzrisiko verbunden ist. In der Framingham Studie wurde erstmals eine eigenständige diabetische Kardiomyopathie definiert (Kannel *et al.*, 1974). Die Hauptursache für Morbidität und Mortalität beim Diabetes mellitus ist die kardiovaskuläre Krankheit (Candido *et al.*, 2003). Die größte Bedeutung hat dabei der Herzinfarkt, sowohl wegen der Häufigkeit als auch wegen der ernsten Prognose (Brown *et al.*, 1992; Palik *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1984). Studien belegen eine erhöhte Inzidenz des Herzinfarktes, mit doppelter Postinfarkt-Mortalitätsrate im Vergleich mit altersgleichen nicht-diabetischen Patienten (Smith *et al.*, 1984; Rytter *et al.*, 1985).

Regulationsstörungen des KKS werden bei Herzkreislauferkrankungen, wie Hypertonie, kardialer Ischämie sowie beim Diabetes mellitus beschrieben. Sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I und II, als auch bei diabetischen Tiermodellen, bei denen Diabetes mellitus durch Alloxin oder Streptozotocin (STZ) herbeigeführt wurde, wurden erhöhte Plasmakallikrein- und Kininogenspiegel detektiert. Diese waren abhängig von der Glukoseeinstellung (Uehara *et al.*, 1988). Kinine führen zur besseren Durchblutung des Herzmuskels mit energiereichen Substraten, wie Glukose und Insulin, durch ihren direkten Einfluss auf die Glykolyse und/oder durch Erhöhung des Koronarflusses. So wird der kardiale Metabolismus unter diabetischen Bedingungen verbessert (Dietze *et al.*, 1978; Rösen *et al.*, 1983; Wickmayer *et al.*, 1989; Hartl *et al.*, 1990; Mayfield *et al.*, 1996; Rett *et al.*, 1996). Die Gewebekallikreinkonzentrationen im Herzen sind bei STZ-induzierten diabetischen Wistar Kyoto- und spontan hypertensiven Ratten (SHR) verringert (Sharma & Kesavarao, 1996). Tschöpe *et al.* fanden Beweise für eine reduzierte kardiale KKL-Synthese bei STZ-diabetischen Ratten (Tschöpe *et al.*, 1999b).

Auch das RAS spielt bei Diabetes mellitus eine Rolle. Diabetes kann die hypertrophische Myopathie induzieren, die sich chronisch zur dilatierten Form entwickelt. Neueste Beobachtungen deuten auf die Hochregulation des lokalen RAS und die Synthese von ANG II als kritische Faktoren, die zur Myozytenapoptose im Modell des insulinabhängigen Diabetes führen. Leichte Hypertonie beinhaltet die

Stimulation des systemischen und lokalen RAS, Myozytenverlust und zelluläre Hypertrophie. Zusammen mit Diabetes führt dies zur Schädigung der Struktur und Funktion des Herzens (Frustaci *et al.*, 2000). Hyperglykämie führt bei Menschen und in Tiermodellen des Diabetes mellitus Typ I zum leichten Anstieg des Blutdruckes der auf ANG II zurückzuführen ist (Brands & Fitzgerald, 2002). Ebenso verstärkt sie den ANG II-induzierten kardialen Wachstum (Banes *et al.*, 2004).

