

4. Ergebnisse

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Charakterisierung der Regulation und Rolle kardialer B₁- und B₂-Rezeptoren unter pathophysiologischen Bedingungen. Da ein Einfluss von Zytokinen, wie IL1 β , auf die BK-Rezeptoren beim Herzinfarkt postuliert wurde, ist dieser auf beide Rezeptoren untersucht worden. Zum besseren Verständnis der Regulation und Rolle der zwei Rezeptoren des KKS wurde auch auf die Darstellung der Genstruktur eingegangen, um bekannte Aspekte durch neue Daten zu komplettieren. Die hier aufgezeigten Ergebnisse sollen die komplexe Rolle und Bedeutung der Bradykinin-Rezeptoren und die Interaktion mit dem RAS unter pathophysiologischen Bedingungen aufzeigen.

4.1. Genstruktur der Bradykinin-Rezeptoren

Für die Analyse der Exon-Intron-Struktur von Ratte, Maus und Mensch wurden Sequenzen der Genbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) genutzt (3.1.7.). Das Programm BLAST (3.1.7.) diente zum Auffinden der Sequenzen in der Genbank. Mit Hilfe des Programms BLAST 2 SEQUENCES (3.1.7.) wurden die Sequenzen miteinander verglichen. Zur Isolierung und Analyse von mRNA-Spleißvarianten wurden Herzen von Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Aus den linken Ventrikeln wurde RNA isoliert (3.2.1.), diese mit einer ‚RACE‘ (3.2.3.) und mit dem ‚RNase-Protection-Assay‘ (RPA) (3.2.4.) analysiert.

Die Analyse möglicher Promotoren wurde mit ‚online‘-Programmen durchgeführt. Das Programm ‚Neural Network Promoter Prediction‘ (3.1.7.) identifiziert TATA-Boxen und mögliche Transkriptionsstartpunkte (TSS) (Waibel *et al.*, 1989; Reese und Eeckmann, 1995). Bei Eukarionten liegt die TATA-Box dem Transkriptionsstart am nächsten (25 - 30bp davor) und ist relativ variabel. Das Programm erkennt ca. 50% der im Genom befindlichen Promotorregionen. Der ‚Score‘-Wert liegt zwischen 0,01 und 1,00, wobei 1,00, den Wert mit der höchsten Wahrscheinlichkeit darstellt. Die TATA-Boxen wurden auch mit dem Programm ‚HCtata‘ (3.1.7.) überprüft. Es erkennt TATA-Boxen, die häufig in Promotorregionen zu finden sind. Jedoch besitzen nur etwa 70% aller Promotorregionen eine TATA-Box. Ein weiteres Merkmal eukariontischer Promotoren sind GC-reiche Regionen, die sich im Umfeld der TATA-Box befinden, dessen Auffindung das Programm ‚DRAGON GC+ PROMOTER FINDER‘ (3.1.7.) genutzt wurde (Bajic *et al.*, 2003). Es sagt anhand des GC-Gehalts die TSS voraus. Bei hoher Sensitivität (80%) ist die Wahrscheinlichkeit der Voraussage der TSS relativ gering. Bei niedriger Sensitivität (35%), mit hoher Spezifität, ist die Wahrscheinlichkeit wesentlich größer. Des Weiteren wurde das Programm ‚PROMOTER SCAN‘ (3.1.7.) genutzt, welches Promoterregionen, basierend auf Vergleichen mit eukariontischen Pol II-Promotorsequenzen vorhersagt (Prestidge, 1995). Die Sequenzen werden auf bekannte Transkriptionselemente untersucht, die normalerweise mit der Pol II-Promotorregion assoziiert sind. Je höher der ‚Score‘, desto sicherer sind die identifizierten Transkriptionselemente. Bei einem ‚Promoter cutoff‘ von 53.00 werden 70% der Promotorregionen richtig erkannt, höhere ‚Score‘-Werte werden als „wahrscheinlich“ angenommen.

4.1.1. Genstruktur der Bradykinin B₁-Rezeptoren

4.1.1.1. Sequenzvergleiche der B₁-Rezeptorbasenpaarfolgen

4.1.1.1.1. Sequenzvergleiche der Rattensequenzen

Zur Erstellung der B₁R-Sequenz der Ratte wurden die Sequenzen, die in Tab. 4.1 zusammengefasst sind, verwendet. Der Vergleich von U66106 und AF114406 identifizierte eine Promotorregion, die 265bp umfasst (Tab. 4.1; Abb. 4.1), da die Sequenz und Länge von Exon 1 (107bp) von AF114406 übernommen werden konnten. Ein Vergleich von AF114406 und U66107 ergab ein 1126bp langes Intron 1, an das sich Exon 2 (1065bp) anschließt. Die Vergleiche (Abb. 4.1) ergaben die B₁R-Sequenz der Ratte mit 2 Exons, schematisch dargestellt in Abb. 4.4 (Basenfolge siehe Anlage 1).

Nr.	Zugangsnummer	Darstellungsform und Inhalt	Länge	Referenz
1	AF114406	DNA; Promotorregion, Exon 1, Anfang Exon 2	1494bp	Shanstra <i>et al.</i> , 1998
2	U66106	DNA; Promotorregion	276bp	Ni <i>et al.</i> , 1998
3	U66107	mRNA; kodierender Bereich	1162bp	Ni <i>et al.</i> , 1998

Tab. 4.1 Zusammenfassung der Sequenzen aus der Genbank des NCBI, die zur Erstellung der Exon-Intron-Struktur des B₁R der Ratte verwendet wurden. Es sind Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen und deren Referenz aufgezeigt, ebenso Darstellungsform, Länge und Inhalt.

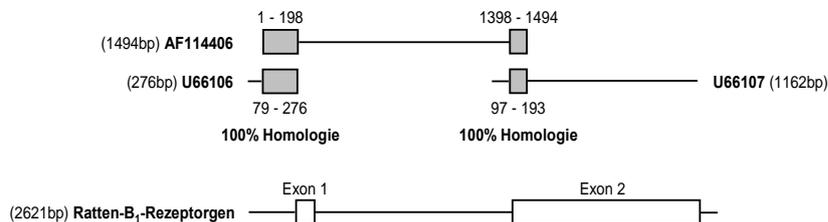


Abb. 4.1 Vergleiche der Sequenzen aus Tab. 4.1 zur Erstellung der B₁R-Genstruktur der Ratte. Die homologen Bereiche sind als graue Rechtecke mit Angabe der Lage dargestellt. Für die untereinander stehenden Sequenzen wurde Homologie gefunden. Die Positionsangabe gehört zur darüber bzw. darunter dargestellten Sequenz.

4.1.1.1.2. Sequenzvergleiche der Mausequenzen

Zur Darstellung der murinen B₁R-Sequenz wurden die Sequenzen in Tab. 4.2 verwendet, ebenso Homologievergleiche mit der Rattensequenz in Anlage 1. Mit Hilfe der Sequenz in Anlage 1 wurde ein Teil der genomischen DNA des Maus-Chromosoms 12 (NT_039553) identifiziert. Der Vergleich ergab eine 83%ige bzw. 89%tige Homologie, von Basenpaar 1695859 bis 1697560 (Abb. 4.2). Das entspricht der Promotorregion, Exon 1 und dem Anfang von Intron 1. Mit 90%iger Homologie spiegelt sich Exons 2 der Ratte von Basenpaar 1697154 bis 1698229 (NT_039553) wieder (Abb. 4.2). Die kodierende Sequenz des Maus-B₁R-Gens (U47281) fand sich 100%ig in der neu zusammen-

gestellten Sequenz des B₁R der Maus wieder. Es ergaben sich für die B₁R-Sequenz der Maus 2 Exons, die durch ein 946kb langes Intron getrennt werden (Anlage 2; Abb. 4.4).

Nr.	Zugangsnummer	Darstellungsform und Inhalt	Länge	Referenz
1	NT_039553	DNA; Chromosom 12 Maus	9866190bp	Waterston <i>et al.</i> , 2002
2	U47281	DNA; kodierender Bereich	1385bp	Pesquero <i>et al.</i> , 1996

Tab. 4.2 Zusammenfassung der Sequenzen aus der Genbank des NCBI, die zur Erstellung der Exon-Intron-Struktur des B₁R der Maus verwendet wurden. Es sind Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen und deren Referenz aufgezeigt, weiterhin Darstellungsform, Länge und Inhalt.

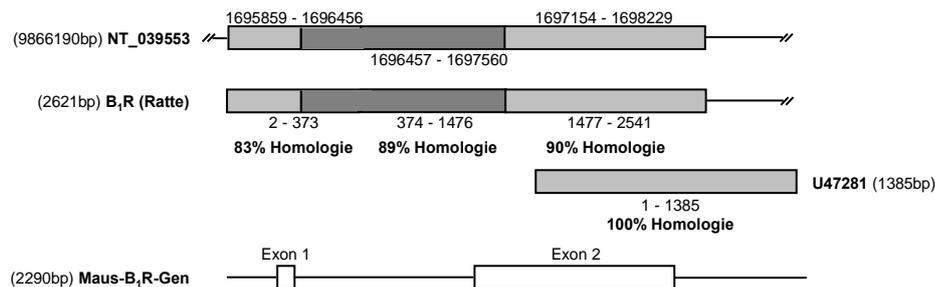


Abb. 4.2 Vergleiche der Sequenzen aus Tab. 4.2 und der Ratten-B₁R-Sequenz zur Ermittlung der B₁R-Sequenz der Maus. Die homologen Bereiche sind als graue Rechtecke mit Angabe der Lage dargestellt. Für die untereinander stehenden Sequenzen wurde Homologie gefunden. Die Positionsangabe gehört zur darüber bzw. darunter dargestellten Sequenz.

4.1.1.1.3. Sequenzvergleiche der humanen Sequenzen

Für die Sequenz des humanen B₁R mussten die Sequenzen in Tab. 4.3 analysiert werden. AL355102 (Teil von Chromosom 14), verglichen mit U48827, identifizierte die Promotorregion und Exon 1 (96%ige Homologie) von Basenpaar 46948 bis 48895 bzw. 1 bis 1952 (U48827). Die Gegenüberstellung von AL355102 und U48231 führte zu Exon 2 und 3 (96%ige Homologie) von Basenpaar 37610 bis 40938 (U48231). Der kodierende Bereich wurde durch Vergleich von AL355102 und U22346 (99%ige Homologie) ermittelt (Abb. 4.3). Zusammengefasst ergab sich die Sequenz des humanen B₁R mit 3 Exons (Anlage 3; Abb. 4.4).

Nr.	Zugangsnummer	Darstellungsform und Inhalt	Länge	Referenz
1	AL355102	DNA; Chromosom 14 Mensch	14018353bp	Heilig <i>et al.</i> , 2001
2	U48827	DNA; Promotorregion, Exon 1	1955bp	Yang und Polgar, 1996
3	U48231	DNA; Exon 2, Exon 3, kodierender Bereich	3332bp	Bachvarow <i>et al.</i> , 1996
4	U22346	DNA; Exon 3, kodierender Bereich	4168bp	Yang und Polgar, 1996

Tab. 4.3 Zusammenfassung der Sequenzen aus der Genbank des NCBI, die zur Erstellung der Exon-Intron-Struktur des humanen B₁R verwendet wurden. Es sind die Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen und deren Referenz aufgezeigt, ebenso Darstellungsform, Länge und Inhalt.

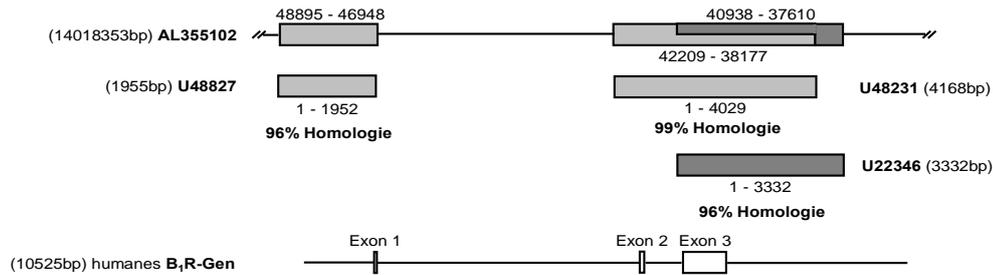


Abb. 4.3 Ermittlung der humanen B_1R -Genstruktur durch Vergleiche der Sequenzen in Tab. 4.3. Die homologen Bereiche sind als graue Rechtecke mit Angabe der Lage dargestellt. Für die untereinander stehenden Sequenzen wurde Homologie gefunden. Die Positionsangabe gehört zur direkt darüber bzw. darunter dargestellten Sequenz. Die dunkelgrau dargestellten Boxen zeigen den Vergleich der Sequenzen AL355102 und U22346.

4.1.1.1.4. Gegenüberstellung der Sequenzen von Ratte, Maus und Mensch

Stellt man die Sequenzen des B_1R von Mensch, Ratte und Maus gegenüber (Abb. 4.4), zeigt sich ein analoger Aufbau bei Ratte und Maus. Das B_1R -Gen der Ratte überspannt 2621bp, das der Maus 2290bp. Beide Spezies weisen zwei Exons (106bp; 1065bp bzw. 92bp; 1059bp) mit ähnlicher Länge auf. Auch die Introns (1126bp bzw. 946bp) haben ähnliche Längen. Im Gegensatz dazu überspannt die humane Sequenz 10498bp mit drei Exons (79bp, 119bp, 1086bp), welche durch 6556bp bzw. 900bp voneinander getrennt werden. Der Vergleich des humanen Exon 1 bzw. Exon 2 mit dem Exon 1 von Maus und Ratte zeigt keine Homologie. Aber das humane Exon 2 und deren Umgebung ist homolog (84%) zur humanen Sequenz HSU14567, die ein *Alu-J*-Element beinhaltet. Die Gene aller drei Spezies beinhalten eine Promotorregion vor Exon 1.

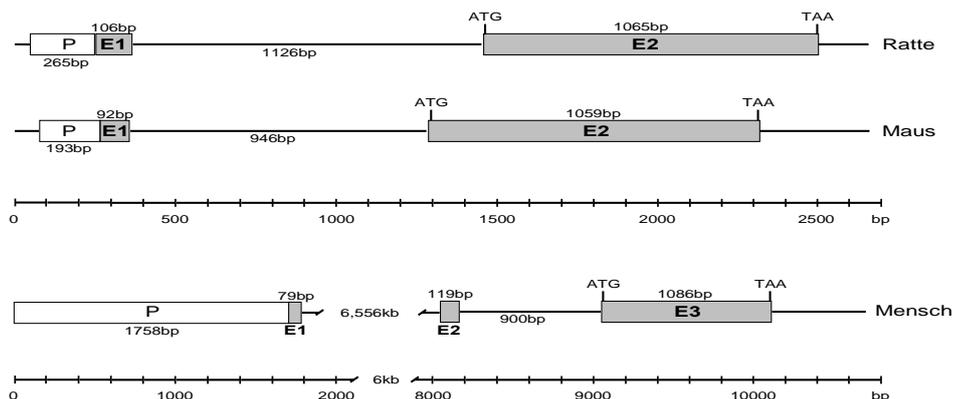


Abb. 4.4 Darstellung der Genstruktur der B_1R von Ratte, Maus und Mensch. Die Exons sind als grau ausgefüllte Rechtecke dargestellt, die Introns bzw. die 5'- und 3'-flankierende Regionen als dünne Linien. Die weißen Rechtecke zeigen die bekannte Promotorregionen der Gene.

4.1.1.2. Analyse des Ratten- B_1R -Rezeptorgens auf weitere Promotoren

Zur Ermittlung weiterer möglicher Promotoren im B_1R -Gen wurde aus linken Ventrikeln von Ratten, sechs Tage nach Induktion eines Herzinfarktes, RNA gewonnen, da laut

Literatur der B_1R nicht basal im Herzen exprimiert wird (Aiguo *et al.*, 1998). Die RNA (3.2.1.) wurde zur Identifizierung der 5'-Enden der B_1R -RNA durch 5'-RACE (3.2.3.) verwendet. Zur Überprüfung von Qualität und Reinheit der Proben wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die sichtbar gemachten Banden (28S und 18S) der ribosomalen DNA waren deutlich zu erkennen (Abb. 4.5).

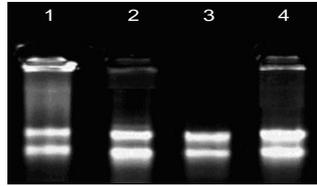


Abb. 4.5 Aufgereinigte RNA-Proben von Rattenherzen auf einem Agarosegel aufgetragen. 1 und 2 – RNA nicht-infarzierter Herzen; 3 und 4 – mit Myokardinfarkt, 6 Tage nach Infarkt entnommen.

Zur Identifizierung der 5'-cDNA wurde die RNA in einer 5'-RACE (3.2.3.) eingesetzt. Zur Amplifizierung der 5'-Enden der B_1R -mRNA wurde die 5'-cDNA und die genspezifischen 3'-Primer MMB12 in der ersten und B1N3 in der ‚nested‘-PCR (2.3.) eingesetzt. Die genspezifischen Primer liegen im Exon 2 und wurden anhand Anlage 1 konstruiert. Als 5'-Primer wurden die Primer UMP bzw. NUP (2.3.) des Amplifizierungskits verwendet. Um die Spezifität der Banden zu prüfen, wurden die jeweiligen Primer der entsprechenden PCR, unter gleichen Bedingungen, einzeln verwendet. Die Banden der ‚nested‘-PCR (Abb. 4.6 B, mit Pfeil markiert) wurden dann aus einem präparativen Gel isoliert und zur Klonierung der B_1R -Fragmente eingesetzt (3.1.1.). Die generierten Fragmente A und B waren ≈ 310 bp und ≈ 270 bp lang.

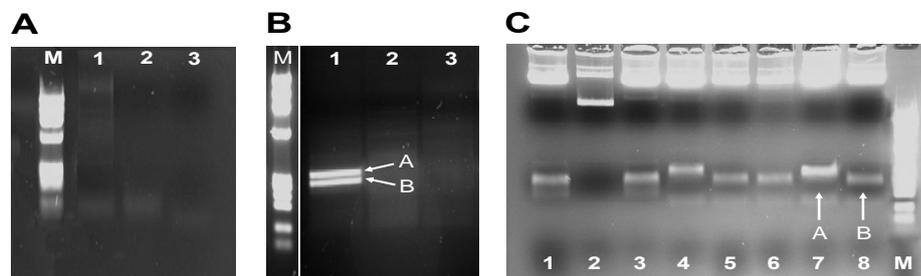


Abb. 4.6 Identifizierung von möglichen B_1R -5'-Enden. A. 1. Bande nach 5'-RACE-PCR. 1 – Primer UMP und Primer MMB12; 2 – Primer UMP und H_2O ; 3 – Primer MMB12 und H_2O . B. Banden der ‚nested‘-PCR. Die Fragmente A und B wurden zur Klonierung eingesetzt. 1 – Primer NUP und Primer BIN3; 2 – Primer NUP und H_2O ; 3 – Primer BIN3 und H_2O . C. Überprüfung der Klonierung mit Sac II und Not I. Die Klone 7 und 8 wurden sequenziert. 1, 3, 5, 6 und 8 – Klone des Fragmentes A; 4 und 7 – Klone des Fragmentes B. M – Φ -Marker (Anlage 23).

Die Fragmente wurden durch Ligation (3.1.2.) in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert und ins Bakterium *E.coli DH5 α* transformiert (3.1.3.). Von den weißen Kolonien wurden 8 gepickt, als Mini aufgearbeitet (3.1.4.) und zur Kontrolle mit dem Restriktionsenzymen (RE) Sac II und Not I verdaut (Abb. 4.6 C). Der Kontrollverdau ergab bei Klon 7 eine Bande von ≈ 270 bp und bei Klon 8 eine Bande von ≈ 310 bp. Mini 7 und Mini 8 wurden repräsentativ sequenziert.

Die T-Vektorenden begrenzten jeweils das klonierte Fragment. Die Sequenzierung der Mini 7 (Abb. 4.7 A) ergab ein Fragment aus 268bp, was dem Kontrollverdau (Abb. 4.6 C)

und dem RACE-PCR-Fragment A (Abb. 4.6 B) entsprach. Der Primer B1N3, 88bp von Exon 1 und 150bp von Exons 2 wurden wiedergefunden. Auch der Primer NUP bzw. das Smart II A-Oligonukleotid der 5'-RACE (2.3.) wurden identifiziert. Die Sequenzierung der Mini 8 (Abb. 4.7 B) ergab ein Fragment mit 309bp, was dem Kontrollverlauf (Abb. 4.6 C) und dem RACE-PCR-Fragment B (Abb. 4.6 B) entsprach. Die Primer B1N3 und NUP bzw. das Smart II A-Oligonukleotid der 5'-RACE (2.3.), 88bp von Exon 1 und 191bp von Exon 2 wurden gefunden. Beide Minis zeigen bei Exon 1 keine Unterschiede, jedoch bei Exon 2. Mini 7 fehlen 41bp am Anfang des Exon 2. Beide Fragmente wurden an der gleichen 5'-Spleißstelle (Donor) aber an verschiedenen 3'-Spleißstellen (Akzeptor) zusammengeführt (Anlage 1).

A

```

-----NUP-----
TAGTGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGAGCTGCCCCAGGACAGAAACCTCCCAAGACAGCAGTCACCATCAAAAGCAC
AGGTGAAGCTGTGAGCTCTTTGCTTTTCTATCCGGGTCACCTGTGGATGGCGTCCGAGGTCTTGTGGAGCTCCAGCCCTCTAACCGAAGCC
-----B1N3-----
TGCAGGCCCTGCCCAACATTACCTCCTGCGAGAGTGCCCTAGAAGACTGGGACCTGCTGTATCGGGTGCTGCCAGGGTTCGTCATCACTAT
---
CTGAATCCCG

```

B

```

-----NUP-----
TAGTGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGAGCTGCCCCAGGACAGAAACCTCCCAAGACAGCAGTCACCATCAAAAGCAC
AGGTGAAGCTGTGAGCTCTTTGCTTTTCTATCCGGGACCACAGCTGGATTTGATCTCCTGTACTGTGTCAACGTCAGGTCACCTGTGGATGGC
GTCCGAGGTCTTGTGGAGCTCCAGCCCTCTAACCGAAGCTGCGAGGCCCTGCCAACATTACCTCCTGCGAGAGTGCCCTAGAAGACTGG
-----B1N3-----
GACCTGCTGTATCGGGTGCTGCCAGGGTTCGTCATCACTATCTGAATCCCG

```

Abb. 4.7 Ergebnis der Sequenzierungen. A. Mini 7 mit Fragment B. B. Mini 8 mit Fragment A. Fettgedruckt – Primer; hellgrau unterlegt – Smart II A-Oligonukleotid; doppelt unterstrichen – Teil des Exons 2; punktiert unterstrichen – Enden des T-Vektors.