1.6.3. Ischämische Kardiomyopathie

Bei einem Myokardinfarkt kommt es zur teilweisen Nekrose des Herzmuskels durch anhaltende Mangel durchblutung bei Koronarinsuffizienz (Riede *et al.*, 1999). Weltweit ist der akute Myokardinfarkt die häufigste Todesursache (Harrison *et al.*, 2001). Bei Patienten- und Tierstudien wurde ein akuter Anstieg des Kininspiegels im Plasma unter ischämischen Bedingungen nachgewiesen. Dies wird mit Kininogenverbrauch und mit ACE-Anstieg verbunden (Hashimoto *et al.*, 1978; Kimura *et al.*, 1973; Pitt *et al.*, 1969). Diversen Studien zeigten bei einer lokalen Kininerhöhung unter ischämischen Bedingungen kardioprotektive Effekte, die zur Erhöhung des Koronarflusses und der Glukoseaufnahme, über die endotheliale Aktivierung von NO und Prostazyklin führen. Dabei werden hoch energiereiche Phosphate geschützt, die Herzinfarktgröße reduziert, die Plasmalaktat- und Kreatinkinasepiegel gesenkt und die myokardiale Hämodynamik verbessert (Tschöpe, 1997a). Nach dem Infarkt kommt es zum Strukturumbau des linken Ventrikels, was eine Hypertrophie des nicht vom Infarkt betroffenen Myokards beinhaltet. Zusätzlich kommt es zur Zunahme des Kammerdurchmessers, bedingt durch die Ausweitung der Infarktnekrose und führt zur Dilatation der sich entwickelnden Infarkt narbe (Pfeiffer *et al.*, 1995). Nach dem initialen Wundheilungsprozesses wird der ‚Remodeling‘-Prozess aufrechterhalten, was zur weiteren Verschlechterung der kardialen Hämodynamik führt. Bei der Aufrechterhaltung dieser Prozesse scheint das aktivierte RAS nachhaltig beteiligt zu sein (Falkenhahn *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). Der vorteilhafte Effekt der ACE-Inhibitoren wurde in einer groß angelegten Studie bewiesen (AIRE-Studie, 1993). An der Reduktion des myokardialen Fibroblastenwachstums und der Kollagensynthese, sowie an der Aktivierung des Kollagenabbaus sind neben der ANG II-Reduktion, auch Kinine beteiligt (Zhou *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1995). Prophylaktische oder frühzeitige Gabe von ACE-Inhibitoren zeigte in Tierstudien, dass Kinine an den ‚anti-remodeling‘-Effekten beteiligt sind (Stauss *et al.*, 1994; McDonald *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1996; Spitznagel *et al.*, 1996). Kinine sind zwar beim kardialen ‚Remodeling‘ während der ACE-Inhibitorgabe nicht an der Reduktion der Myozytenhypertrophie beteiligt, aber signifikant an der Reduktion der interstitiellen Kollagenakkumulation. Durch die Akkumulation der Kinine in der Initialphase des ‚Remodelings‘, kann die damit verbundene Ödemzunahme und Invasion der inflammatorischen Zellen verstärkt werden. Dies führt zur weiteren Ausbreitung des Infarktgebietes. Der Einfluss der Kinine auf Größe und Stabilität der Infarkt narbe wird unterschiedlich diskutiert (Weber *et al.*, 1995; Sigusch *et al.*, 1996).

1.6.4. Zytokine in der kardialen Pathophysiologie

1.6.4.1. Die Zytokine

Früh nach dem Myokardinfarkt, exprimiert das Herz vermehrt eine Klasse von biologisch aktiven Faktoren, die im Allgemeinen als Zytokine bezeichnet werden. Zytokine sind eine Gruppe von Proteinmolekülen mit relativ geringem Molekulargewicht. Verschiedene Zellen sondern sie als Antwort auf eine Vielzahl von verschiedenen Stimuli ab. Sie modulieren physiologisch und/oder pathophysiologisch die funktionellen Aktivitäten von einzelnen Zellen und Geweben. Ebenso sind sie praktisch an allen allgemeinen systemischen Reaktionen eines Organismus, einschließlich der Wundheilung, inflammatorischer Prozesse und an der Regulation von immunen Wirkungen beteiligt. Die allgemeinen Effekte eines Zytokines hängen von der zeitlichen Steuerung der Ausschüttung, dem lokalen Milieu, der Anwesenheit konkurrierender und synergistischer Elemente, der Zytokinrezeptordichte und der Gewebe-ansprechbarkeit des Enzyms ab (Opal & DePalo, 2000). In Bezug auf die kardiale Pathophysiologie, können Zytokine in drei Kategorien eingeteilt werden: proinflammatorisch, antiproinflammatorisch und kardioprotektiv.

"Proinflammatorische Zytokine" sind sowohl für die Initiation der primären Antwort auf eine bakterielle Infektion, als auch für die Gewebereparatur nach der Gewebeverletzung verantwortlich. Unter inflammatorischen Bedingungen spielt die zelluläre Immunität eine wichtige Rolle bei der Regulation der Wundreparatur. Proinflammatorische Zytokine, einschließlich Tumor-Nekrose-Faktor Alpha ($TNF\alpha$), Interleukin 1 Alpha und Beta ($IL1\alpha$, $IL1\beta$), Interleukin 6 ($IL6$) und Interleukin 8 ($IL8$), werden abgesondert. Diese Zytokine schützen vor Infektionen, bereiten verletztes Gewebe auf die Reparatur vor und verbessern die Phagozytenrekrutierung und Aktivierung. Einige Autoren berichteten, dass die von den rekrutierten Zellen ausgeschütteten Zytokine die Fähigkeit der Fibroblasten und der epithelialen Zellen regulieren, beschädigtes Gewebe umzugestalten (Barbul *et al.*, 1990; Lowry *et al.*, 1993). Obwohl fast jede Zellart im Körper $IL1\beta$ produzieren kann, sind Myozyten die Hauptquelle.

1.6.4.2. Pathophysiologische Bedeutung der Zytokine im kardialen System

Ursprünglich wurde die Forschung über Zytokine auf die Pathogenese der Sepsis und den septischen Schock fokussiert. Ihre Rolle bei der Pathogenese akuter ischämischer Ereignisse, wie dem MI und die Entwicklung der Kardiomyopathie, war eine relativ neue Entdeckung. Sowohl bei Menschen, als auch bei Tiermodellen, wurden ihre Wirkungen auf die immunvermittelte Herzmuskelfunktion untersucht. Obwohl meistens $IL-6$ und $TNF\alpha$ mit dem Herzversagen assoziiert werden, spielen auch Zytokine, wie $IL1\beta$ und $IL-2$ dabei eine Rolle (Blum & Miller, 2001). Patienten weisen früh nach dem MI sowohl gesteigerte Plasmalevel, als auch eine lokale Produktion von $IL1\beta$ und anderen proinflammatorischen Zytokinen, wie $IL6$, $IL8$ und

TNF α , im Myokard auf (Blum *et al.*, 1994; Guillen *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1995; Tashiro *et al.*, 1995). Einer Studie mit einem Ratten-Herzinfarktmodell dokumentierte eine gesteigerte Ausschüttung von TNF α , IL1 β und IL6 in der infarzierten Region des Herzens, in der nicht-infarzierten Region war die Ausschüttung von IL1 β am höchsten und blieb über mindestens 20 Wochen auf einem hohen Level (Ono *et al.*, 1998). Während des MI wurden Änderungen der Kollagenkonzentration und der Phänotypen bei der ischämischen Kardiomyopathie demonstriert. IL1 könnte die Produktion, Ausschüttung und Aktivierung der Metalloproteinasen regulieren, die bei der Zerstörung und des ‚Remodelings‘ der Bindegewebsmatrix wichtig sind (McCormick *et al.*, 1994). Okusawa und Kollegen zeigten, dass IL1 β innerhalb von 60 min zu einer raschen Minderung des systemischen arteriellen Druckes bei Kaninchen führte (Okusawa *et al.*, 1988). Hosenpud *et al.* (1989) zeigte *in vitro* bei erwachsenen Rattenherzen, dass die Behandlung mit IL1 β , die Herzmuskel-Energieerzeugung unterdrückt. Balligand *et al.* (1993) fand keine Wirkung von IL1 auf die basale kontraktile Funktion, aber es unterdrückte die Isoproterenol-stimulierte Zunahme der Kontraktilität bei neugeborenen- und erwachsenen Rattenmyozyten-Präparationen und die Unterdrückung der IL1-induzierten Kontraktilität, die über einen NO-Signalstoffwechselweg vermittelt sein könnte. Jedoch scheint eine frühe Zunahme der Ausschüttung an Zytokinen bei Patienten mit MI, trotz der gut dokumentierten schädlichen Wirkungen der Zytokine auf die Myozyten und die Herzmuskelfunktion, wesentlich für den Heilprozess und die Erholung beim Patienten zu sein. Klinische Ergebnisse von Blum bewiesen, dass Patienten mit einem gravierenden Vorfall, geringere IL1-Level am ersten Tag aufwiesen, als Patienten mit einem geringen Vorfall. Die Autoren vermuteten, dass das Immunsystem Einfluss auf den Heilprozess hatte und Patienten, die nicht die Fähigkeit hatten rechtzeitig effizient genug zu IL1 zu produzieren, eine schlechtere Aussicht hatten (Blum, 1996).