Die RACE-Analyse deutete auf keinen weiteren Promotor vor Exon 2. Um dies zu bestätigen wurde die Sequenz der Ratte (Anlage 1) auf Promotoren und Transkriptionsstartpunkte (TSS) untersucht. Mit dem ‚Neural Network Promoter‘ (3.1.7.) ergaben sich 2 mögliche Promotoren mit entsprechenden TSS. Der ‚Score cutoff‘ lag bei 0,98, was eine hohe, aber nicht die höchste Vorhersagewahrscheinlichkeit darstellt. Eine der Regionen befand sich vor Exon 1, die zweite ‚downstream‘ von Exon 2 (Abb. 4.8 A, Anlage 18). Das Programm ‚HCtata‘ (3.1.7.) konnte 12 mögliche TATA-Boxen identifizieren (Abb. 4.8 B, Anlage 18). Der ‚DRAGON GC+ Promoter FINDER‘ (3.1.7.) entdeckte mit hoher Sensitivität 4 TSS auf dem ‚forward strand‘ und 5 auf dem ‚reverse complement strand‘. Bei geringer Sensitivität (hoher Spezifität) wurden keine TSS ermittelt (Abb. 4.8 C, Anlage 18). Das ‚PROMOTOR SCAN‘-Programm (3.1.7.) erkannte vor Exon 1 eine Promotorregion mit einem ‚Score‘ von 56,45. Bei diesem ‚Score‘ wird die identifizierte Region als relativ wahrscheinlich angenommen. Außerdem identifizierte es dort eine TATA-Box und einen TSS. Des Weiteren wurden die TF: NF-S, INF.1, Sp1 und AP-1 erkannt (Abb. 4.8 D, Anlage 18). Nur vor Exon 1, der bekannten Promotorregion, fanden alle Programme Promotorelemente bzw. TSS. Dort wurden auch alle identifizierten TF-Bindungsstellen zugeordnet (Anlage 18). Vor Exon 2 wurden ebenfalls mögliche TATA-Boxen gefunden, jedoch keine TSS und TF-Bindungsstellen (Anlage 18).

A

Berkeley Drosophila Genome Project Neural Network Promoter Prediction

This server runs the 1999 NNPP version 2.2 (March 1999) of the promoter predictor.

Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80
(transcription start shown in larger font):
Promoter predictions for seq0 :

Start	End	Score	Promoter Sequence
248	298	0.98	AGAGGtGGTTTATTTAAGACCAGCCAGCGTGTGCCAGGG A GCtGCCCA
2527	2577	0.98	CTGGGAGCTTTATAAATGATGCAACCGAAGCCTCATGC C CATGTGGCC

C

DRAGON GC+ PROMOTER FINDER

version 1.0

Sequence name: This seq is converted from Plain Sequence Format
Sequence length: 2704
of bases: A=605, C=719, G=670, T=710
Expected TSS sensitivity: 80%

Predicted positions relative to the 5' end of the input sequence
TSS (red)

Forward strand	Reverse complement strand
185	-2510
1112	-2088
2322	-1792
2565	-1687
# of TSS guesses = 4	-1061
	# of TSS guesses = 5

B

TOOLS FOR PREDICTION AND ANALYSIS OF PROTEIN-CODING GENE STRUCTURE

HCtata: Hamming-Clustering Method for TATA Signal Prediction in Eukaryotic Genes

tatta		tatta	
POSITION	PATTERN	POSITION	PATTERN
143	TCTATCCCTA	1380	GGTATGTGTC
693	GGTTTAACAA	1420	GAATAAATA
764	ACTATATAGA	1614	CCTAGAAGAC
894	TGTATGTAGG	2208	GCTATCATCT
1085	CTTTTAACT	2224	ACTATCACAT
1249	CCAATAAAAC	2537	TTTATAAATG

D

BioInformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS)

NEW: WWW Promoter Scan NEW

Promoter region predicted on forward strand in 37 to 287
Promoter Score: 56.45 (Promoter Cutoff = 53.000000)
TATA found at 257,
Est.TSS = 287

Name	TFD #	Strand	Location	Weight
NF-S	S02003	+	95	1.019000
INF-1	S01182	+	194	1.044000
Sp-1	S01542	-	177	3.508000
AP-1	S01430	+	232	11.474000

Abb. 4.8 Ergebnisse der computergestützten Promotoranalyse der B₁R-Sequenz der Ratte in Anlage 1. A. ,Neural Network Promoter Prediction'-Programm des Berkeley Drosophila Genome Project. B. ,HCtata'-Programm. C. ,DRAGON GC+PROMOTER FINDER'-Programm. D. ,Promoter Scan'-Programm der BioInformatics & Molecular Analysis Section.

4.1.1.3. Analyse des alternativen Spleißens im B₁-Rezeptorgen

4.1.1.3.1. Design der Sonde

Da die 5'-Race zwei unterschiedliche Spleißvarianten identifizierte, wurde für weitere Untersuchungen eine RPA-,Antisense'-Sonde (3.2.4.) anhand der B₁R-Sequenz der Ratte in Anlage 1 festgelegt, mit der beide einzeln erfasst werden konnten. Der Primer B1N5 wurde in Exon 1 und der Primer B1N3 in Exon 2 gelegt. Die Sonde beinhaltet die letzten 65bp von Exon 1 und die ersten 192bp von Exon 2 (Abb. 4.9). Sie ist vom T7-Transkriptionsstart bis zur RE-Schnittstelle (Spe I) 309bp groß, erfasst die möglichen ,Spleißvarianten' und deren eventuelle separate Regulation (Abb. 4.9). Es wurden zwei Fragmente erwartet, eines mit 257bp, was die letzten 65bp von Exon 1 und die ersten 192bp von Exon 2 überspannt und eines, nur mit den ersten 151bp von Exon 2. Ein drittes Fragment (erwartetes Fragment, Abb. 4.9), was auf eine andere ,splice acceptor site' deuten würde, wurde anhand der 5'-RACE-Analysen nicht erwartet und könnte auch nicht erfasst werden, da es von den Banden des ,house keeping'-Gen überlagert wäre. Zur Generierung der Sonde wurde aus Ventrikeln RNA extrahiert (3.2.1.), cDNA hergestellt (3.2.2.) und diese mit den Primern B1N3 und B1N5 (2.3.; Anlage 1) amplifiziert (3.1.8.1.). Die markierte Bande (Abb. 4.10 A) wurde eluiert und zur Klonierung (3.1.1.) verwendet. Zur Kontrolle wurde die Mini mit Sac I und Sac II verdaut (4.10 B). Da die Fragmente der erwarteten Größe entsprachen, wurde aus der Mini eine Maxi aufgearbeitet (3.1.4.) und anschließend sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis (Abb. 4.10 D) war 100% mit den B₁R-Exon-Sequenzen der Ratte identisch (erwartetes Fragment 1, Abb. 4.9), die Sequenzen der Primer B1N5 und B1N3 flankierend

identifiziert und die Maxi als RNB1 bezeichnet. Die Maxi wurde mit Not I und Spe I linearisiert (Abb. 4.10 C), markiert und im RPA (3.2.4.) eingesetzt.

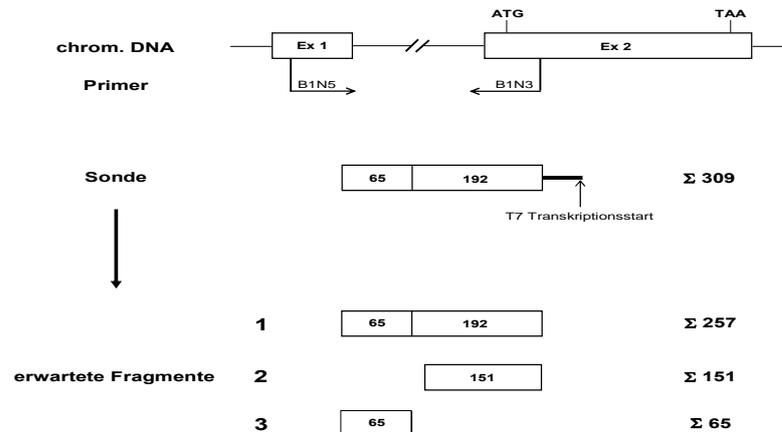


Abb. 4.9 Design der B_1R -, Antisense'-RPA-Sonde anhand der unter 4.1.1. zusammengestellten Sequenz der Ratte, die in Anlage 1 dargestellt ist. ATG – Startcodon; TAA – Stoppcodon; Ex – Exon.

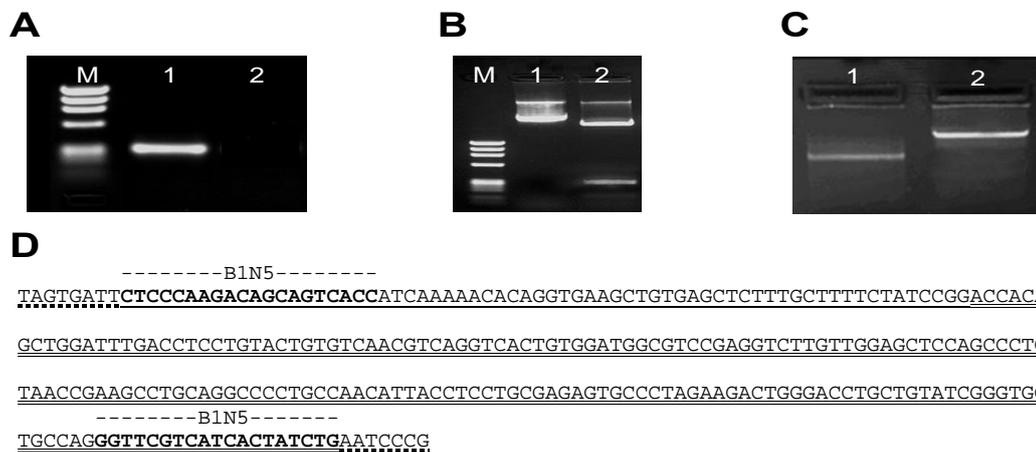


Abb. 4.10 Generierung der B_1R -RPA-Sonde der Ratte. A. Bande nach PCR kardialer cDNA mit den Primern BIN5 und BIN3. M – Φ -Marker (Anlage 23); 1 – PCR-Produkt mit Primern BIN5 und BIN3; 2 – negativ Kontrolle ohne DNA. B. Kontrollverdau der Mini mit Sac I und Sac II. M – Φ -Marker (Anlage 23); 1 – Mini unverdaut; 2 – Mini verdaut mit Sac I und Sac II. C. Linearisierung der Maxi. 1 – Maxi verdaut mit Not I und Spe I; 2 – unverdaute Maxi. D. Sequenzierungsergebnis der Maxi. Fettgedruckt – Primer; einfach unterstrichen – Exon 1; doppelt unterstrichen – Exon 2; punktiert unterstrichen – Enden des T-Vektors.

4.1.1.3.2. Alternatives Spleißen des B_1 -Rezeptorgens im Herzen

Aus Rattenventrikeln wurde RNA isoliert (3.2.1.) und mit der Sonde (Abb. 4.9) im RPA (3.2.4.) analysiert. Die in der Literatur ermittelten Spleißstellen wurden bestätigt (Abb. 4.11A). Es wurden die 257bp-Bande (65bp von Exon 1 und 192bp von Exon 2) und die 151bp-Bande (Exon 2) im Herzen von Ratten gefunden (Abb. 4.11B). Die Größen wurden anhand der Sonden (B_1R : 309bp; GAPDH: 197bp) und protektierten Bande der GAPDH-Sonde (80bp) abgeschätzt. Beide Isoformen entsprachen den isolierten 5'-RACE-Fragmenten (Mini 7, Abb. 4.7 A; Mini 8, Abb. 4.7 B). Die RPA-Analyse zeigte

unter basalen Bedingungen eine unterschiedliche Regulation beider Spleißvarianten, die 151bp-Bande war dominanter (3-mal, abgeschätzt anhand von Abb. 4.32, 4.35). Unter diabetischen Bedingungen wurden beide Banden gleich hochreguliert (2-mal, abgeschätzt anhand von Abb. 4.32, 4.35). Bei Scheinoperation und unter Infarkt-Bedingungen war die 257bp-Bande dominanter (2-6-mal, abgeschätzt anhand von Abb. 4.43, 4.59, 4.72, 4.80). Bei abdominalem Aortenbanding wurden die Transkripte gleich reguliert (Abb. 4.29).

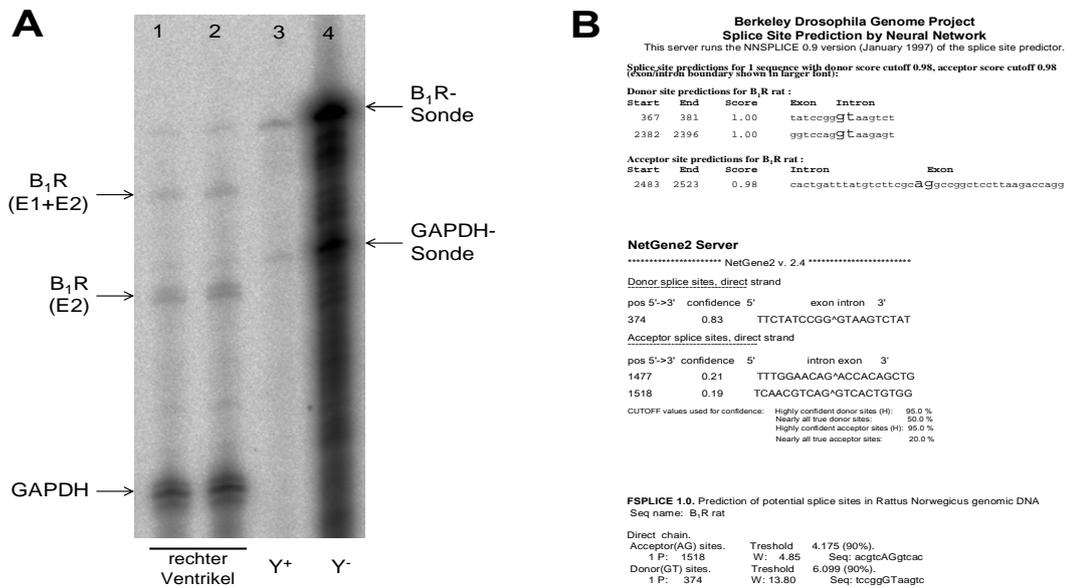


Abb. 4.11 Analyse alternativer Transkripte des B₁R-Gens. A. Die Ergebnisse der Spleißstellenvorhersage von Anlage 1 mit den Programmen ‚Neural Network Splice site Prediction‘-Programm, ‚NetGene2‘-Programm und dem ‚FSPLICE‘-Programm. B. B₁R-Splicevarianten im Herzen von Ratten mit der B₁R-Sonde (Abb.4.9; 4.1.1.3.1). Als interne Kontrolle wurde Hefe-mRNA genutzt, mit und ohne RNase inkubiert, als Positivkontrolle GAPDH. E1 – Exon 1; E2 – Exon 2; Y⁺ – Hefe-mRNA mit RNase; Y⁻ – Hefe-mRNA ohne RNase.

4.1.1.4. Schematische Darstellung der Genstruktur des B₁-Rezeptors

Die B₁R-Sequenzanalysen (4.1.1.) ergaben bei der Ratte zwei Exons (107bp; 1065bp), von denen der Anfang von Exon 2 (41bp) vor dem Translationsstart alternativ gespleißt werden kann. Die zwei ermittelten Transkripte beinhalten Exon 1 (Abb. 4.12). Der kodierende Bereich des Gens befindet sich in Exon 2 und überspannt 1017bp. Es konnte nur der bekannte Promotor vor Exon 1 ermittelt werden (4.1.1.2.).

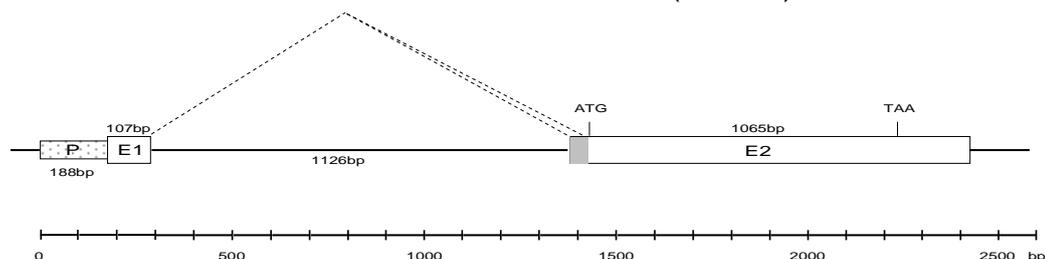


Abb. 4.12 Schematische Darstellung des Ratten-B₁R-Gens. Der alternative Anfang von Exon 2 ist grau gefüllt. ATG – Translationsstart; TAA – Translationsstop; P – Promotor; E1/ E2 – Exon1/2.

4.1.2. Genstruktur der Bradykinin B₂-Rezeptoren

4.1.2.1. Sequenzvergleiche der B₂-Rezeptorbasenpaarfolgen

4.1.2.1.1. Sequenzvergleiche der Rattensequenzen

Der Vergleich von X80187 und AF374005 zeigte eine 100%ige Homologie von Basenpaar 1 bis 1224 (X18087) (Abb. 4.13) und legt so die Promotorregion und Exon1 (1111bp) fest. X80188 zeigt Exon 2 (104bp) und X80189 Exon 3 (210bp). X80190 spiegelt Exon 4 mit 3712bp wieder. Durch den Vergleich von X80190 und M59967 wurde der kodierende Bereich (290 bis 1444) identifiziert (99%iger Homologie) (Abb. 4.13). Intron 1 (ca. 25kb), Intron 2 (1,8kb) und Intron 3 (0,8kb) wurden von Pesquero *et al.* (1994) übernommen, da keine Sequenz von Chromosom 6 der Ratte zu finden war. Die schematisch dargestellte Sequenz ist in Abb. 4.16 (Basenpaarfolge: Anlage 4) gezeigt.

Nr.	Zugangsnummer	Darstellungsform und Inhalt	Länge	Referenz
1	X80187	DNA; Promotorregion, Exon 1	1460bp	Bader, 1997
2	X80188	DNA; Exon 2	679bp	Bader, 1997
3	X80189	DNA; Exon 3	312bp	Bader, 1997
4	X80190	DNA; Exon 4	4136bp	Bader, 1997
5	M59967	mRNA; kodierender Bereich	4111bp	McEachern <i>et al.</i> , 1994
6	AF374005	DNA; Promotorregion	4642bp	Baptisda <i>et al.</i> , 2001

Tab. 4.4 Zusammenfassung der Sequenzen aus der Genbank des NCBI zur Erstellung der Exon-Intron-Struktur des B₂R der Ratte. Es sind Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen und deren Referenz aufgezeigt, ebenso Darstellungsform, Länge und Inhalt.

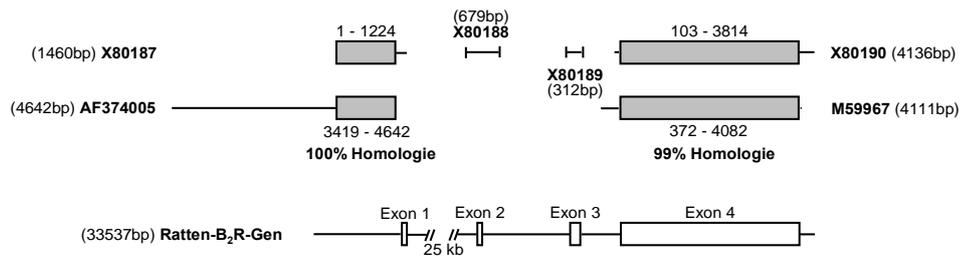


Abb. 4.13 Ermittlung der B₂R-Sequenz der Ratte durch Vergleiche der Sequenzen in Tab. 4.4. Die homologen Bereiche sind als graue Rechtecke mit Angabe der Lage dargestellt. Für die untereinander stehenden Sequenzen wurde Homologie gefunden. Die Positionsangabe gehört zur direkt darüber bzw. darunter dargestellten Sequenz.

4.1.2.1.2. Sequenzvergleiche der Mausequenz

Neben den Sequenzen in Tab. 4.5 wurde auch die Sequenz des B₂R der Ratte (Anlage 4) genutzt. Die Vergleiche der Sequenzen in Tab. 4.5, dem Promotor, Exon 3 und 4 (Anlage 4) identifizierten das B₂R-Gen der Maus zwischen 1651657 und 1688829. Vergleiche von NT_039553 und Exon 1 der Ratte zeigten ein 84% homologes Exon

(115bp). Exon 2 der Ratte führte zum murinen Exon (105bp; 82% homolog). Durch Exon 3 der Ratte wurde ein 225bp langes Exon (76% homolog) ermittelt. Die Gegenüberstellung mit Exon 4 der Ratte zeigte das murine Exon (3660bp; 81% homolog) auf dem chromosomalen Klon auf. Die Vergleiche zeigten auch Intron 1 (25187bp), Intron 2 (2579bp) und Intron 3 (472bp). AF411045 (80% homolog) und L27595 (95% homolog) bestätigten die Promotorregion und den kodierenden Bereich. Die zusammengestellte Sequenz des B₂R der Maus mit 4 Exons ist in Anlage 5 (Basenpaarfolge) und in Abb. 4.16 schematisch dargestellt.

Nr.	Zugangsnummer	Darstellungsform und Inhalt	Länge	Referenz
1	NT_039553	DNA; Chromosomen 12; Maus	9866190bp	Waterston <i>et al.</i> , 2002
2	AF411045	DNA; Promotorregion	1318bp	Saifudeen & El-Dahr, 2001
3	L27595	DNA; kodierender Bereich	8934bp	Ma <i>et al.</i> , 1995

Tab. 4.5 Zusammenfassung der Sequenzen aus der NCBI-Genbank, die zur Erstellung der Exon-Intron-Struktur des Maus-B₂R verwendet wurden. Es sind Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen und deren Referenz aufgezeigt, des Weiteren Darstellungsform, Länge und Inhalt.

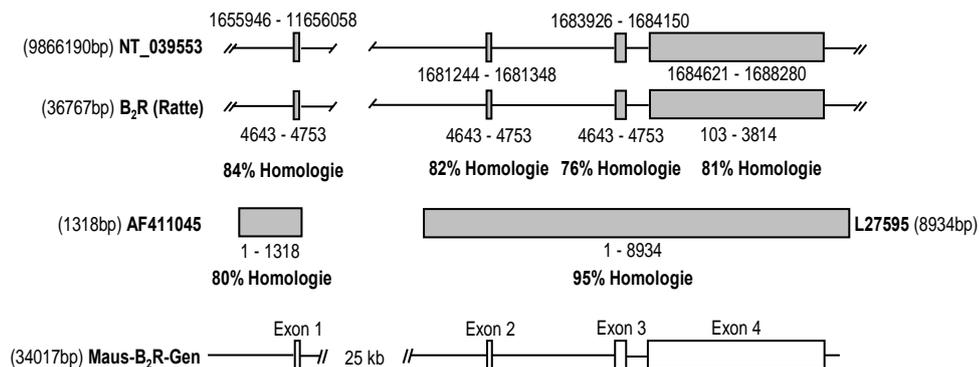


Abb. 4.14 Ermittlung der B₂R-Sequenz der Maus durch Vergleiche der Sequenzen in Tab. 4.5. Die homologen Bereiche sind als graue Rechtecke mit Angabe der Lage dargestellt. Die untereinander stehenden Sequenzen wurde Homologie gefunden. Die Positionsangabe gehört zur direkt darüber bzw. darunter dargestellten Sequenz.