Kurz nach dem MI durchlebt das Herz die exsudative Phase der Wundeheilung. In dieser Phase wird eine Plasma-ähnliche Flüssigkeit freigesetzt, in der auch immunkompetente Zellen nachzuweisen sind (Braunwald *et al.*, 2001; Riede *et al.*, 1999; Topol 2002). Diese wandern dann in der inflammatorischen Phase in das vom Infarkt betroffene Gebiet, transformieren dort zu Makrophagen und phagozytieren die abgestorbenen Myozyten und das nekrotische Zellmaterial. Gleichzeitig werden Zytokine, wie IL1 β , IL-2 und TNF α freigesetzt (Braunwald *et al.*, 2001; Frangogiannis *et al.* 2002; Topol 2002). Unter diesen Bedingungen könnte die Aktivierung des BK mit der Zytokinausschüttung korrelieren. Als ein starker inflammatorischer Vermittler stimuliert BK die Synthese der Zytokine IL1 β , IL2 und IL6 (Pagaelow *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1996). IL1 β kann die B1R-Hochregulation, über eine Induktion sowohl transkriptionaler als auch posttranskriptionaler mRNA-Stabilisierung induzieren (Zhou *et al.*, 1998). Einige Autoren zeigen, dass es auch den B₂R über einen prostanoiden, zyklischen AMP-Stoffwechselweg induzieren kann (Schmidlin *et al.*, 1998).

1.7. Ziel der Arbeit

Das KKS spielt über die Aktivierung des B₁R und des B₂R eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. So hat es z.B. einen positiven Einfluß auf die Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie (Pessina *et al.*, 1997; Unger *et al.*, 2002). Bei diabetischen Ratten findet man verringerte Kallikreinspiegel im Herzen (Sharma & Kesavarao, 1996; Tschöpe *et al.*, 1999a). Kinine verbessern dabei die Durchblutung und somit die Versorgung des Herzens mit Substraten, Glukose und Insulin (Dietze *et al.*, 1978; Rett *et al.*, 1996). Diese Effekte könnten besonders unter diabetischen Bedingungen wichtig sein. Jedoch sind nach einem Herzinfarkt sowohl die Kininogen-, als auch die Kininspiegel erhöht (Weber *et al.*, 1995; Tschöpe *et al.*, 1999b). Das RAS ist an der Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten beteiligt. Dennoch ist die Interaktion der beiden Systeme nur unzureichend beschrieben worden. Zytokine, wie IL1 β , werden während des Herzinfarktes verstärkt exprimiert und sind in der Lage, die Expression der Bradykinin-Rezeptoren unter inflammatorischen Bedingungen zu modulieren (Pan *et al.*, 1996; Tschöpe, 1997b; Zhou *et al.*, 1998). Aufgrund all dieser Daten war es Ziel der Arbeit durch:

1. Darstellung der Genstruktur, des alternativen Spleißens und der Genregulation des B₁R und des B₂R,
2. Beschreibung der gewebespezifischen Expression und des ontogenetischen Profils der B₁R und B₂R-Expression,
3. Untersuchung der Basalexpression des B₁R und des B₂R unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen im Gewebe und in Zellkulturen des Herzens,
4. Analyse der Expression des B₁R und B₂R in Tiermodellen der linksventrikulären Hypertrophie, Diabetes mellitus und Myokardinfarkt,
5. Detektion der Expression beider Rezeptoren in den Tiermodellen unter verschiedenen pharmakologischen Behandlungen,
6. Überprüfung der Expressionsmuster von transgenen ‚Knockout‘- und Gen-Überexpressions-Tieren,
7. Untersuchung der Interleukin 1 β -Expression zur Findung weiterer Beziehungen zwischen dem Zytokin und den kardiovaskulären Krankheiten,

die Rolle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, B₁R und B₂R, unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen im Herzen, deren Interaktion mit dem Renin-Angiotensin-System und den Einfluss von Interleukin-1 β auf die Rezeptorregulation unter diesen Bedingungen näher zu beschreiben.