4.1.2.1.3. Sequenzvergleiche der humanen Sequenzen

Es wurde die Sequenzen in Tab. 4.6 und Exon 3 von Ratte und Maus (Anlage 4 & 5) verglichen. AL355102 (99712 bis 98403) und X86173 (1 bis 1310) waren 99% homolog (Abb. 4.15) und zeigten Exon 1 (114bp) auf. Durch AL355102 und X86169 wurde Exon 2 (229bp; 99% homolog) festgelegt (Abb. 4.15). Zwischen Exon 1 und 2 wurde ein 31,876kb langes Intron ermittelt. Der Vergleich von AL355102 (63218 und 61000) mit NM_000623 und S56772 identifizierte Exon 3 (4093bp) mit dem kodierenden Bereich (1305bp; 89% homolog) (Abb. 4.15). Exon 2 und 3 werden durch ein 3150bp langes Intron getrennt. Der Vergleich von Exon 3 der Ratte und Maus (Anlage 4 & 5) ergab keinerlei Homologie. Das B₂R-Gen ist mit Basenfolge in Anlage 6 und schematisch in Abb. 4.16 dargestellt.

Nr.	Zugangsnummer	Darstellungsform und Inhalt	Länge	Referenz
1	AL355102	DNA; Chromosomen 14; Mensch	14018353bp	Heilig <i>et al.</i> , 2001
2	X86173	DNA; Promotorregion, Exon 1	1463bp	Kammerer <i>et al.</i> , 1996
3	X86169	DNA; Exon 2	229bp	Braun, 1997
4	S56772	DNA; kodierender Bereich	2478bp	Powell <i>et al.</i> , 1993
5	NM_000623	mRNA; kodierender Bereich	4267bp	Eggerickx <i>et al.</i> , 1999

Tab. 4.6 Aufstellung der Sequenzen aus der Genbank des NCBI, die zur Erstellung der Exon-Intron-Struktur des humanen B₂R verwendet wurden. Es sind Zugangsnummern der verwendeten Sequenzen und deren Referenz aufgezeigt, des Weiteren Darstellungsform, Länge und Inhalt.

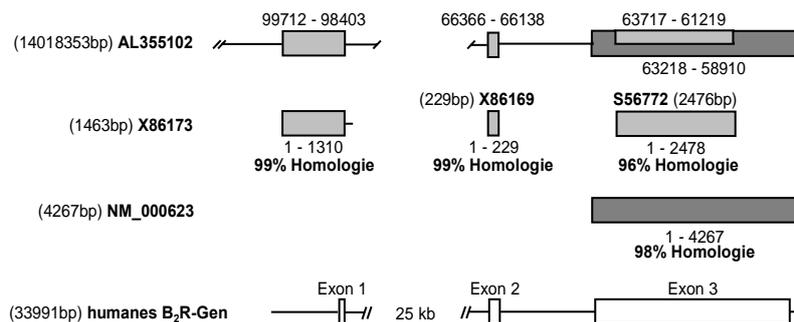


Abb. 4.15 Ermittlung der humanen B₂R-Sequenz durch Vergleiche der Sequenzen in Tab. 4.6. Die homologen Bereiche sind als graue Rechtecke mit Angabe der Lage dargestellt. Die untereinander stehenden Sequenzen wurde Homologie gefunden. Die Positionsangabe gehört zur direkt darüber bzw. darunter dargestellten Sequenz. Die dunkelgrauen Boxen zeigen den Vergleich der Sequenzen NM_000623 und AL355102.

4.1.2.1.4. Gegenüberstellung der Sequenzen von Ratte, Maus und Mensch

Ratte und Maus zeigten einen ähnlichen Aufbau des B₂R-Gens. Es wurden Exon 1 mit 111bp bzw. 118bp, Exon 2 mit 104bp, Exon 3 mit 210bp bzw. 235bp und Exon 4 mit 3712 bp gefunden.

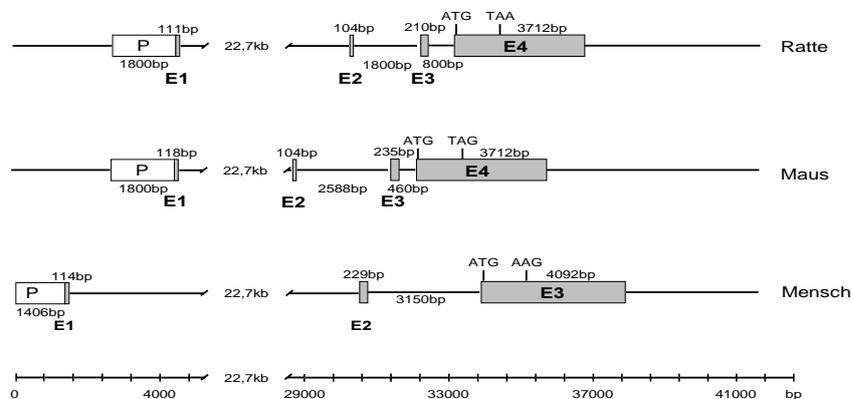


Abb. 4.16 Vergleich der Genstruktur des B₂R für Ratte, Maus und Mensch. Die Exons sind als ausgefüllte Rechtecke dargestellt, die Introns bzw. die 5'- und 3'-flankierende Regionen als dünne Linien.

Der kodierende Bereich (1155bp bzw. 1140bp) befindet sich auf Exon 4. Exon 1 und 2 werden durch ein 25kb langes Intron getrennt. Zwischen Exon 2 und Exon 3 fand sich ein 1800bp (Ratte), bzw. 2588bp (Maus) langes Intron. Exon 3 und Exon 4 liegen 800bp (Ratte) bzw. 460bp (Maus) voneinander entfernt. Im humanen B₂R-Gen konnten nur 3 Exons identifiziert werden. Exon 1 (114bp) liegt 31876bp von Exon 2 (229bp) entfernt, dieses 3150bp von Exon 3. Das Exon 3 von Ratte und Maus zeigten keine Homologie mit der humanen Sequenz.

4.1.2.2. Analyse des Ratten-B₂-Rezeptorgens auf weitere Promotoren

Zur Identifizierung von B₂R-RNA-Enden wurde aus linken Ventrikeln RNA der Ratte gewonnen (3.2.1.) und diese auf Qualität und Reinheit überprüft. Die Banden (28S; 18S) der ribosomalen DNA waren deutlich zu erkennen (Abb. 4.5). Zur Herstellung von 5'-cDNA wurden die Proben in einer 5'-RACE (3.2.3.) eingesetzt. Zur Amplifizierung der 5'-Enden wurden die genspezifischen 3'-Primern B2T3 (1. PCR) und B2N3 („nested“-PCR; 2.3.) verwendet. Die Primer liegen in Exon 4 und wurden anhand der Sequenz der Ratte (Anlage 4) entworfen. Als 5'-Primer wurden UMP bzw. NUP (2.3.) des Amplifizierungskits genutzt. Zur Überprüfung der Bandenspezifität wurden die jeweiligen Primer der entsprechenden PCR, unter den gleichen Bedingungen einzeln amplifiziert. Es wurde mit Hilfe der „nested“-PCR nur eine Bande amplifiziert (Bande A; Abb. 4.17 B), diese anschließend aus einem präparativen Gel isoliert und zur Klonierung des B₂R-Fragmentes eingesetzt (3.1.1.). Die Länge von Fragment A war ≈330bp.

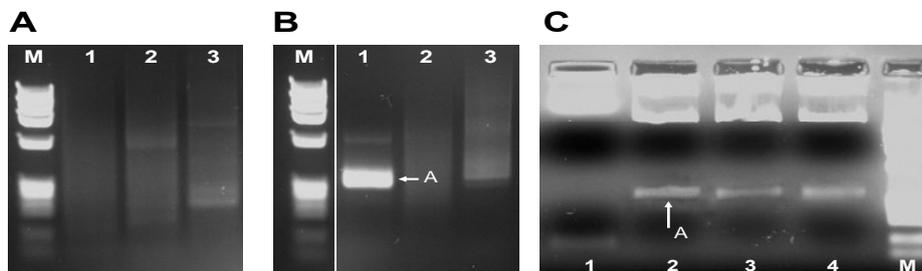


Abb. 4.17 Identifizierung von möglichen B₂R-Enden. A. 1. 5'-RACE-PCR. M – Φ -Marker (Anlage 23); 1 – Primer UMP und Primer B2T3; 2 – Primer UMP und H₂O; 3 – Primer B2T3 und H₂O. B. „nested“-PCR. Fragment A wurde zur Klonierung eingesetzt. M – Φ -Marker (Anlage 23); 1 – Primer NUP und Primer B2N3; 2 – Primer NUP und H₂O; 3 – Primer B2N3 und H₂O. C. Überprüfung der Klonierung. Der Klon 2 wurde sequenziert. 2, 3 und 4 – Klone des Fragmentes A

Das Fragment A wurde durch Ligation (3.1.2.) in den T-Vektor kloniert und in E.coli DH5 α transformiert (3.1.3.). Es wurden 4 weiße Kolonien gepickt und als Mini aufgearbeitet (3.1.4.). Die Sequenzierung von Mini 2 (Abb. 4.18 A) ergab ein Fragment von 328bp, was dem Kontrollverdau (Abb. 4.17 C) und RACE-PCR-Fragment (Abb. 4.17 B) entsprach. Die jeweiligen Enden des T-Vektors begrenzten das Fragment. Im Klon konnten der Primer NUP bzw. das Smart II A-Oligonukleotid der 5'-RACE (2.3.), Exon 1, Exon 2 und der Anfang von Exons 4 bis zum Primer B2N3 (75bp) wiedergefunden werden. Ein Fragment mit Exon 3 wurde nicht gefunden, könnte aber laut Literatur vorhanden sein.

```

-----NUP-----
TAGTGTATTTTCGTCACCATAGTTGCGTCTCATGAGGTCGAGGCTACGAGTCTCTCACTCATCATGACAACCCCTGCCGCACCGTCCGTCA
CGCATCGGGACCTGGCTCCCTGAGGGATGTTGTGTCTTGGCCGAGAGACTCTTTTCTGCTAGGAGTGAGCAGAAACAGGACTCATGTTTA
CGTGACAAGAACCTTCGCTGGGCACGAGGACAGGCACGTA CTGGGTACGGGTGGTGTGCGGAGAGACCCTAACTTTACAAGTTGTAGTGG
-----B2N3-----
TGC GTTAGGACCCAGACGAGTATTGCCCTGGAAAAGTCTCCAGTTGACCGGAATCCCG

```

Abb. 4.18 Ergebnis der Sequenzierung von Mini 2 mit Fragment A. Fettgedruckt – Primer; einfach unterstrichen – Exon 1; doppelt unterstrichen – Exon 2; gestrichelt unterstrichen – Teil des Exons 4; punktiert unterstrichen – Enden des T-Vektors.

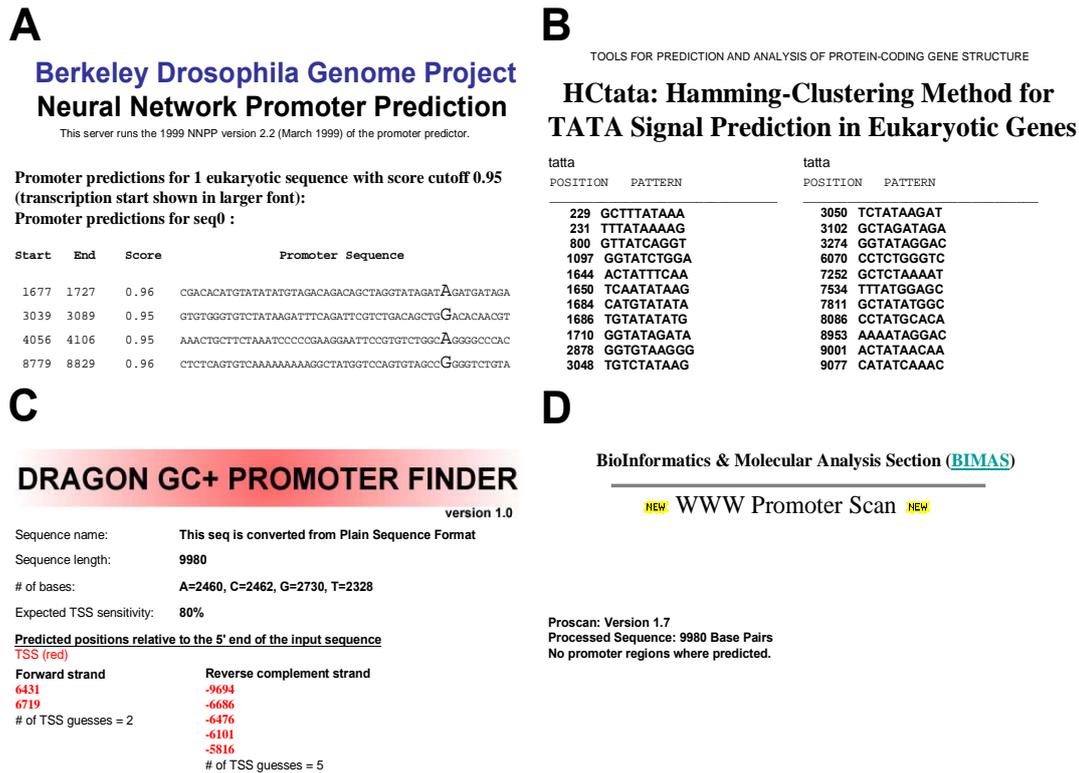


Abb. 4.19 Ergebnisse der computergestützten Promotoranalyse mit der Sequenz aus Anlage 4. A. ,Neural Network Promoter Prediction'-Programm des Berkeley Drosophila Genome Project. B. ,HCtata'-Programm. C. ,DRAGON GC+PROMOTER FINDER'-Programm. D. ,Promoter Scan'-Programm der BioInformatics & Molecular Analysis Section.

Die Sequenz der Ratte (Anlage 4) wurde auf weitere mögliche Promotoren analysiert. Das Neural Network Promoter Prediction-Programm fand dort 4 mögliche Promotorregionen mit entsprechenden TSS (3 vor Exon1) (Abb. 4.19 A; Anlage 19), jedoch nur mit einem ,Score' von 0,96 bzw. 0,95. Das ,HCtata'-Programm identifizieren in der Sequenz 22 mögliche TATA-Boxen (Abb. 4.19 B; Anlage 19). Der DRAGON GC+Promoter FINDER entdeckte bei sehr hoher Sensitivität zwei TSS in Leserichtung und fünf auf dem Komplementärstrang (Abb. 4.19 C; Anlage 19). Bei höherer Spezifität konnten jedoch keine TSS identifiziert werden. Das PROMOTOR SCAN-Programm erkannte keine Promotorregionen (Abb. 4.19 D; Anlage 19). Vor Exon 1 wurden mehrere Promotorregionen, TSS und TATA-Boxen gefunden (Anlage 19), jedoch nicht mit der höchsten Vorhersagewahrscheinlichkeit.

4.1.2.3. Analyse des alternativen Spleißens im B₂-Rezeptorgen

4.1.2.3.1. Design der Sonde

Obwohl die 5'-RACE nur einen Transkriptionsstart und eine mRNA im 5'-untranslatierten Bereich des B₂R-Gens identifiziert hat, könnten weitere Spleißvarianten in anderen Organen oder zu anderen Zeitpunkten nicht ausgeschlossen werden. Die ‚Antisense‘-Sonde für den RPA (3.2.4.) wurde anhand der Sequenz aus Anlage 4 festgelegt und die Primer B2T5 in Intron 3, Primer B2T3 in Exon 4 gelegt. Die Sonde umfasst somit die letzten 53bp von Intron 3 und die ersten 221bp von Exon 4 und ist vom T7-Transkriptionsstart bis zur RE-Schnittstelle (Not I) 326bp groß. Da der Anfang der Sonde im postulierten Intronbereich liegt, kann dieser Teil mit dem RPA als Bande von 274bp (Fragment 1), nur nachgewiesen werden, wenn die RNA vor Exon 4 nach dem Spleißen als ebenfalls reife mRNA erhalten bleibt. Dazu müssen vor Exon 4 weitere Spleißakzeptorstellen oder ein Promotor zu finden sein. Ist der Bereich vor Exon 4 jedoch nur Intronbereich, wird dieser Teil in keiner reifen mRNA zu finden und somit nicht mit der RPA-Sonde detektierbar sein. Man erhält dann nur eine geschützte Bande von 221 bp. Mit dieser Sonde kann gleichzeitig auch die separate Regulation der möglichen Spleißvarianten erfasst werden.

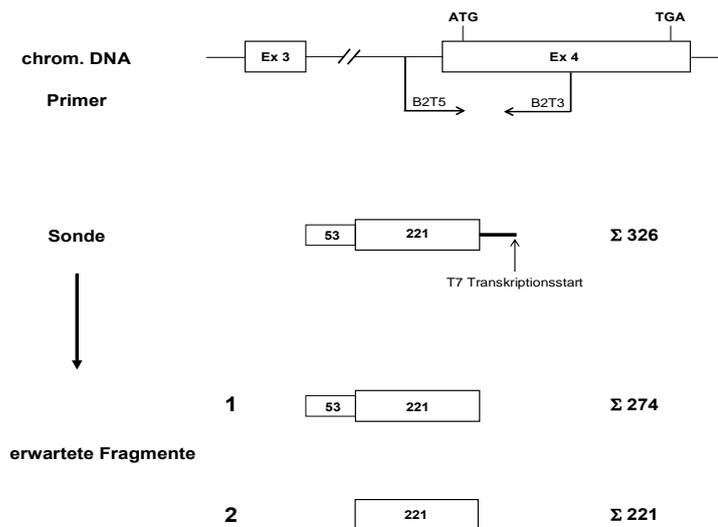


Abb. 4.20 Design der B₂R-, ‚Antisense‘-RPA-Sonde, anhand der unter 4.1.2.1. zusammengestellten und in Anlage 4 dargestellten Sequenz des B₂R der Ratte. ATG – Startcodon; TAA – Stopcodon; Ex – Exon.

Für die Sonde wurde aus Ventrikeln RNA extrahiert (3.2.1.), cDNA hergestellt und der interessierende Teil mit den Primern B2T5 und B2T3 (2.3.; Anlage 4) amplifiziert. Die Bande (Abb 4.21 A) wurde eluiert und zur Klonierung (3.1.1.) genutzt. Zur Kontrolle wurde die Mini mit Sac I und Sac II verdaut (4.21 B). Da das PCR-Fragment und das aus der Mini geschnittene Fragment etwa gleich waren, wurde aus der Mini eine Maxi aufgearbeitet (3.1.4.) und sequenziert. Diese (Abb. 4.21 D) deckte sich zu 100% mit der bereits publizierten Sequenz des B₂R-Gen und wurde als RNB2 bezeichnet. Die RNB2-Maxi wurde mit Not I und Pst I linearisiert (Abb. 4.21 C), markiert und im RPA eingesetzt.

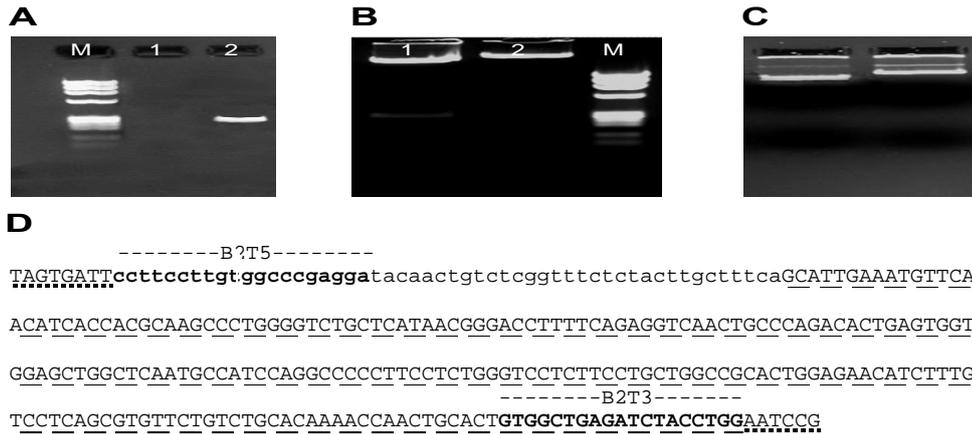


Abb. 4.21 Generierung der B₂R-RPA-Sonde für die Ratte. A. PCR kardialer cDNA mit den Primern B2T5 und B2T3. M – Φ-Marker (Anlage 23); 1 – H₂O; 2 – Primer B2T5 und B2T3. B. Kontrollverdau der B₂R-Sonde-Mini. M – Φ-Marker (Anlage 23); 1 – Mini verdaut mit Sac I und Sac II; 2 – Mini unverdaut. C. Linearisierung der B₂R-Maxi. 1 – Maxi verdaut mit Not I und Pst I; 2 – Maxi unverdaut. D. Sequenzierungsergebnis der Maxi. Fettgedruckt – Primer; gestrichelt unterstrichen – Exon 4; kleine Buchstaben – postulierte Intron 3; punktiert unterstrichen – Enden des T-Vektors.

4.1.2.3.2. Alternatives Spleißen des B₂-Rezeptorgens im Herzen

Aus Rattenventrikeln wurde RNA isoliert (3.2.1.) und mit der Sonde (Abb. 4.20) im RPA (3.2.4.) eingesetzt.

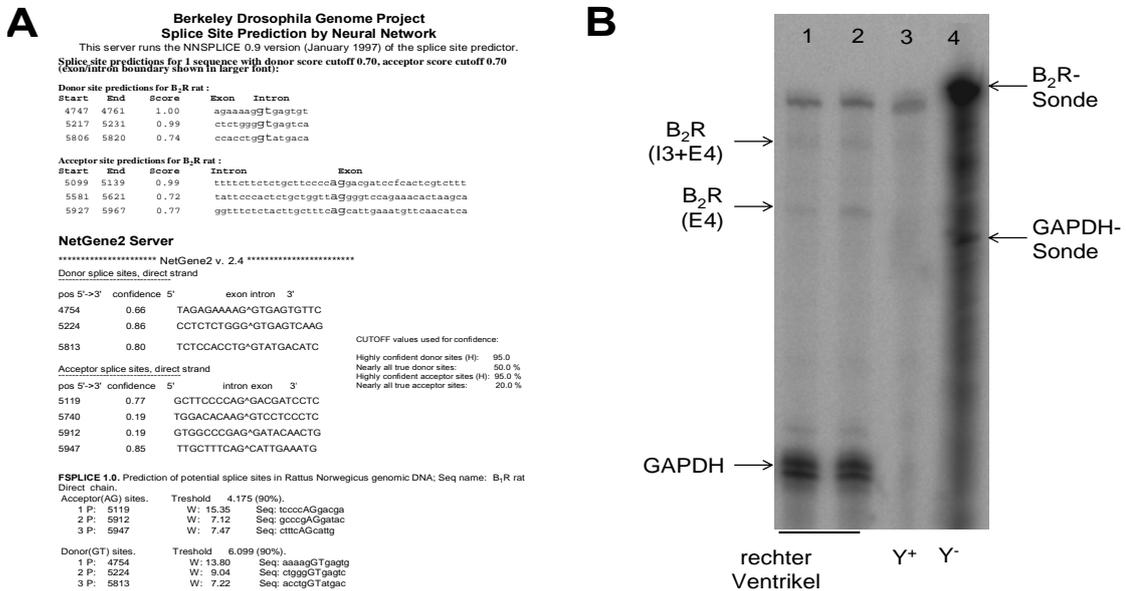


Abb. 4.22 Analyse alternativer Transkripte des B₂R-Gens. A. Analyse alternativ gespleißter B₂R-Isoformen im Ratten-Herzen. Für den RPA wurde die mRNA von rechten Ventrikeln der Ratte mit der 4.1.2.3.1. konstruierten Sonde inkubiert. Als interne Kontrollen wurde Hefe-mRNA ebenfalls mit der Sonde und zusätzlich mit und ohne RNase inkubiert. Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. I3 – Intron 3; E4 – Exon 4; Y⁺ – Hefe-mRNA mit RNase; Y⁻ – Hefe-mRNA ohne RNase. B. Die Ergebnisse der Spleißstellenvorhersage von Anlage 4 mit den Programmen ‚Neural Network Splice site Prediction‘-Programm, ‚NetGene2‘-Programm und dem ‚FSPLICE‘-Programm.

Mit dem RPA wurden zwei Fragmente nachgewiesen, die anhand der Sonden (B₂R: 326bp; GAPDH: 197bp) und der protektierten GAPDH-Bande (80bp) abgeschätzt wurden und den zwei erwarteten Fragmentgrößen entsprachen. Somit konnte gezeigt werden, dass ein Teil des 5'-Bereiches vor Exon 4 durch die RPA-Sonde geschützt wird und Teil der reifen mRNA ist. Die computergestützte Suche nach Spleißstellen bestätigte die gefundenen und identifizierte eine weitere Spleißakzeptorstelle vor Exon 4. Diese befindet sich im Primer B2T5 (5'-Ende der RPA-Sonde; Anlage 4). Da dort kein weiterer Promotor ermittelt werden konnte, gibt es wahrscheinlich eine weitere alternativ gespleißte Transkriptvariante, die aber mit der 5'-RACE nicht nachgewiesen werden konnte. Beide Isoformen wurden unterschiedlich reguliert (Abb. 4.22). Unter basalen Bedingungen wurde die 221bp-Bande ca. 4-mal stärker exprimiert und bleibt auch unter pathophysiologischen Bedingungen dominant. Unter diabetischen Bedingungen wurden beide Banden ca. 4-mal und unter Infarkt-Bedingungen 2-6-mal stärker exprimiert, je nach Untersuchungszeitpunkt (abgeschätzt anhand Abb. 4.45, 4.54, 4.73, 4.81).

4.1.2.4. Schematische Darstellung der Genstruktur des B₂-Rezeptors

Die Analysen (4.1.2.) und die Literaturrecherche ergaben vier Exons (111bp; 104bp; 210bp; 3712bp), von denen Exon 3 alternativ gespleißt wurde. Im Exon 4 befindet sich der komplette kodierende Bereich (1191bp). Mit Hilfe des RPA wurde ein 5'-verlängertes Exon 4 identifiziert, was nicht mit der 5'-RACE detektiert werden konnte (Abb. 4.18, 4.22). Da vor Exon 4 durch Computeranalyse eine weitere Spleißakzeptorstelle und neben dem bisher bekannten Promotor vor Exon 1 kein weiterer identifiziert werden konnte (Abb. 4.23), ist die 5'-verlängerte Exon 4-Transkriptvariante im Herzen der Ratte ein alternatives Transkript. Es bleibt aber ungeklärt, ob dieses Exon 3 enthält.

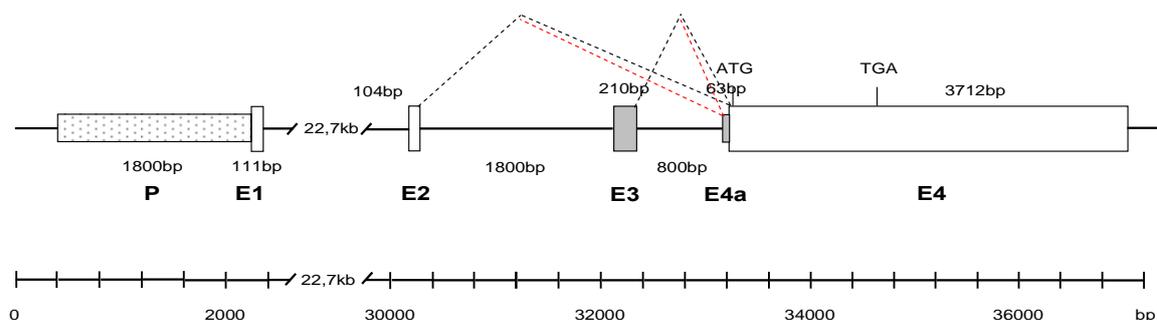


Abb. 4.23 Darstellung des B₂R-Gen der Ratte. Der alternativ gespleißten Teile des Gens sind grau gefüllt. Mögliche Spleißvarianten sind gestrichelt dargestellt. ATG – Translationsstart; TGA – Translationsstop; P – Promotor; E1 – Exon 1; E2 – Exon 2; E3 – Exon 3; E4 – Exon 4.

4.2. Expression der Bradykinin-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen

Um festzustellen, in welchen Organen die BKR unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden und wie die Expression im Verlauf der Ontogenese reguliert wird, wurden ausgewählte Organe von männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen unter-

sucht. Folgende Organe wurden verwendet: Hoden bzw. Ovar, Leber, Ventrikel, Atrium, Lunge, Niere, Milz, Vorderhirn, Hirnstamm, Dünndarm, Magen und Thymus. Die jeweiligen drei Organe von 4 Monate alten Tieren, welche die BKR am stärksten exprimierten, wurden dann weiter untersucht im ontogenetischen Verlauf (neugeboren, 2, 4, 6 und 12 Monate). Aus den Organen wurde RNA extrahiert (3.2.1.) und im RPA (3.2.4.) mit den Sonden MMB1 und MMB2 (Abb. 4.24; 2.2.2.) die Expression der BKR verfolgt.

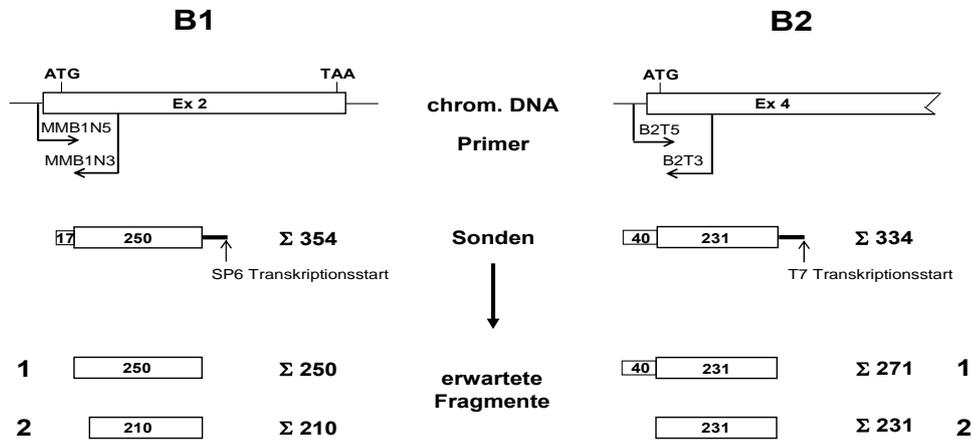


Abb. 4.24 Design der B_1R - und B_2R -Sonden für die Maus anhand Anlage 2 und 5. ATG – Translationsstart; TGA – Translationsstop; Ex – Exon.

4.2.1. B_1 -Rezeptor Expression unter physiologischen Bedingungen

4.2.1.1. Organspezifische Expression des B_1 -Rezeptors

Bei den männlichen Tieren wurde eine Expression des B_1R in Hoden, Leber, Ventrikel, Atrium, Niere, Dünndarm, Magen, Thymus und in der Lunge detektiert (Abb. 4.25 A).

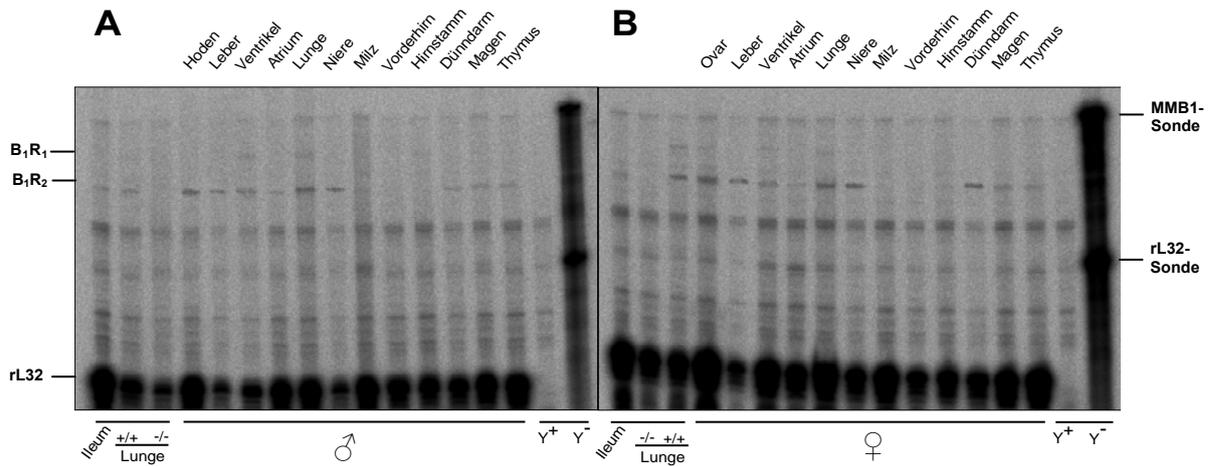


Abb. 4.25 Organspezifische Expression des B_1R bei Mäusen. Es wurden ausgewählte Organe von männlichen und weiblichen Mäusen untersucht. Als Positivkontrolle wurden $B_1^{+/+}$ -Lunge und Ileum verwendet, als Negativkontrolle $B_1^{-/-}$ -Lunge. Zur Überprüfung des RNase-Verdau wurde mRNA von Hefe, mit und ohne RNase behandelt, eingesetzt. $+/+$ – $B_1^{+/+}$; $-/-$ – $B_1^{-/-}$; Y^- – Hefe ohne RNase; Y^+ – Hefe mit RNase.

Die Weibchen zeigten eine Expression in Ovar, Leber, Ventrikel, Atrium, Niere, Dünndarm, Magen, Thymus und in der Lunge (4.25 B). Die anderen Organe zeigten keine Expression des B₁R, aber die des ‚house keeping‘-Gens GAPDH (Abb. 4.25 A; B). Die 5'-verlängerte Exon 2-Bande wurde bei der Maus nicht in allen Organen nachgewiesen. Zwischen Männchen und Weibchen unterschieden sich die Expressionsmuster nicht.

4.2.1.2 Ontogenetischer Verlauf der Expression des B₁-Rezeptors

Anhand des organspezifischen ‚screening‘ wurden Lunge, Magen und Thymus für die Untersuchung des ontogenetischen Verlaufes gewählt, weil diese den B₁R bei männlichen und weiblichen Tieren am stärksten exprimieren.

Im Verlauf der Ontogenese konnten in Lunge und Magen von Männchen und Weibchen keine Änderung der Expression des B₁R festgestellt werden. Jedoch zeigte der Thymus bei den Männchen mit steigendem Alter eine Abnahme der Expression des B₁R, was mit der Rückbildung des Thymus bis zum Eintritt der Geschlechtsreife korreliert (Abb. 4.26 A).

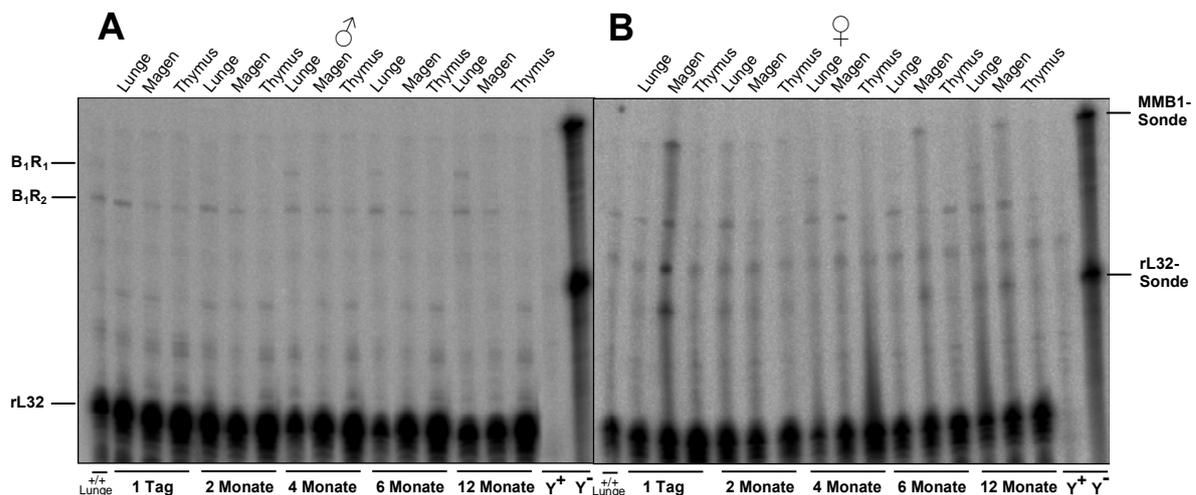


Abb. 4.26 Ontogenetischer Verlauf der Expression des B₁R bei männlichen und weiblichen Mäusen. Als Positivkontrolle wurden BI^{+/+}-Lunge genutzt. Zur Überprüfung des RNase-Verdau wurde mRNA von Hefe, mit und ohne RNase behandelt, eingesetzt. +/+ – BI^{+/+}; Y⁻ – Hefe ohne RNase; Y⁺ – Hefe mit RNase.

4.2.2. B₂-Rezeptor Expression unter physiologischen Bedingungen

4.2.2.1. Organspezifische Expression des B₂-Rezeptor

Bei männlichen Tieren wurde in Hoden, Ventrikel, Atrium, Lunge, Niere, Hirnstamm, Vorderhirn, Magen und Dünndarm eine Expression des B₂R festgestellt (Abb. 4.27 A). Bei Weibchen wurde in Ovar, Ventrikel, Atrium, Lunge, Niere, Hirnstamm, Vorderhirn, Magen, Dünndarm und Thymus eine Expression detektiert (Abb. 4.27 B). Leber und Milz zeigten keine Expression des B₂R, jedoch die des ‚house keeping‘-Gens GAPDH (Abb. 4.27 A; B). Die Bande mit dem 5'-verlängerten Exon 4 konnte nicht in allen Organen

nachgewiesen werden. Die Expression bei Männchen und Weibchen unterscheidet sich im Thymus.

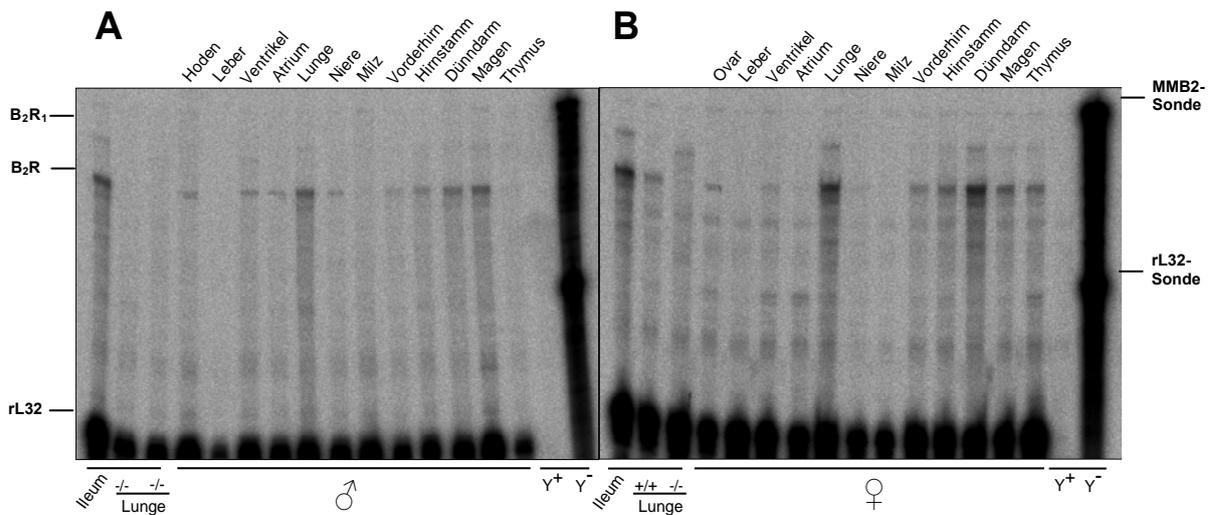


Abb. 4.27 Organspezifische Expression des B_2R bei männlichen und weiblichen Mäusen. Als Positivkontrolle wurden $B_2^{+/+}$ -Lunge und Ileum verwendet, als Negativkontrolle $B_2^{-/-}$ -Lunge. Zur Überprüfung des RNase-Verdau wurde mRNA von Hefe, mit und ohne RNase behandelt, eingesetzt. $+/+$ – $B_2^{+/+}$; $-/-$ – $B_2^{-/-}$; Y^+ – Hefe ohne RNase; Y^- – Hefe mit RNase.

4.2.2.2. Ontogenetischer Verlauf der Expression des B_2 -Rezeptor

Anhand des organspezifischen ‚screening‘ wurden die Lunge, der Magen und der Dünndarm für die Untersuchung des ontogenetischen Verlaufes gewählt, weil in diesen der B_2R bei männlichen und weiblichen Tieren am stärksten exprimiert wurde. Im Verlauf der Ontogenese wurde in Lunge, Magen und Dünndarm von Männchen und Weibchen keine Änderung der B_2R -mRNA-Expression festgestellt (Abb. 4.28).

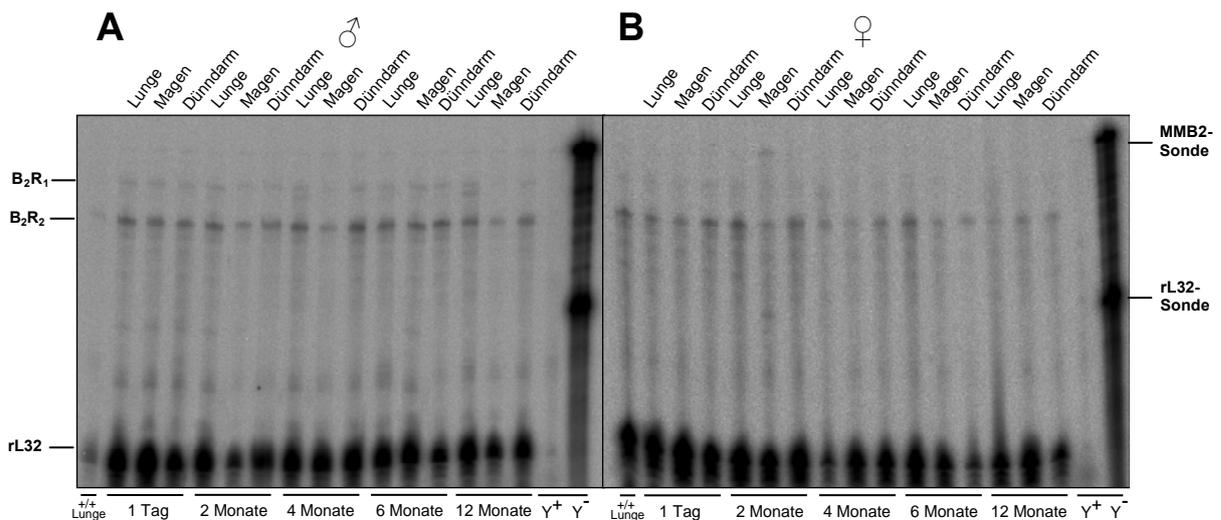


Abb. 4.28 Ontogenetischer Verlauf der Expression des B_2R bei männlichen und weiblichen Mäusen. Es wurden Lunge, Magen und Dünndarm verwendet. Als Positivkontrolle wurde $B_2^{+/+}$ -Lunge genutzt. Zur Überprüfung des RNase-Verdau wurde mRNA von Hefe, mit und ohne RNase behandelt, eingesetzt. $+/+$ – $B_2^{+/+}$; Y^- – Hefe ohne RNase; Y^+ – Hefe mit RNase.

4.3. Rezeptorregulation unter pathophysiologischen Bedingungen

Obwohl die Rolle des KKS unter pathophysiologischen Bedingungen gut dokumentiert ist, sind die BKR, über die Kinine ihre Wirkung vermitteln, noch unzureichend untersucht. Die meisten Arbeiten sind auf die proinflammatorische Rolle der Kinine gerichtet, weshalb hier das Verhalten der BKR unter pathophysiologischen Bedingungen in verschiedenen Rattenmodellen untersucht wurde. Bei Sprague-Dawley bzw. transgenen Ratten wurde die diabetische Kardiomyopathie durch eine STZ-Injektion (3.5.2.), linksventrikuläre Hypertrophie als Folge eines supralvalvulären ‚Aortenbanding‘ oder der Myokardinfarkt (MI) durch permanente Ligation der RIVA induziert (3.5.1.) untersucht. Weitere Tiere wurden zeitangepasst scheinoperiert und/ oder mit Vehikel behandelt, um die entsprechenden Einflüsse auszuschließen. Alle Tiere wurden mit dem Tipkatheter kardiologisch charakterisiert, um hämodynamische Veränderungen darzustellen. Die klassischen kardiologischen Parameter, wie maximaler linksventrikulärer Druck (LVP), als Maß für den maximalen Druck, den der linke Ventrikel aufbauen kann, wurden beschrieben. Ebenso war die maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), als Maß für die linksventrikuläre systolische Kontraktilität und die minimale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}), als Maß für die diastolische Relaxation von Interesse. Auch der Herzindex (Ratio von Herz- zu Körpergewicht), als Maß der Hypertrophie und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) wurden verfolgt. Danach wurden den Tieren die Herzen entnommen, aus den rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) die RNA (3.2.1.) isoliert, diese im RPA (3.2.4.) mit der RNB1- und RNB2-Sonde (2.2.2.) auf die Expression der BKR untersucht. Zur Normalisierung wurden rL32 oder GAPDH als ‚house keeping gene‘ verwendet (2.2.2.). Die mRNA-Expression von IL1 β , ACE, Col I und des AT $_1$ R wurden mit den Sonden IL1 β , RNACE, RNCol I und RNAT1 detektiert.

4.3.1. Modell der linksventrikulären Hypertrophie nach Induktion einer supralvalvulären Aortenstenose

Beim Rattenmodell der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) nach Induktion einer supralvalvulären Aortenstenose, wurde ein Clip um die Aorta der Ratten gelegt. Dies führte zur Erhöhung des peripheren Widerstandes an der Aorta. Die andauernde Druckbelastung führt zur Hypertrophie, bei der hauptsächlich der linke Ventrikel betroffen ist. Sechs Wochen nach der Induktion der Hypertonie wurden die Tiere kardiologisch charakterisiert und die Herzen zur molekularbiologischen Untersuchung entnommen.

4.3.1.1. Kardiale Charakterisierung des Modells der LVH

Der Herzindex zeigte nach dem supralvalvulären ‚Aortenbanding‘ einen 40%igen Anstieg ($P < 0,05$) (Tab. 4.7). Die Parameter LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} zeigten eine geringfügige nicht signifikante Beeinträchtigung, während der LVEDP bei den Tieren um 310% anstieg ($P < 0,05$) (Tab. 4.7). Damit liegt eine diastolische Dysfunktion des Herzens vor.

	SD Sham	SD SVAB
Herzindex [mg/g]	3,1 ± 0,04	4,4 ± 0,14*
LVP [mm Hg]	77,9 ± 2,4	70,1 ± 5,9
dP/dt _{max} [mmg Hg/s]	4642 ± 204	4085 ± 300
dP/dt _{min} [mmg Hg/s]	-3579 ± 279	-3185 ± 314
LVEDP [mmg Hg]	9,2 ± 1,9	37,72 ± 4,7*

Tab. 4.7 Kardiale Charakterisierung der Ratten mit LVH nach Induktion einer supravulären Aortenstenose. Der Herzindex, LVP, dP/dt_{max}, dP/dt_{min} und LVEDP wurden bestimmt (n=6-8). * P<0.05 vs. SD Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD SVAB – Wildtyp mit supravulärem ‚Aortenbanding‘, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit, LVEDP – linksventrikulärer enddiastolischer Druck.

4.3.1.1. Expression der Bradykinin-Rezeptoren im Modell der LVH

Es wurden nur linke Ventrikel untersucht, da diese hauptsächlich von der Hypertrophie betroffen sind. Bei den scheinoperierten Ratten konnte die mRNA-Expression beider BKR nachgewiesen werden (Abb. 4.29). Sechs Wochen nach dem supravulären ‚Aortenbanding‘ zeigten die Ratten eine signifikante Erhöhung der Expression beider Rezeptoren. Der B₁R wies einen 4290%tigen Anstieg (P<0,05) der mRNA-Expression und der B₂R eine Verdoppelung (P<0,05) auf (Abb. 4.29).

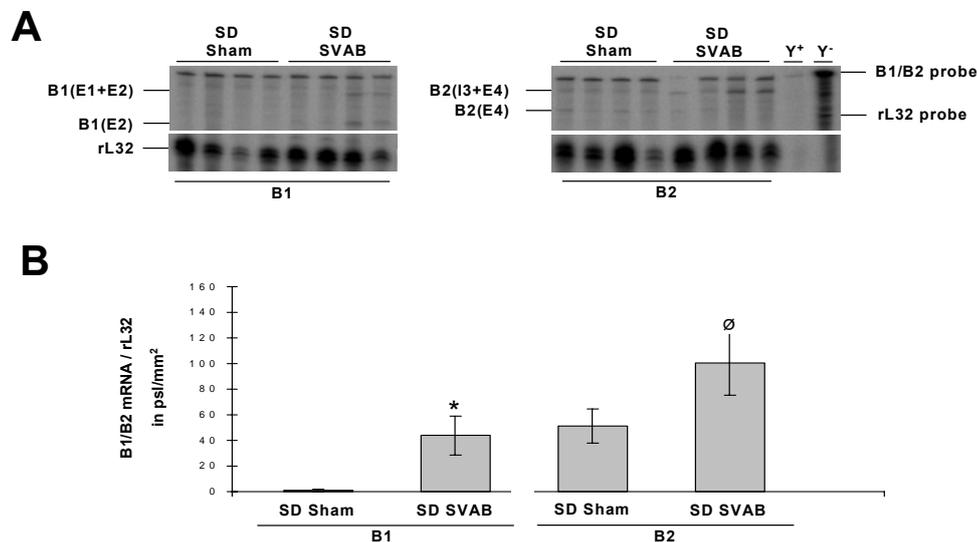


Abb. 4.29 B₁R- und B₂R-mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Wochen nach Scheinoperation oder supravulären ‚Aortenbanding‘ in Wildtypratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (192bp und 257bp) bzw. B₂R- (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression. B. Quantifizierung der B₁R- und B₂R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens rL32 normalisiert. * P<0.05 vs. Sham B1; ø P<0.05 vs. Sham B2. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD SVAB – Wildtyp mit supravulärem ‚Aortenbanding‘.

4.3.2. Kardiale und molekulare Charakterisierung der Tiere mit diabetischer Kardiomyopathie

Da das KKS die Morphologie und Physiologie des Herzen stark beeinflusst und es unter diabetischen Bedingungen zu Störungen des KKS kommt, war die Expression der BKR von Interesse. Neben einer verringerten Gewebe-KLK- und erhöhten B₂R-Konzentration, gibt es nur wenig zum kardialen KKS unter diesen Bedingungen. Für das Modell der diabetischen Kardiomyopathie wurden Sprague-Dawley- und TRG(hKLK1)-Ratten genutzt. Die transgenen TRG(hKLK1)-Ratten exprimieren zusätzlich das humane Kallikrein (hKLK1), was mit erhöhten kardialen BK-Spiegeln assoziiert ist (Tschöpe *et al.*, 2005). Den Ratten wurde, ein dem menschlichen ähnlicher, Diabetes mellitus Typ I induziert (3.5.2.) und die Änderungen von Hämodynamik, BKR- und IL1 β -mRNA-Expression verfolgt. Da bei der diabetischen Kardiomyopathie das ganze Herz betroffen ist, wurden rechte und linke Ventrikel untersucht, weil sie unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen könnten.

4.3.2.1. Genotypisierung der KLK-transgenen Tiere

Um die TRG(hKLK1)-Ratten zu genotypisieren, wurde anfangs genomische DNA aus Schwanzstückchen extrahiert (3.1.5.). Die erfolgreich verdauten Proben (Spuren 1 bis 10; Abb. 4.30 A) mit dem Southern-Blot (3.1.6.) und der Sonde hKLK1 (2.2.2.) geprüft.

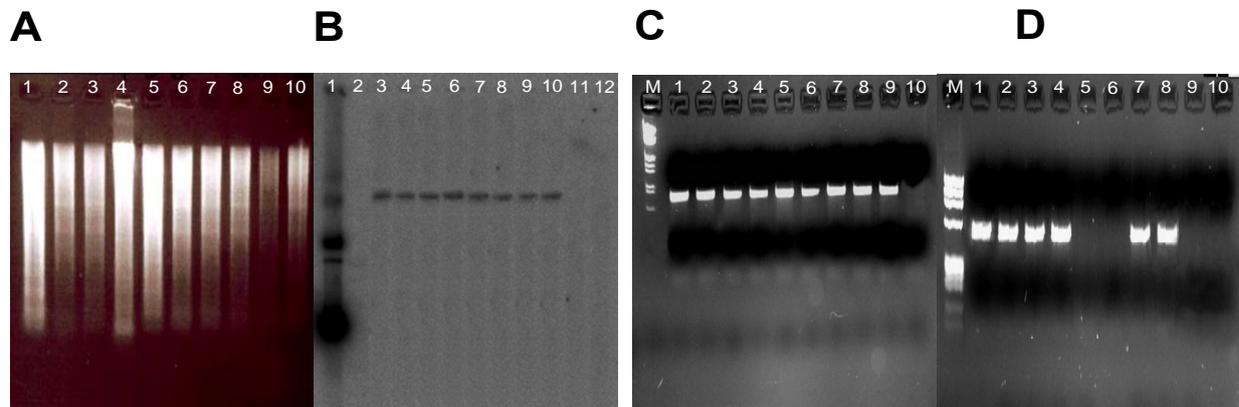


Abb. 4.30 Genotypisierung der TRG(hKLK1)-Ratten. A. Verdau der genomischen DNA aus den Schwanzstückchen mit *Eco* RI. B. Southern-Blot zur Überprüfung des Genotyps der Ratten aus A. Spur 3 bis 10 zeigt die hKLK1-positiven Tiere. C. PCR des Wildtypgens von genomischer DNA aus den Ohrstückchen weiterer Ratten. D. PCR zur Überprüfung des Genotyps der Ratten aus C. Spur 5, 6, 9 bis 10 zeigt die hKLK1-positiven Tiere. M – λ - bzw. Φ -Marker.

Die Sonden-Maxi (Spur 1; Abb. 4.30 B) wurde als Positivkontrolle genutzt und in Spur 2 λ -Marker aufgetragen. Die Spuren 3 bis 10 zeigen die Tiere die hKLK1 exprimierten, 11 und 12 die Wildtypratten (Abb. 4.30 B). Später wurden weitere Tiere mit der PCR (3.1.9.) genotypisiert, weil dies weniger zeitaufwendig ist. Dazu wurde aus Ohrstückchen genomische DNA (3.1.5.) isoliert und diese mit den Primern HSKLK5 und HSKLK3 amplifiziert (Abb. 4.30 C). Zur Kontrolle wurden ein Wildtyptier (Spur 9) verwendet und

einmal nur H₂O amplifiziert (Spur 10). Vorab wurde zur Überprüfung der DNA diese noch mit den entsprechenden Primern auf ein Wildtypgen analysiert. Alle Tiere exprimierten das Wildtypgen (Abb. 4.30 A). Die Spuren 1 bis 4, 7 und 8 zeigen die hKLK1-positiven Tiere und 5 und 6 die Wildtypiere (Abb. 4.30 B).

4.3.2.2. Blutzucker und Gewicht der diabetischen Tiere

Der Blutzuckerspiegel der Wildtyp-Ratten lag vor STZ-Gabe bei durchschnittlich 90 ± 1 mg/dl. Die diabetischen Wildtyp-Tiere zeigten 15 Tage nach STZ-Gabe einen Blutzuckerspiegel von >500 mg/dl ($+455\%$; $P<0,001$) und hielten diesen sechs Wochen (Abb. 4.30; Anlage 20). Zugleich sank das Gewicht von 320 ± 3 g vor STZ-Gabe auf 240 ± 10 g 42 Tage ($P<0,001$) nach STZ-Gabe, was einer 25%igen Senkung (80g) entspricht (Abb. 4.31; Anlage 20). Bei den hKLK-transgenen Tiere stieg 15 Tage nach der STZ-Gabe der Blutzuckerspiegel auf >500 mg/dl (449% ; $P<0,0001$) und verblieb so sechs Wochen, gleichzeitig sank das Gewicht von 320 ± 3 g auf 244 ± 9 g (76g; 24%; $P<0,001$) (Abb. 4.31; Anlage 21). Alle behandelten Tiere wurden als diabetisch gewertet und verwendet.

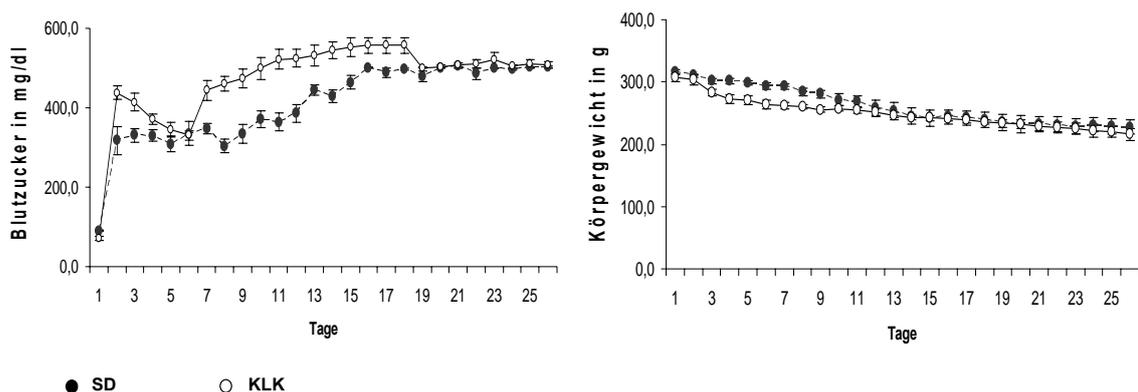


Abb. 4.31 Blutzuckerspiegel und Körpergewicht von Wildtyp- und TGR(hKLK1)-Ratten vor und nach der Injektion von STZ. Der Blutzucker wurde in mg Glukose pro dl Blut [mg/dl] und das Körpergewicht in [g] angegeben. SD – Sprague-Dawley-Ratten, KLK – TGR(hKLK1)-Ratten.

4.3.2.3. Kardiale Charakterisierung der Wildtyp- und TGR(hKLK1)-Ratten

Der Herzindex der diabetischen Wildtyp- und transgenen Tiere war im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren um 10% ($P<0,05$) angestiegen. Die chronische Aktivierung des KKS zeigte im Vergleich mit dem Wildtyp keine signifikante Veränderung bei diabetischen und nicht-diabetischen Ratten. Der LVP des Wildtyps sank um 35% ($P<0,001$) durch die Induktion von Diabetes. Er sank auch bei den diabetischen Transgenen um 15% ($P<0,001$) im Vergleich zu den transgenen Kontrollen, war jedoch bei diabetischen Transgenen höher (25%; $P<0,001$) als beim diabetischen Wildtyp (Tab. 4.8). dP/dt_{max} der diabetischen Tiere war um 50% geringer ($P<0,001$) als bei nicht-diabetischen, dP/dt_{min} um 45% ($P<0,001$). Die Induktion des Diabetes verringerte bei den Transgenen dP/dt_{max} um 15% ($P<0,01$), dP/dt_{min} um 20% ($P<0,01$). dP/dt_{max} und dP/dt_{min}

sind bei diabetischen Transgenen signifikant höher (um 60%; $P < 0,001$ bzw. 25%; $P < 0,05$) als bei diabetischen Wildtypratten (Tab. 4.8).

	SD	SD STZ	KLK	KLK STZ
Herzindex [mg/g]	3,0 ± 0,07	3,3 ± 0,06*	3,1 ± 0,08	3,4 ± 0,06* [§]
LVP [mm Hg]	88 ± 2	57 ± 2***	85 ± 1,6	72 ± 1,0* ^{§§§§§}
dP/dt _{max} [mmHg/s]	5155 ± 181	2602 ± 168***	4897 ± 193	4199 ± 128* ^{§§§§}
dP/dt _{min} [mmHg/s]	-3673 ± 167	-2089 ± 172***	-3302 ± 222	-2610 ± 107* ^{§§§}

Tab. 4.8 Kardiale Charakterisierung der Wildtyp- und TRG(hKLK1)- Ratten mit und ohne STZ-induziertem Diabetes mellitus Typ I. Herzindex, LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} wurden verfolgt (n=6-8). * $P < 0,05$ vs. SD; § $P < 0,05$ vs. STZ; §§§ $P < 0,001$ vs. STZ; § $P < 0,05$ vs. KLK; §§ $P < 0,01$ vs. KLK; §§§ $P < 0,001$ vs. KLK. SD – Wildtypratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.

Die chronische Aktivierung des KKS bewirkte im Vergleich mit den Wildtyptieren keine signifikante Veränderung von LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} (Tab. 4.9). Bei den diabetischen Tieren lag eine Beeinträchtigung der Herzfunktion vor, die sich durch die chronische Aktivierung des KKS bei den diabetischen Ratten verbesserte.

4.3.2.4. Expression von Kallikrein, den Bradykinin-Rezeptoren und Interleukin 1 β im linken Ventrikel

Im RPA (3.2.4.) wurde mit den Sonden hKLK und dem ‚house keeping gene‘ GAPDH (2.2.2.) die mRNA-Expression des humanen Kallikreins in den TGR(hKLK1) kontrolliert. Nur hKLK1-transgene Tieren exprimierten das humane Kallikrein. Die Induktion von Diabetes mellitus bewirkte keine signifikante Veränderung. (Tab. 4.9).

	SD	SD STZ	KLK	KLK STZ
Humanes KLK [%]	n.w.	n.w.	100 ± 54	64 ± 34

Tab. 4.9 Humane KLK-mRNA-Expression bei Wildtyp- und TRG(hKLK1)- Ratten mit und ohne STZ-induziertem Diabetes mellitus Typ I (n=6). Die Ergebnisse sind in Prozenten ausgedrückt, bezogen auf die nicht-diabetischen transgenen Ratten. SD – Wildtypratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten, n.w. – nicht nachweisbar.

Die linken Ventrikel der diabetischen Wildtypratten zeigten eine 215% höhere ($P < 0,05$) mRNA-Expression des B₁R im Vergleich ihren Kontrollen. Bei den diabetischen TGR(hKLK1)-Tieren war sie 2050% ($P < 0,05$) höher als bei den nicht-diabetischen TGR(hKLK1)-Ratten. Schon unter basalen Bedingungen wiesen die transgenen Tiere eine höhere Expression (308%; $P < 0,05$) auf als der Wildtyp. Der Vergleich von

diabetischen Wildtyp- und transgenen Tiere offenbarte eine 2680% ($P<0,05$) höhere Expression (Abb. 4.32).

Auch die mRNA-Expression des B_2R war in den linken Ventrikeln des diabetischen Wildtyps erhöht (um 288%; $P<0,05$) (Abb. 4.33). Die diabetischen Transgenen präsentierten eine höhere (640%; $P<0,05$) Expression im Vergleich mit den nicht-diabetischen TGR(hKLK1)-Ratten. Der Vergleich der nicht-diabetischen Tiere offenbarte bei den TGR(hKLK1)-Tiere eine 185% ($P<0,05$) höhere Expression, der Vergleich der diabetischen Gruppen eine 440% ($P<0,05$) höhere (Abb. 4.33).

Die $IL1\beta$ -mRNA-Expression war bei diabetischen Tieren 150% ($P<0,001$) stärker als bei scheinbehandelten. Ebenfalls war diese bei den diabetischen Transgenen höher (40%; $P<0,05$) als bei den nicht-diabetischen. Die diabetischen TGR(hKLK1)-Tiere offenbarten eine geringere Expression (45%; $P<0,01$) als der diabetische Wildtyp. Unter basalen Bedingungen war die Expression nicht durch die chronische Aktivierung des KKS beeinflusst (Abb. 4.34).

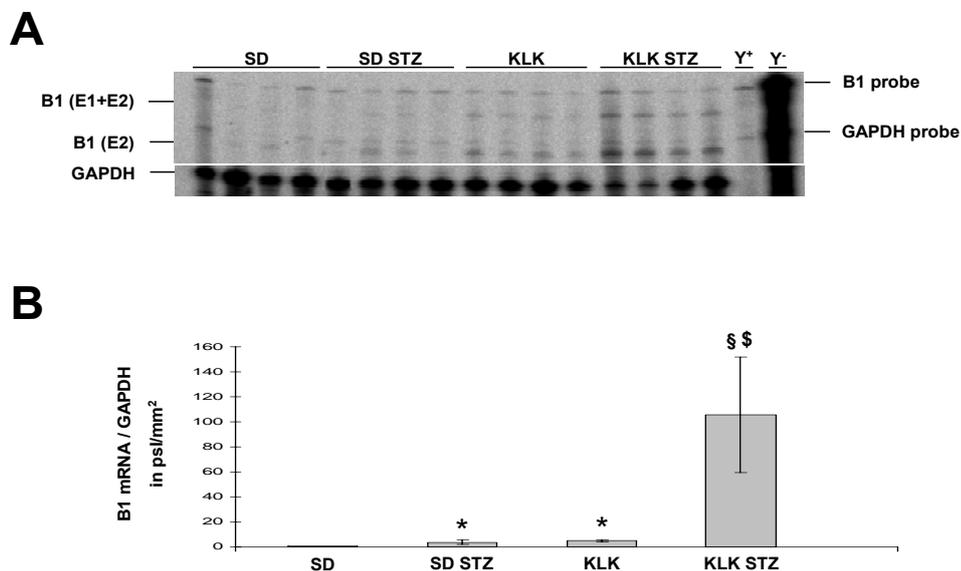


Abb. 4.32 B_1R -mRNA-Expression im linken Ventrikel unter basalen Bedingungen und 6 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus Typ I durch Injektion von STZ in Wildtyp- und KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und GAPDH- (80bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens GAPDH normalisiert. * $P<0,05$ vs. SD; § $P<0,05$ vs. STZ; §§ $P<0,05$ vs. KLK. SD – Wildtyp Ratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten.

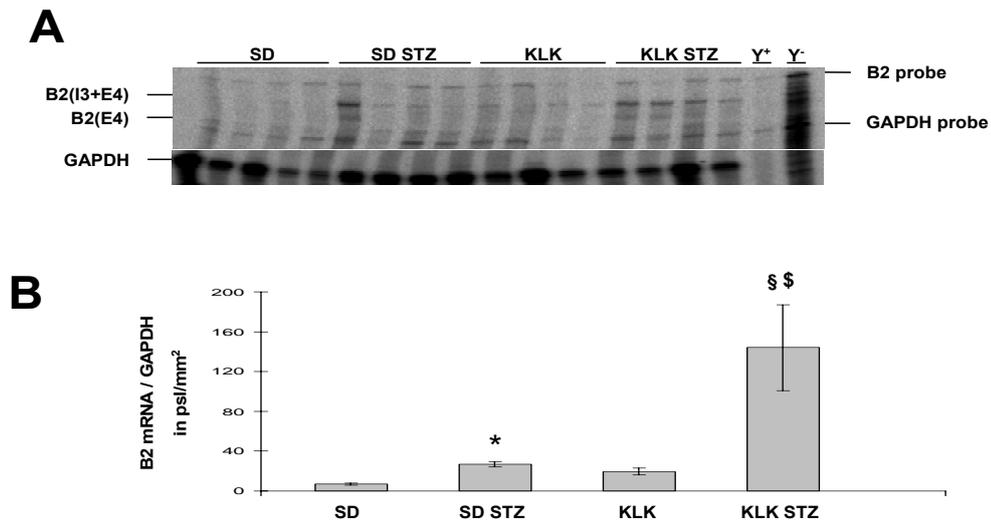


Abb. 4.33 *B₂R*-mRNA-Expression im linken Ventrikel unter basalen Bedingungen und 6 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus Typ I durch STZ-Injektion in Wildtyp- und KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): *B₂R*- (221bp und 274bp) und GAPDH- (80bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *B₂R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens GAPDH normalisiert. * $P < 0.05$ vs. SD; § $P < 0.05$ vs. STZ; § $P < 0.05$ vs. KLK. SD – Wildtypratte basal, SD STZ – diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten.

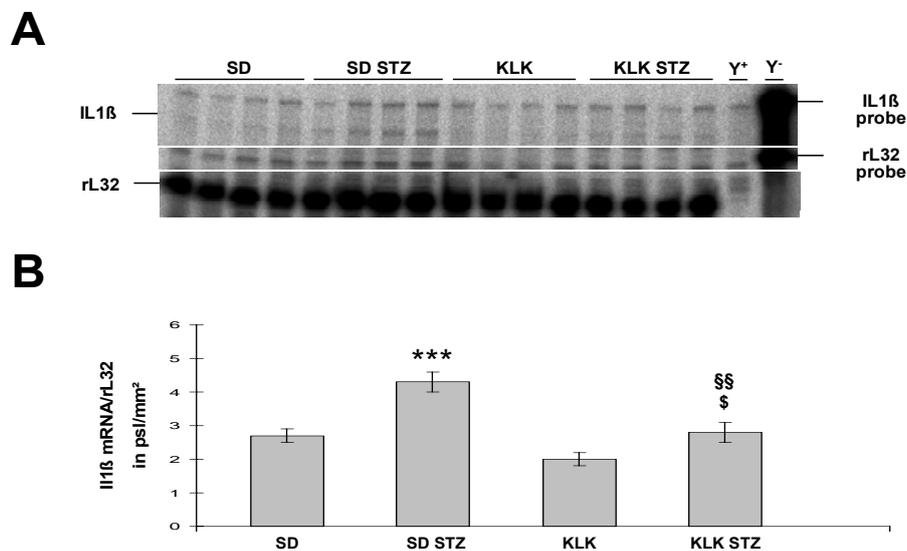


Abb. 4.34 *IL1β*-mRNA-Expression im linken Ventrikel unter basalen Bedingungen und sechs Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus Typ I durch Injektion von STZ im Wildtyp und in KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): *IL1β*- (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *IL1β*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens rL32 normalisiert. *** $P < 0.001$ vs. SD; §§ $P < 0.01$ vs. STZ; § $P < 0.05$ vs. KLK. SD – Wildtypratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten.

4.3.2.5. Expression der Bradykinin-Rezeptoren und von Interleukin 1 β im rechten Ventrikel

Beim Wildtyp bewirkte der Diabetes eine höhere (725%; $P < 0,05$) mRNA-Expression des B₁R als bei seinen Kontrollen, ebenso bei diabetischen TGR(hKLK1)-Tieren (890%; $P < 0,05$). Die transgenen Tiere exprimierten unter basalen Bedingungen doppelt ($P < 0,05$) so viel mRNA wie die Wildtyp-tiere, unter diabetischen Bedingungen 184% ($P < 0,05$) mehr (Abb. 4.35).

Die B₂R-mRNA-Expression war im Wildtyp erhöht (um 45%; $P < 0,01$), nicht bei diabetischen Transgenen im Vergleich mit ihren Kontrollen. Auch der Vergleich von Wildtyp und Transgenen zeigte unter basalen Bedingungen keinen Unterschied. Unter diabetischen Bedingungen exprimierten hKLK-transgenen Ratten jedoch 30% ($P < 0,001$) weniger (Abb. 4.36).

Die IL1 β -mRNA-Expression war beim diabetischen Wildtyp 50% ($P < 0,05$) stärker als bei nicht-diabetischen Tieren. Die diabetischen transgenen Ratten wiesen eine doppelt so hohe ($P < 0,01$) Expression im Vergleich mit ihren Kontrollen auf. Unter basalen Bedingungen wurde zwischen transgenen und Wildtyp-ratten kein Unterschied ermittelt. Auch die chronische Aktivierung des KKS offenbarte keinen Unterschied zwischen diabetischen und nicht-diabetischen (Abb. 4.37).

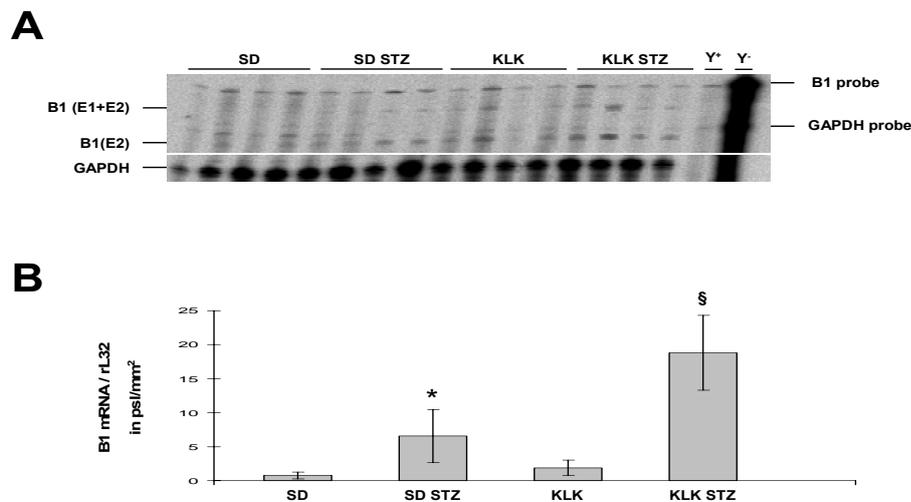


Abb. 4.35 B₁R-mRNA-Expression im rechten Ventrikel unter basalen Bedingungen und 6 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus Typ I durch Injektion von STZ im Wildtyp und in KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzen. B. Quantifizierung der B₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens rL32 normalisiert. * $P < 0,05$ vs. SD; § $P < 0,05$ vs. STZ; § $P < 0,05$ vs. KLK. SD – Wildtyp-pratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – humanes diabetische Kallikrein-exprimierende Ratten.

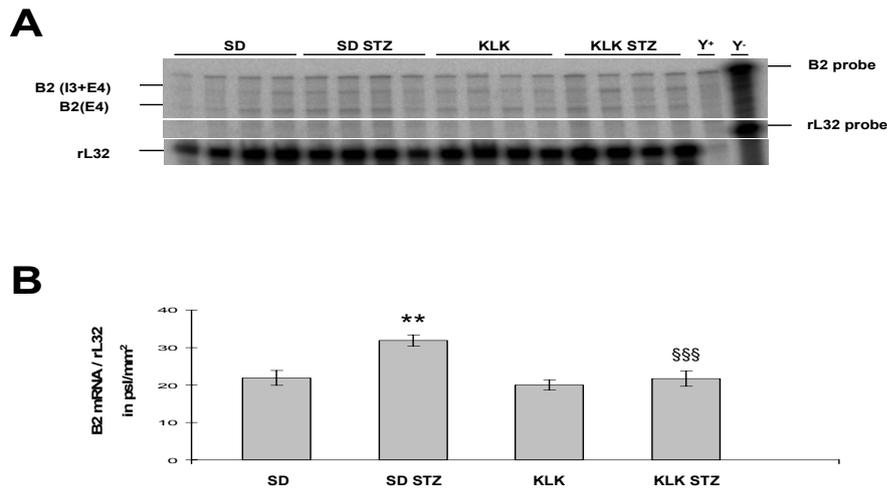


Abb. 4.36 B_2R -mRNA-Expression im rechten Ventrikel unter basalen Bedingungen und 6 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus Typ I durch Injektion von STZ im Wildtyp und in KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens rL32 normalisiert. ** $P<0.01$ vs. SD; §§§ $P<0.01$ vs. STZ. SD – Wildtypratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten.

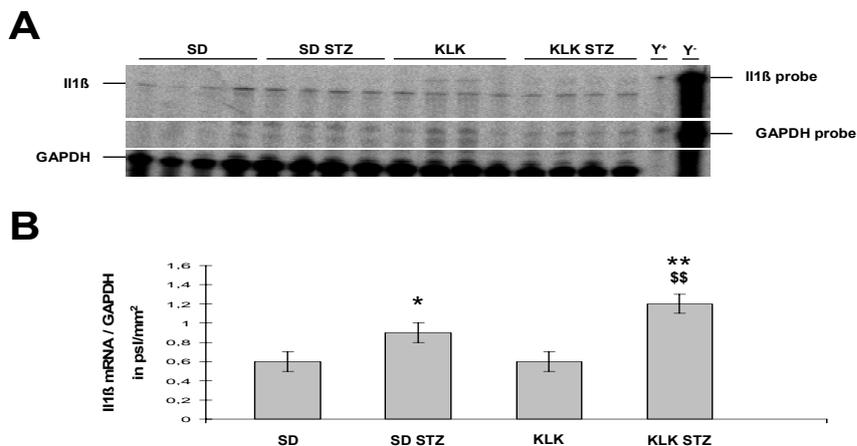


Abb. 4.37 $IL1\beta$ -mRNA-Expression im rechten Ventrikel unter basalen Bedingungen und 6 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus Typ I durch Injektion von STZ im Wildtyp und in KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): $IL1\beta$ - (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der $IL1\beta$ -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level des ‚house keeping‘-Gens rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. SD; ** $P<0.01$ vs. SD; §§ $P<0.01$ vs. KLK. SD – Wildtypratte basal, SD STZ – Diabetischer Wildtyp, KLK – humanes Kallikrein-exprimierende Ratte basal, KLK STZ – diabetische humanes Kallikrein-exprimierende Ratten.

4.3.3. Das Modell des Myokardinfarktes

Nach Induktion des MI wurden als Untersuchungszeitpunkte sechs Stunden, sechs Tage und drei Wochen gewählt. Parallel dazu wurden Ratten scheinoperiert um operative

Einflüsse auszuschließen (3.5.1.). Zu diesen Zeitpunkten wurden die Tiere hämodynamisch charakterisiert, im Anschluss daran die Herzen entnommen und für die molekular-biologischen Untersuchungen verwendet. Da bei der ischämischen Kardiomyopathie die ganzen Herzen betroffen sind wurde rechter und linker Ventrikel untersucht. Drei Wochen nach MI wurde der linke Ventrikel zusätzlich in infarziertes und nicht-infarziertes Gebiet des linken Ventrikels unterteilt und separat analysiert. Neben der mRNA-Expression der BKR wurden weitere Herzen entnommen um auch die Proteinexpression zu untersuchen. Dazu wurden die Herzen präpariert (3.3.1.1.) und immunohistochemisch (3.3.1.2.) mit den spezifischen Antikörpern ‚Anti rat B2‘ und ‚Anti rat B1‘ (2.4) gefärbt. Weiterhin wurden die mRNA-Expression von IL1 β , ACE, Col I und AT₁R mit den Sonden IL1 β , RNACE, RNCol I und RNAT1 detektiert. Dieses war von Interesse, da die Expression des Zytokins IL1 β während des Herzinfarktes hoch reguliert wird und in der Lage ist, die Expression der BKR unter inflammatorischen Bedingungen zu modulieren (Pan et al., 1996; Tschöpe, 1997b; Zhou et al., 1998). Ebenso könnte dies zum ‚remodeling‘ der extrazellulären Matrix beitragen (Mizushige et al., 2000). Veränderungen der extrazellulären Matrix tragen durch Akkumulation von Kollagen, zur Wandsteife der Ventrikel bei (Riva et al., 1998). Auch ACE wurde mit der kardialen Fibrose in Verbindung gebracht (Fabris et al., 1990; Zhou et al., 1993) und Kollagen I und III machen den größten Anteil am myokardialen Kollagen aus (Pelouch et al., 1993).

4.3.3.1. Kardiale Charakterisierung der wildtypischen Ratten

Der LVP war 6 Stunden nach Induktion des MI bei der infarzierten Gruppe geringer (40%; $P < 0,05$) als bei der Kontrollgruppe. Die dP/dt_{max} war um 40% geringer ($P < 0,001$) wie bei den Kontrollen, ebenso dP/dt_{min} um 30% ($P < 0,05$). Die Behandlung mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die kardiologischen Parameter. Die Induktion des MI verschlechtert die Herzfunktion und wurde durch die Behandlung mit dem ICE-Inhibitor nicht verbessert (Tab. 4.10).

	SD Sham	SD MI 6h	SD MI 6h ICEI
LVP [mm Hg]	66 \pm 2,9	41 \pm 3,3***	45 \pm 2,1
dP/dt_{max} [mmg Hg/s]	3098 \pm 147	1805 \pm 112***	2118 \pm 123
dP/dt_{min} [mmg Hg/s]	-2429 \pm 125	-1737 \pm 276*	-1579 \pm 84

Tab. 4.10 Kardiale Charakterisierung des Wildtyps 6 Stunden nach Induktion des MI ohne und mit ICE-Inhibitor HMR3480. Es wurden LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} gemessen ($n=6-8$). * $P < 0,05$ vs. Sham; *** $P < 0,001$ vs. Sham. SD Sham 6h – Wildtyp 6 Stunden nach Scheinoperation, SD MI 6h – Wildtyp 6 Stunden nach MI, SD MI 6d ICEI – Wildtyp 6 Stunden nach MI mit HMR 3480 ab 1. postoperativem Tag, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.

Der Herzindex der infarzierten Tiere, 6 Tage nach MI, stieg (10%; $P < 0,05$) im Vergleich mit den scheinoperierten Tieren. Die Behandlung mit Irbesartan bzw. PD123319 verbesserte diesen (10%; $P < 0,05$). Der LVEDP war um 145% ($P < 0,05$) bei den

infarzierten Tieren höher als bei den Kontrollen. Der LVP war bei der infarzierten Gruppe geringer (30%; $P < 0,001$) als bei der Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die mit Quinapril behandelt wurden, stieg dieser um 15% ($P < 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten infarzierten Tieren, auch bei den mit Irbesartan behandelten (15%; $P < 0,05$). Auch die mit PD123319 behandelten Tiere zeigten einen 15% höheren LVP ($P < 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten infarzierten Tieren. Die dP/dt_{max} und dP/dt_{min} waren durch Induktion des MI um 40% ($P < 0,001$) bzw. 35% ($P < 0,001$) verringert. Unter Behandlung mit Quinapril war dP/dt_{max} um 20% höher ($P < 0,05$) und dP/dt_{min} um 35% ($P < 0,01$) im Vergleich zu den unbehandelten infarzierten Tieren. Auch die Irbesartanbehandlung erhöhte dP/dt_{max} (25%; $P < 0,01$) im Vergleich zu den unbehandelten infarzierten Tieren, ebenso dP/dt_{min} (30%; $P < 0,01$). Die Behandlung mit PD123319 verbesserte dP/dt_{max} (15%; $P < 0,05$) und dP/dt_{min} (35%; $P < 0,05$). Die Induktion des MI beeinflusst die Herzfunktion negativ. Die Behandlung mit dem Irbesartan und Quinapril bewirkte eine Verbesserung, ebenso die mit PD123319 (Tab. 4.11).

	SD Sham	SD MI 6d	SD MI 6d Qui	SD MI 6d Irb	SD MI 6d PD
Herzindex [mg/g]	3,0 ± 0,03	3,3 ± 0,03*	-	3,0 ± 0,08	3,0 ± 0,04 [§]
LVP [mm Hg]	79 ± 2,4	56 ± 1,6***	65 ± 3,6 [§]	65 ± 1,6 [§]	65 ± 1,9* [§]
dP/dt_{max} [mmg Hg/s]	4732 ± 162	2962 ± 134***	3586 ± 242 [§]	3640 ± 170 ^{§§}	3341 ± 124* [§]
dP/dt_{min} [mmg Hg/s]	-3453 ± 249	-2212 ± 148***	-2952 ± 178 ^{§§}	-2921 ± 179 ^{§§}	-2950 ± 100* [§]
LVEDP [mm Hg]	9,1 ± 1,8	22,2 ± 2,4*	-	-	-

Tab. 4.11 Kardiale Charakterisierung des Wildtyps 6 Tage nach Induktion des MI mit und ohne pharmakologischer Behandlung. Es wurde LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} gemessen ($n=6-8$). * $P < 0,05$ vs. Sham; *** $P < 0,05$ vs. Sham; § $P < 0,05$ vs. MI; §§ $P < 0,01$ vs. MI. SD Sham 6d – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD MI 6d – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD MI 6d Qui – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, SD MI 6d PD – Wildtyp 6 Tage nach MI mit PD123319 ab 2. postoperativem Tag, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.

3 Wochen nach Induktion des MI stieg der Herzindex um 20% ($P < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Behandlung mit Irbesartan bzw. PD123319 verbesserte den Herzindex um 10% ($P < 0,05$) bzw. 15% ($P < 0,05$). Der LVEDP um 200% ($P < 0,05$) bei den infarzierten Tieren erhöht. Der LVP war bei der infarzierten Gruppe signifikant geringer (25%; $P < 0,001$), als bei den nicht infarzierten Tieren (Tab. 4.18). Die Behandlung mit Quinapril, ebenso die mit Irbesartan verbesserte diesen um 15% ($P < 0,01$). Die Behandlung mit PD123319 erhöhte diesen um 20% ($P < 0,01$) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die dP/dt_{max} war 35% geringer ($P < 0,001$) als bei den nicht-infarzierten Tiere und die dP/dt_{min} um 30% ($P < 0,01$). Die Behandlung mit Quinapril zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die dP/dt_{max} , verbesserte jedoch die dP/dt_{min} signifikant (25%; $P < 0,05$). Die Behandlung mit Irbesartan verbesserte die dP/dt_{max} und die dP/dt_{min} um 20% ($P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$). Die Behandlung mit PD 123319 verbesserte die dP/dt_{max} um 30% ($P < 0,05$), hatte jedoch keinen Einfluss auf dP/dt_{min} im Vergleich mit den

infarzierten Tieren. Die Induktion des MI beeinflusst die Herzfunktion negativ und wird durch Behandlung mit Quinapril, PD123319 oder Irbesartan verbessert (Tab. 4.12).

	SD Sham	SD MI 3w	SD MI 3w Qui	SD MI 3w Irb	SD MI 3w PD
Herzindex [mg/g]	2,9 ± 0,05	3,5 ± 0,1***	-	3,1 ± 0,08 [§]	3,0 ± 0,06 [§]
LVP [mm Hg]	81 ± 1,1	61 ± 1,5***	69 ± 2,2 ^{§§}	70 ± 2,6 ^{§§}	73 ± 3,3* ^{§§}
dP/dt _{max} [mmHg/s]	4921 ± 108	3102 ± 116***	3280 ± 179	3758 ± 307 [§]	3974 ± 430* [§]
dP/dt _{min} [mmHg/s]	-3563 ± 301	-2497 ± 77*	-3081 ± 172 ^{§§}	-3081 ± 172 ^{§§}	-2965 ± 347*
LVEDP [mm Hg]	7 ± 3	21 ± 5*	-	-	-

Tab. 4.12 *Kardiale Charakterisierung des Wildtyps 3 Wochen nach Induktion des MI ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. AT1R-Antagonist Irbesartan. Es wurde LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} gemessen (n=6-8). * P<0.05 vs. Sham; ** P<0.01 vs. Sham; *** P<0.001 vs. Sham; § P<0.05 vs. MI; §§ P<0.01 vs. MI; § P<0.05 vs. MI Qui; §§ P<0.01 vs. MI Qui. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD MI 3w Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, SD MI 3w PD – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit PD123319 ab 2. postoperativem Tag, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.*

4.3.3.2. Charakterisierung der wildtypischen Ratten ohne Behandlung

4.3.3.2.1. Charakterisierung der Tiere 6 Stunden nach Myokardinfarkt

Sechs Stunden nach MI war LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min}, und damit die Herzfunktion signifikant beeinträchtigt. Die mRNA-Expression des B₁R konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression des B₂R war bei den scheinoperierten und infarzierten Tieren nachzuweisen und sechs Stunden nach Induktion des MI schon signifikant erhöht (Daten siehe 4.3.3.1. und 4.3.3.3.3; Tab. 4.10; Abb. 4.76; 4.77).

Die Proteinexpression des B₂R war 6 Stunden nach Induktion des MI und Schein-Operation detektierbar, aber im Gegensatz zur mRNA-Expression noch nicht signifikant erhöht (Abb. 4.38).

Sechs Stunden nach Scheinoperation konnte die IL1 β -mRNA-Expression nachgewiesen werden, die nach Induktion des MI stark um 1400% (P<0,05) anstieg (Abb. 4.39).

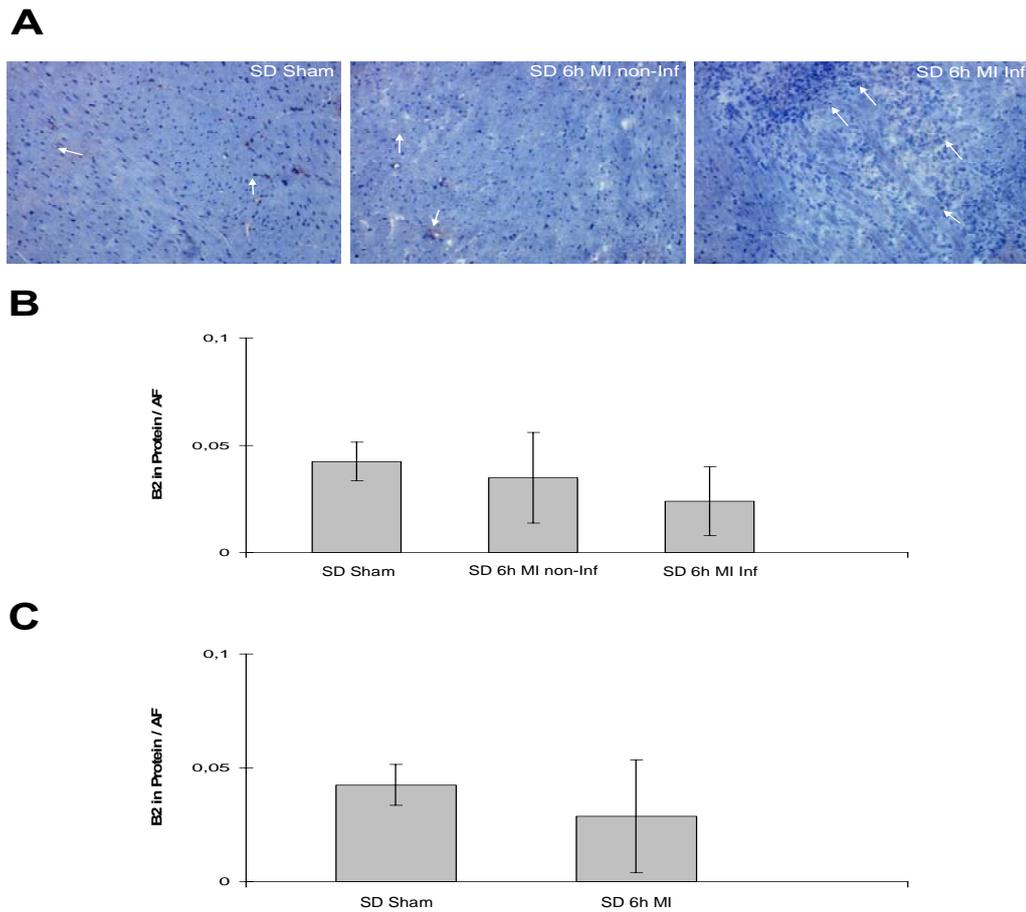


Abb. 4.38 B_2R -Proteinexpression im linken Ventrikel 6 Stunden nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_2R -Expression im Herzen. B. Quantifizierung der B_2R -Proteinexpression ($n=6$). SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6h MI – Wildtyp 6 Stunden nach MI, AF – Flächenfraktion.

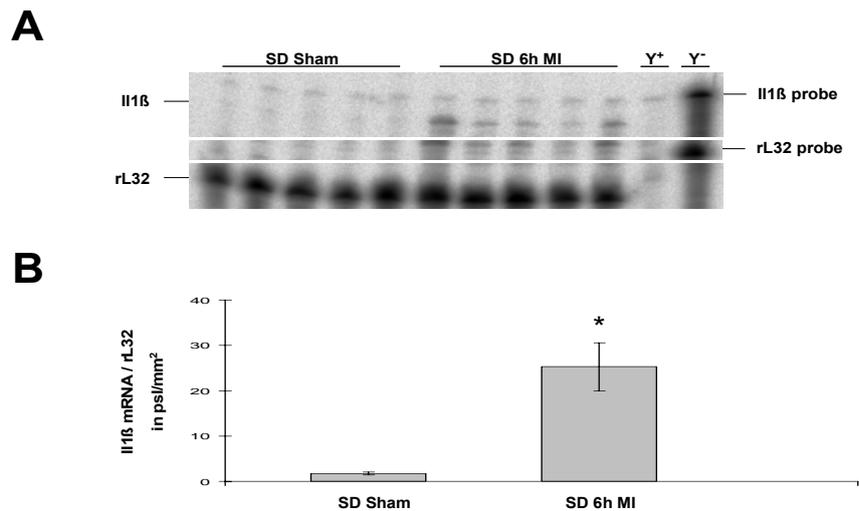
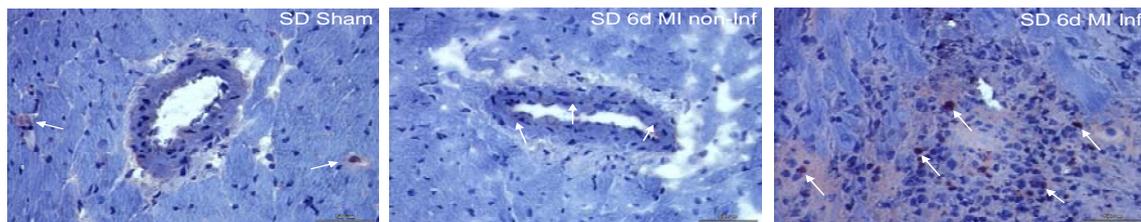


Abb. 4.39 $IL1\beta$ -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Stunden nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): $IL1\beta$ - (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der $IL1\beta$ -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0.05$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6h MI – Wildtyp 6 Stunden nach MI.

4.3.3.2.2. Charakterisierung der Tiere 6 Tage nach Myokardinfarkt

Die Parameter Herzindex, LVP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} und LVEDP waren bei der infarzierten Gruppe nach Induktion des Herzinfarktes signifikant beeinträchtigt (Daten siehe 4.3.3.1.; Tab. 4.11). Damit liegt eine Beeinträchtigung der Herzfunktion vor. Zu diesem Zeitpunkt konnte im LV der Ratten die mRNA-Expression des B_1R und B_2R nachgewiesen werden und stieg nach Induktion des MI signifikant an (Daten siehe 4.3.3.2.2.; Abb. 4.53; 4.54).

A



B

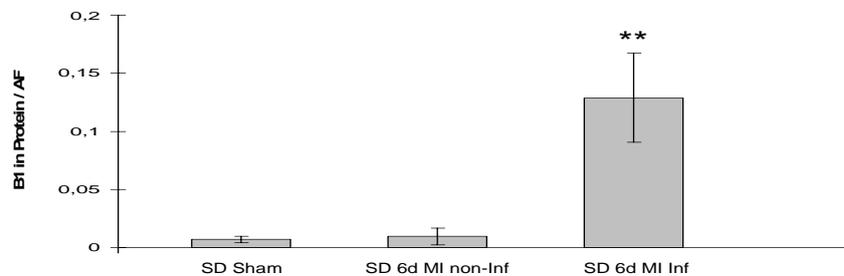


Abb. 4.40 B_1R -Proteinexpression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI in Wildtypratten. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_1R -Expression im Herzen. B. Quantifizierung der B_1R -Protein-Expression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI non-Inf – Nicht-Infarktgebiet des Wildtyps 6 Tage nach MI, SD 6d MI Inf – Infarktgebiet des Wildtyps 6 Tage nach MI, AF – Flächenfraktion.

Die B_1R -Proteinexpression war sechs Tage nach MI im Infarktgebiet, besonders in den Gefäßen, um 1780% höher ($P<0,01$), im Nicht-Infarktgebiet nicht (Abb. 4.40). Weiterhin war die B_2R -Protein-expression um 110% ($P<0,05$) im Nicht-Infarktgebiet und im Infarktgebiet um 455% ($P<0,01$) (Abb. 4.41) signifikant erhöht. Im infarzierten Areal war sie um 165% ($P<0,01$) höher als im nicht infarzierten. Die $IL1\beta$ -mRNA-Expression stieg durch die Induktion um 70% ($P<0,05$) (Abb. 4.42).

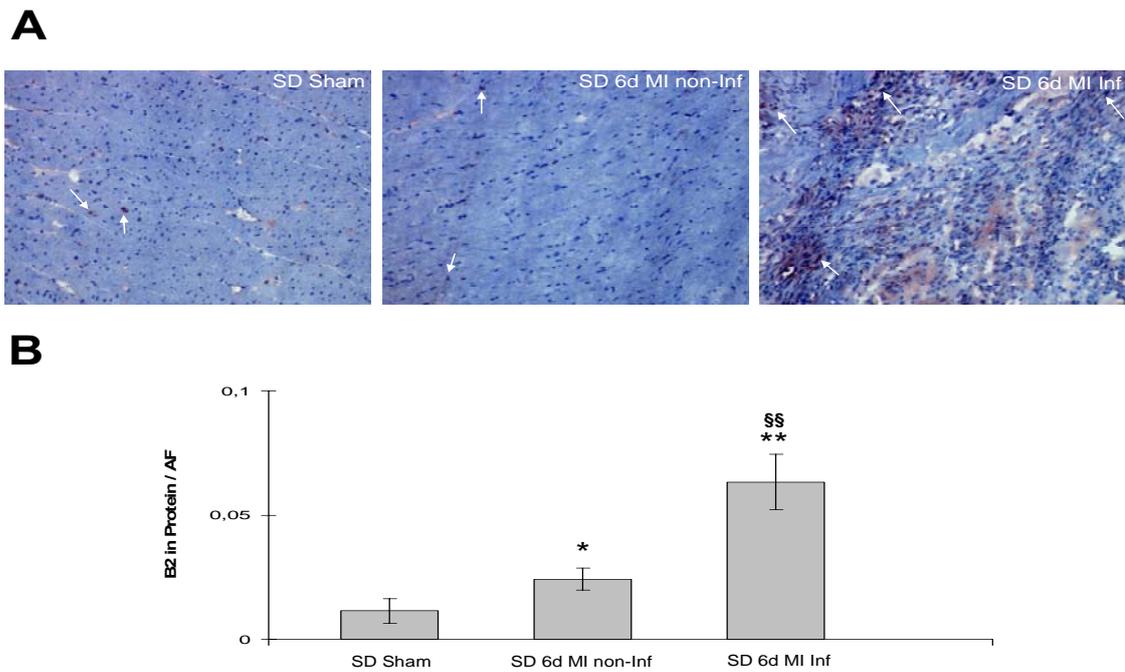


Abb. 4.41 B_2R -Proteinexpression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI in Wildtypratten. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_2R -Expression im Herzen. B. Quantifizierung der B_2R -Proteinexpression ($n=6$). * $P<0.05$ vs. Sham; ** $P<0.0$ vs. Sham; §§ $P<0.01$ vs. SD 6d MI non-Inf. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI non-Inf – Nicht-Infarktgebiet des Wildtyps 6 Tage nach MI, SD 6d MI Inf – Infarktgebiet des Wildtyps 6 Tage nach MI, AF – Flächenfraktion.

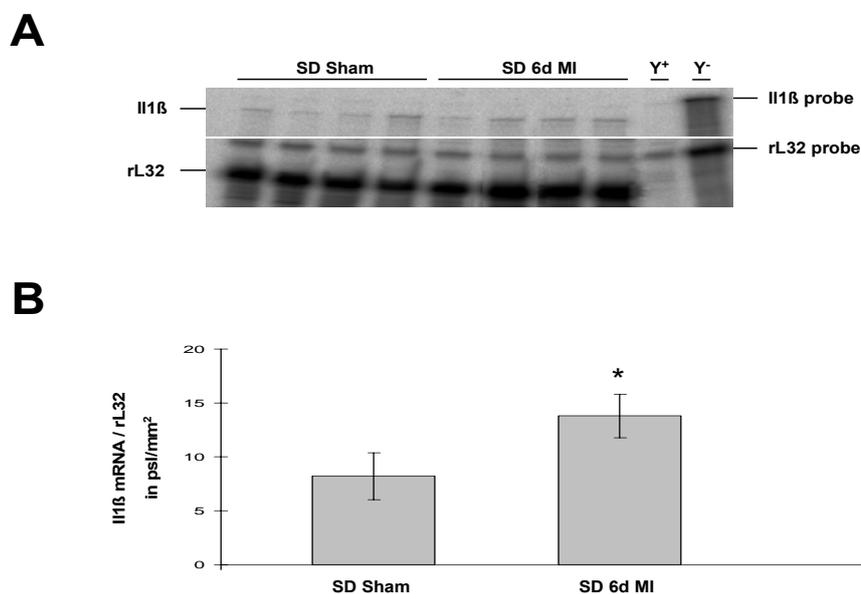


Fig. 4.42 $IL1\beta$ -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI in Wildtypratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): $IL1\beta$ - (365bp) und $rL32$ - (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der $IL1\beta$ -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von $rL32$ normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI.

4.3.3.2.3. Expression der Bradykinin-Rezeptoren im linken Ventrikel 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Auch drei Wochen nach MI waren bei den infarzierten Tieren Herzindex, LVP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} und LVEDP signifikant beeinträchtigt (Daten siehe 4.3.3.1.: Tab. 4.12). Somit führt die Induktion des MI zur Verschlechterung der Herzfunktion.

Im gesamten LV zeigte sich nach Induktion des MI eine 310% höhere ($P<0,05$) mRNA-Expression des B_1R (Abb. 4.43). Im Infarktgebiet des LV wurde eine 800% ($P<0,05$) höhere Expression als im nicht-infarzierten Gebiet detektiert. Der Vergleich des LV der scheinoperierten Tiere mit dem Nicht-Infarktgebiet der infarzierten offenbarte keine höhere Expression. Jedoch ergab sich eine 1700% ($P<0,01$) höhere Expression im Infarktgebiet (Abb. 4.44). Somit wird die B_1R -mRNA-Expression drei Wochen nach MI hauptsächlich im Infarktgebiet des LV hochreguliert. Auch eine 1100% höhere ($P<0,05$) Proteinexpression offenbarte sich im Infarktgebiet im Vergleich zum Nicht-Infarktgebiet. Der Vergleich mit den scheinoperierten Kontrollen zeigte eine 800% ($P<0,05$) höhere (Abb. 4.47 B). Bei Betrachtung des gesamten LV war die Proteinexpression zwar tendenziell erhöht, aber nicht signifikant, wie die mRNA-Expression (Abb. 4.47 C).

Der B_2R wies nach MI im gesamten LV eine 120% höhere ($P<0,05$) mRNA-Expression auf (Abb. 4.45). Im Infarktgebiet war diese 80%ig ($P<0,05$) höher als im nicht-infarzierten Gebiet. Beim Vergleich mit den scheinoperierten Tieren, zeigt sich im Nicht-Infarktgebiet (30%; $P<0,05$) und im Infarktgebiet (130%; $P<0,05$) eine höhere Expression (Abb. 4.46). Somit wird der B_2R ebenso hauptsächlich im Infarktgebiet hochreguliert. Auch die Proteinexpression nach MI war im Vergleich zum Nicht-Infarktgebiet des LV erhöht (520%; $P<0,05$), jedoch im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren nicht (Abb. 4.48 B). Vergleicht man den gesamten LV der infarzierten Tiere, mit dem der scheinoperierten, ist die Proteinexpression nicht signifikant erhöht (Abb. 4.48 C).

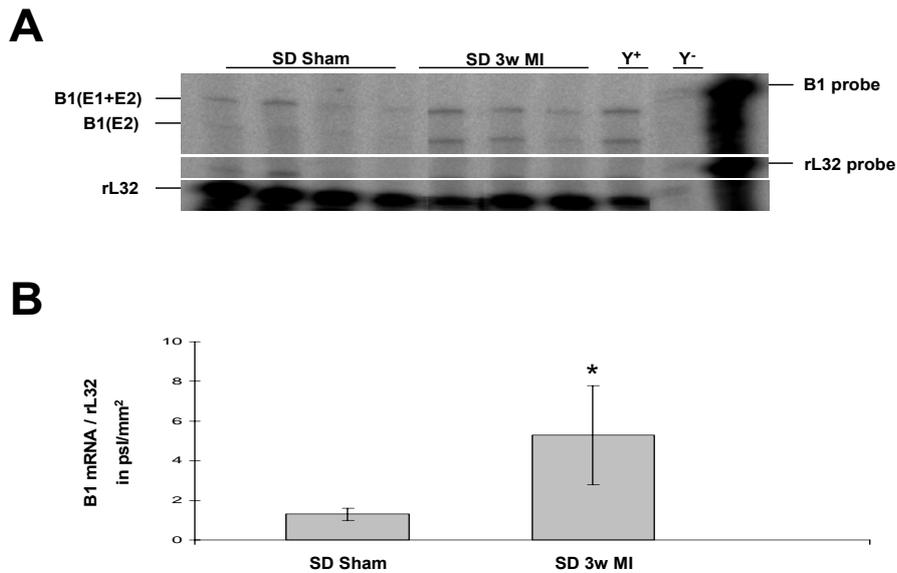


Fig. 4.43 *B₁R*-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): *B₁R*- (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *B₁R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI.

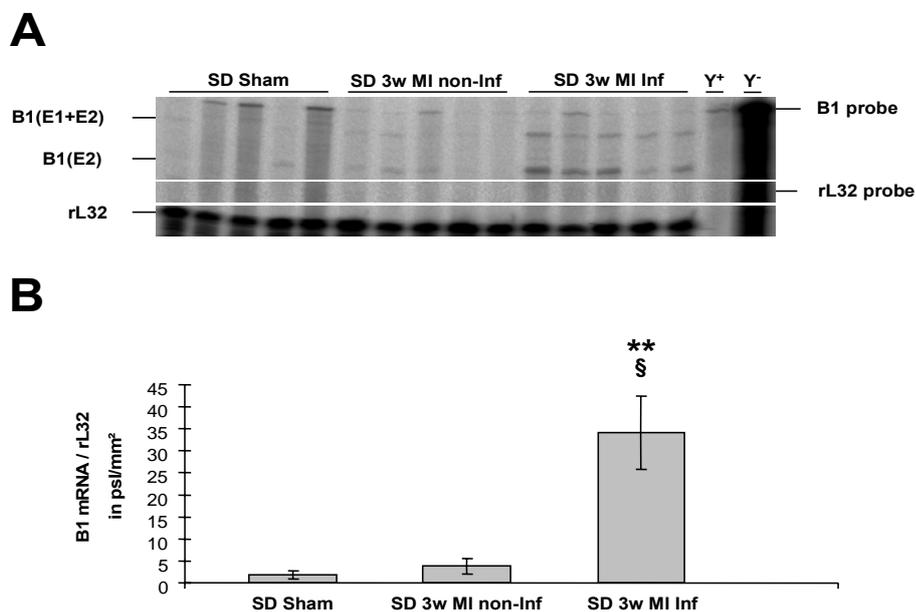


Abb. 4.44 *B₁R*-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Infarkt- bzw. Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikel in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): *B₁R*- (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *B₁R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P<0.01$ vs. Sham; § $P<0,01$ vs. MI non-Inf. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI non-Inf – Nicht-Infarktgebiet beim Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Inf – Infarktgebiet beim Wildtyp 3 Wochen nach MI.

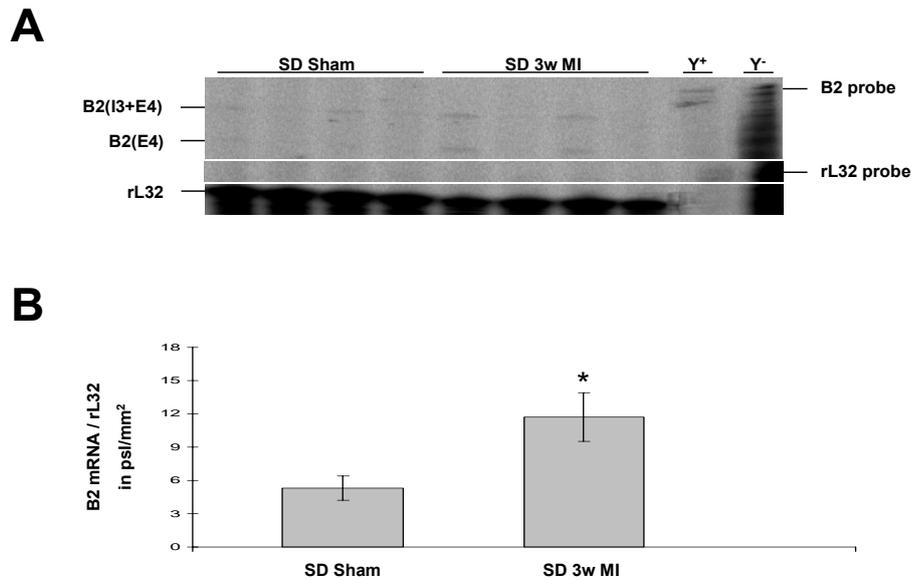


Abb. 4.45 B_2R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp drei Wochen nach MI.

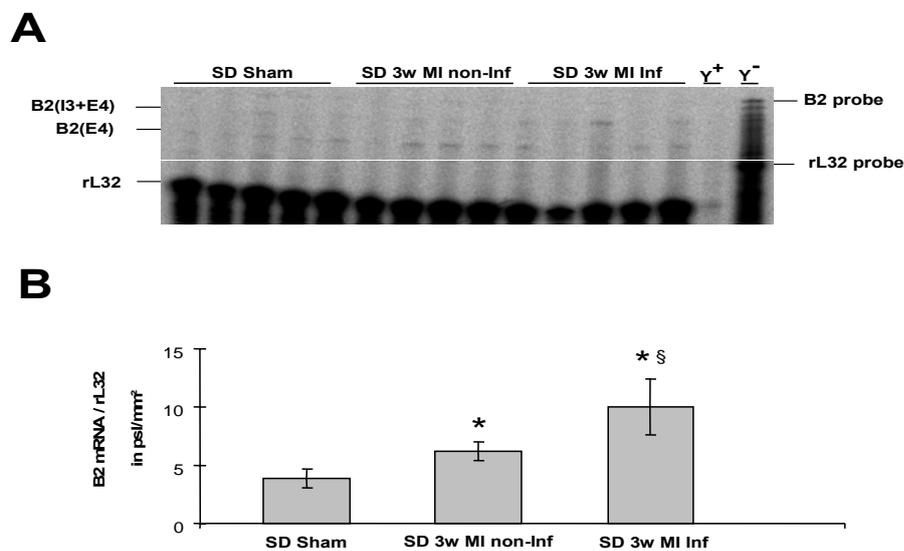


Abb. 4.46 B_2R -mRNA-Expression im Infarkt- bzw. Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham; § $P<0.05$ vs. MI non-Inf. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI non-Inf – Nicht-Infarktgebiet beim Wildtyp drei Wochen nach MI, SD 3w MI Inf – Infarktgebiet beim Wildtyp drei Wochen nach MI.

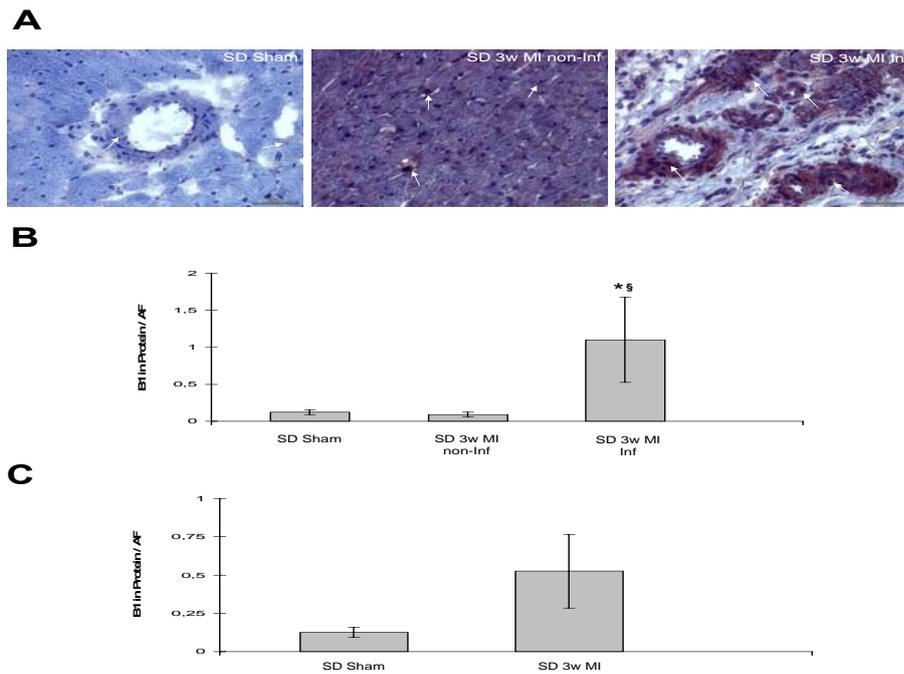


Abb. 4.47 *B₁R*-Proteinexpression im LV 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: *B₂R*-Expression im Herzen. B. Quantifizierung der *B₁R*-Proteinexpression im Infarkt- und Nicht-Infarktgebiet des LV (n=6). C. Quantifizierung der *B₁R*-Proteinexpression im gesamten LV (n=6). * $P < 0.05$ vs. Sham; § $P < 0.05$ vs. MI non-Inf. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AF – Flächenfraktion.

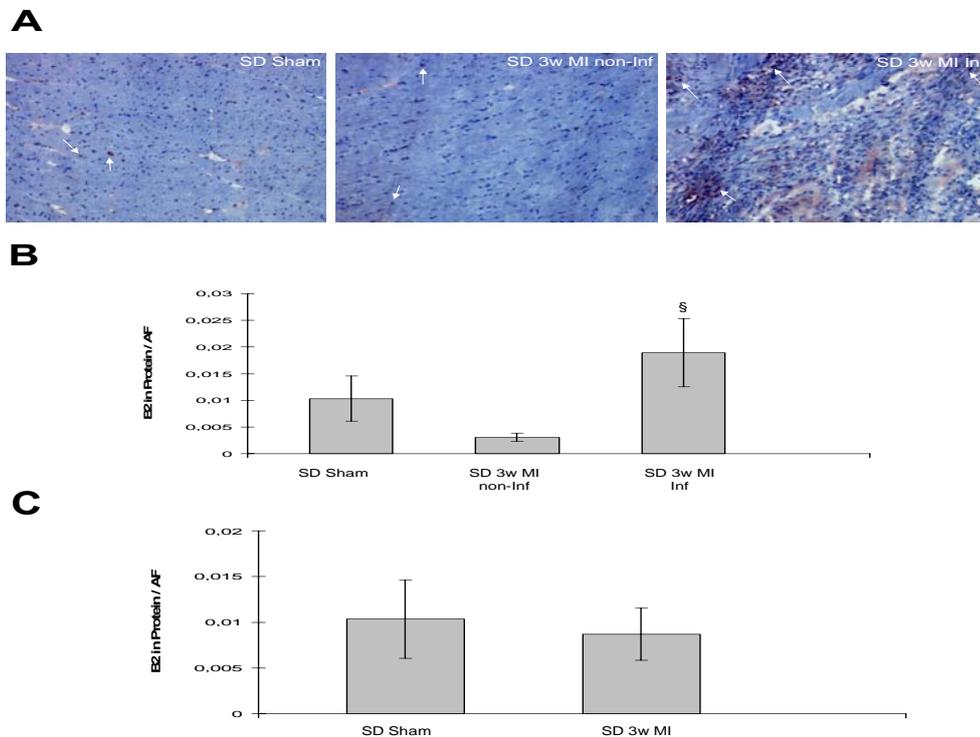


Abb. 4.48 *B₂R*-Proteinexpression im LV 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: *B₂R*-Expression im Herzen. B. Quantifizierung der *B₂R*-Proteinexpression im Infarkt- und Nicht-Infarktgebiet des LV (n=6). C. Quantifizierung der *B₂R*-Proteinexpression im gesamten LV (n=6). § $P < 0.05$ vs. MI non-Inf. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AF – Flächenfraktion.

4.3.3.2.4. Expression von Interleukin 1 β 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Drei Wochen nach MI zeigt sich im Infarktgebiet des LV eine um 40% ($P<0,05$) höhere IL1 β -mRNA-Expression als im nicht-infarzierten Gebiet (Abb. 4.49) und im RV eine um 90% ($P<0,05$) höhere (Abb. 4.50). Der Vergleich der scheinoperierten Tiere mit dem Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels, ergibt eine 225% ($P<0,05$) höhere Expression, mit dem Infarktgebiet sogar eine 350% ($P<0,01$) höhere (Abb. 4.49).

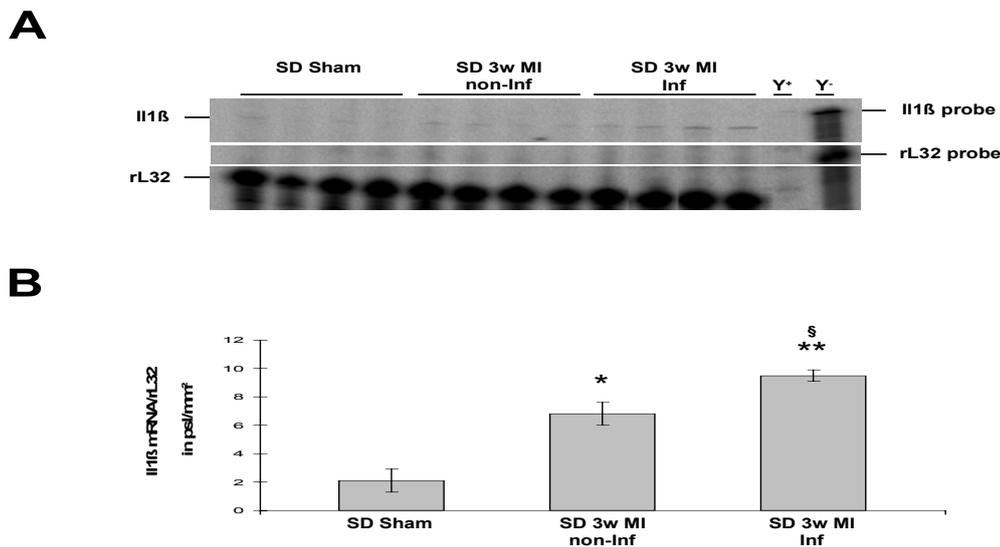


Abb. 4.49 IL1 β -mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Infarkt- bzw. non-Infarktgebiet bei Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): IL1 β - (365 bp) und rL32- (127 bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der IL1 β -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung der Daten wurden diese über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P<0.01$ vs. Sham; \S $P<0,05$ vs. MI non-Inf. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI non-Inf – nicht Infarktgebiet beim Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Inf – Infarktgebiet beim Wildtyp drei Wochen nach MI.

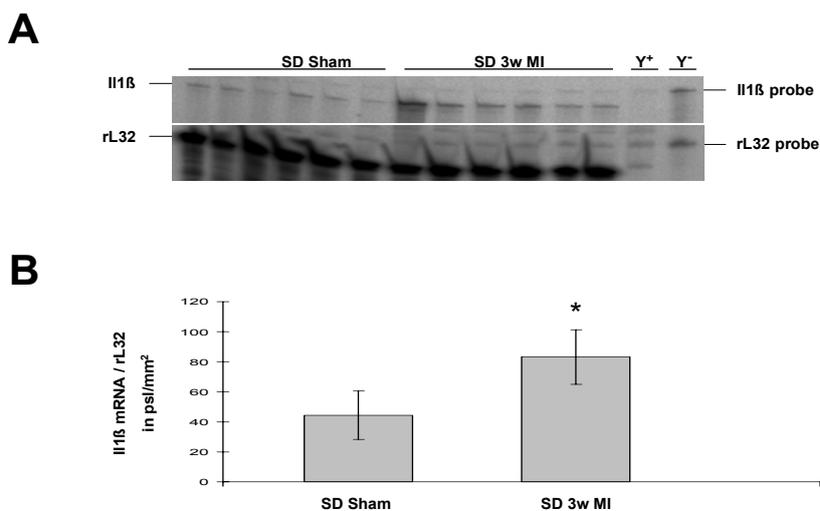


Abb. 4.50 IL1 β -mRNA-Expression im RV 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): IL1 β - (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der IL1 β -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp drei Wochen nach MI.

4.3.3.2.5. Expression der Bradykinin-Rezeptoren im rechten Ventrikel 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Drei Wochen nach MI zeigt sich im RV eine signifikant ($P < 0,001$) höhere B_1R -mRNA-Expression als bei den scheinoperierten Tieren (Abb. 4.51). Die scheinoperierten Tiere zeigten im rechten Ventrikel keine Expression. Die mRNA-Expression des B_2R war 80% höher ($P < 0,05$) als bei den scheinoperierten Kontrollen (Abb. 4.52).

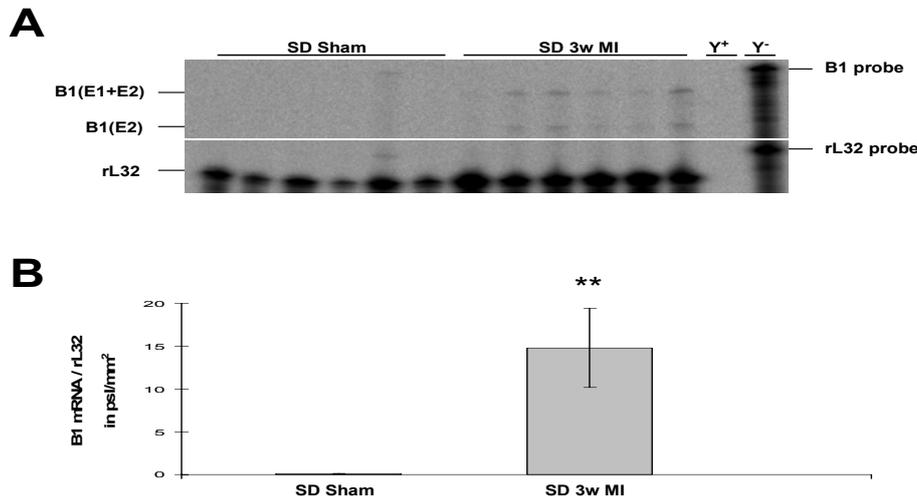


Abb. 4.51 B_1R -mRNA-Expression im rechten Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P < 0,01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp drei Wochen nach MI.

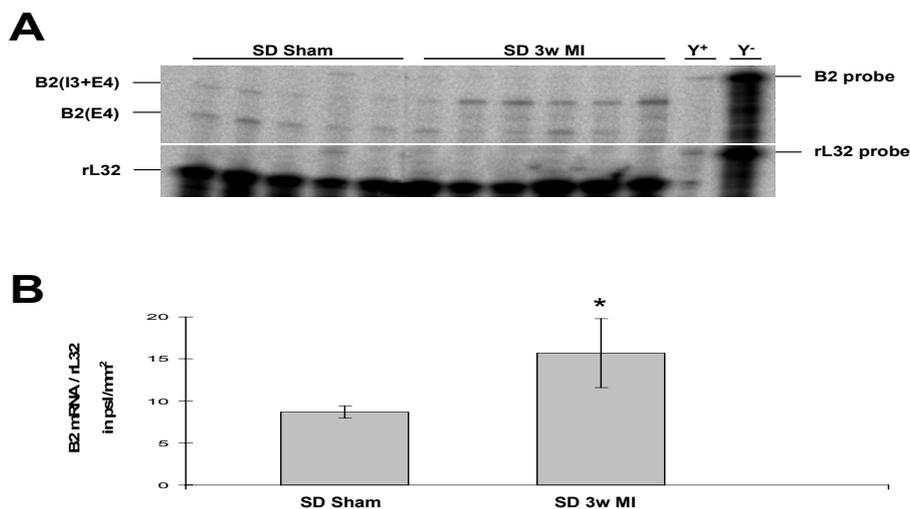


Abb. 4.52 B_2R -mRNA-Expression im rechten Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI in Wildtypmatten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P < 0,01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp drei Wochen nach MI.

4.3.3.3. Effekte pharmakologischer Behandlungen nach Myokardinfarkt

Enzyminhibitoren und Rezeptorantagonisten sind unverzichtbare Werkzeuge, um bestimmte Einflüsse des KKS und RAS auf die Expression der beiden BKR und die Interaktion der Systeme unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen. Deshalb wurden Ratten, ab dem zweiten postoperativen Tag, verschiedene pharmakologische Interventionen verabreicht. Nach Induktion des MI wurden einige Tiere mit dem ACE-Inhibitor Quinapril (Qui) behandelt. ACE war von Interesse, da es die wichtigste Verbindung zwischen KKS und RAS ist (Erdös und Yang, 1967; Yang *et al.*, 1970; Yang *et al.*, 1971). Es spaltet nicht nur ANG I zu ANG II, sondern inaktiviert auch BK und KL. So spielen insbesondere die Expression der BKR, aber auch die von IL1 β und Kollagen I eine Rolle. Die ACE-Inhibitor-Behandlung verhindert jedoch nicht nur die negativen Effekte des ANG II, sondern fördert auch die positiven Effekte des KKS unter pathophysiologischen Bedingungen. Im Gegensatz dazu blockiert die Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan zwar die negativen Effekte des ANG II, welches seine Wirkung unter anderem über den AT₁R auswirkt, jedoch übt es keine direkten Effekte auf die BKR aus. Bei der ACE-Inhibition werden auch die Effekte des ANG II, die über den AT₂R ausgeübt werden verhindert, der bei der Gewebereparatur hochreguliert wird. Er wird nur in wenigen Organen exprimiert und mit der fötalen Entwicklung verbunden (Stoll *et al.*, 1995; Meffert *et al.*, 1996). Ansonsten ist über diesen Rezeptor nur wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde unter Behandlung mit dem AT₂-Blocker PD123319 die mRNA-Expression der BKR und von Col I verfolgt.

4.3.3.3.1. Behandlung mit ACE-Inhibitor bzw. AT1-Rezeptor-Antagonist

4.3.3.3.1.1. Expression der Bradykinin-Rezeptoren im linken Ventrikel 6 Tage nach Myokardinfarkt

Im linken Ventrikel der infarzierten Ratten war die mRNA-Expression des B₁R um 60% höher ($P < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den mit Quinapril behandelten Tieren zeigte sich eine 60% ($P < 0,05$) höhere Expression im Vergleich mit den infarzierten Ratten. Die Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten bewirkte sogar eine 175% ($P < 0,01$) höhere Expression. Die Behandlung mit Irbesartan offenbarte eine 75% ($P < 0,05$) höhere Expression als die mit Quinapril (Abb. 4.53). Auch die Proteinexpression war bei den infarzierten Ratten um 810% ($P < 0,05$) höher Proteinexpression als bei den Kontrollen. Die Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan wies eine um 75% höhere Proteinexpression ($P > 0,01$) auf als die unbehandelten infarzierten Tiere (Abb. 4.55).

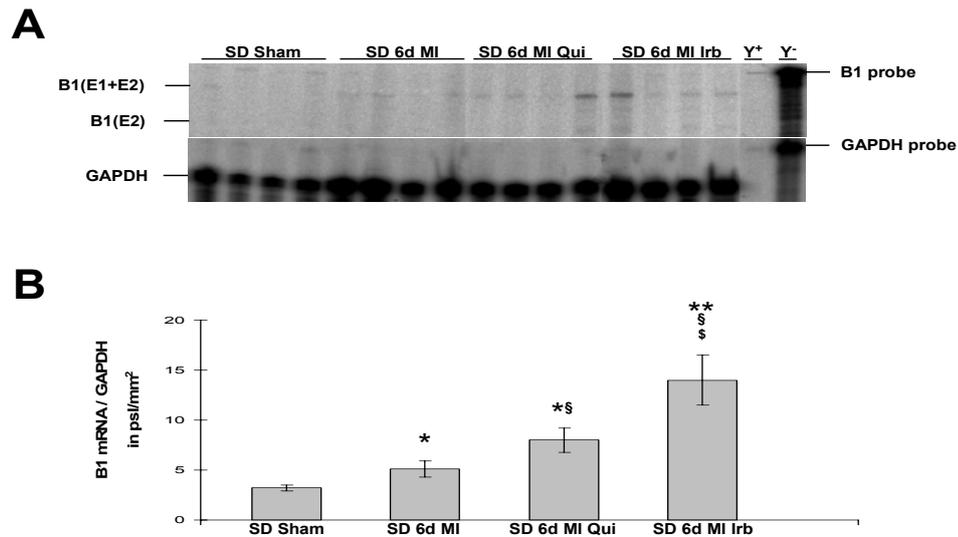


Abb. 4.53 B_1R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion des MI im Wildtyp ohne und mit ACE-Inhibitor Quinapril bzw. AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham, ** $P<0.01$ vs. Sham, § $P<0.05$ vs. MI, § $P<0.05$ vs. MI Qui. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Qui – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

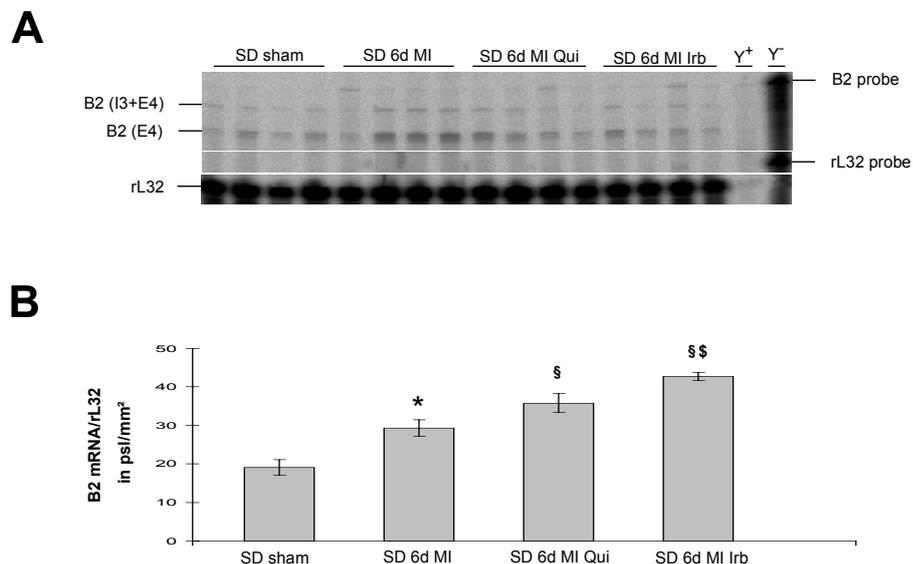


Abb. 4.54 B_2R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit ACE-Inhibitor Quinapril bzw. mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham, § $P<0.05$ vs. MI, § $P<0.05$ vs. MI Qui. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Qui – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

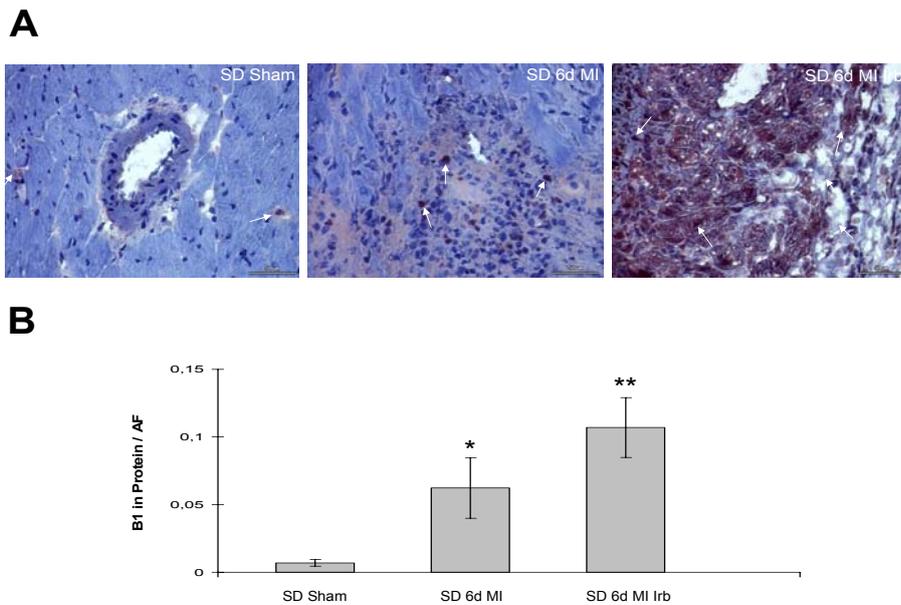


Abb. 4.55 B_1R -Protein-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_1R -Proteinexpression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -Proteinexpression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, AF – Flächenfraktion.

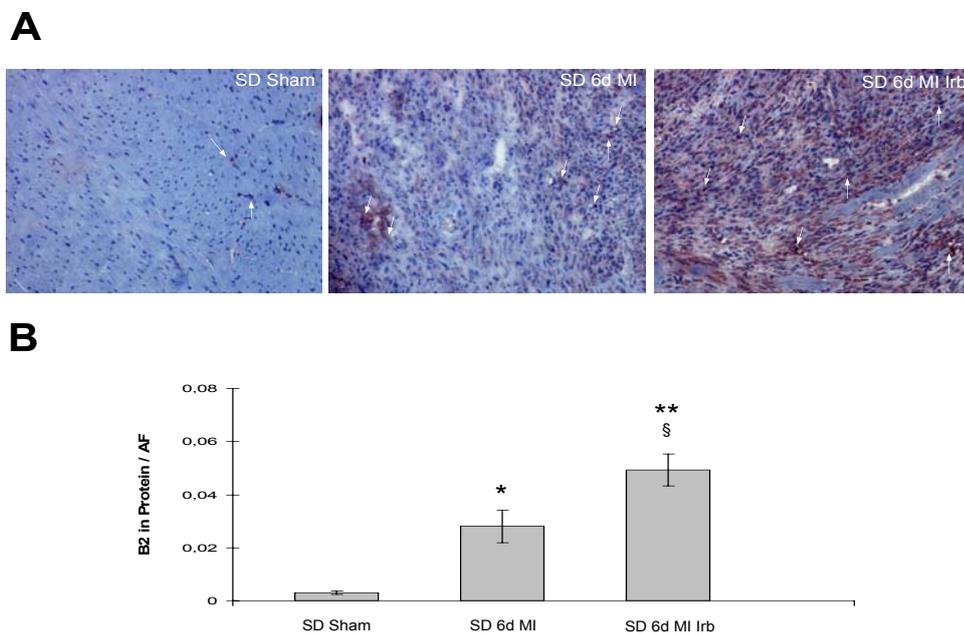


Abb. 4.56 B_2R -Proteinexpression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_2R -Proteinexpression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -Proteinexpression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, AF – Flächenfraktion.

Die B₂R-mRNA-Expression stieg nach Induktion des MI um 55% ($P < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollen. Der ACE-Inhibitor bzw. AT₁R-Antagonist erhöhte die Expression um ein Weiteres (25%; $P < 0,05$ bzw. 45%; $P < 0,05$). Die Expression war mit Irbesartan um 20% ($P < 0,05$) höher als mit Quinapril (Abb. 4.54). Die Proteinexpression war nach MI um 390% ($P < 0,05$) erhöht im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. Die Behandlung mit Irbesartan zeigte ebenfalls eine 75% höhere Proteinexpression ($P > 0,05$) (Abb. 4.56).

4.3.3.3.1.2. Expression von Interleukin 1 β im linken Ventrikel 6 Tage nach Myokardinfarkt

Die IL1 β mRNA-Expression stieg nach Induktion des MI um 70% ($P < 0,05$) an. Die Behandlung mit Quinapril führte zu einer Reduktion um 45% ($P < 0,05$), ungefähr auf das basale Niveau. Die Blockierung des AT₁R führte nur zu einer tendenziellen, aber nicht signifikanten Reduktion (Abb. 4.57).

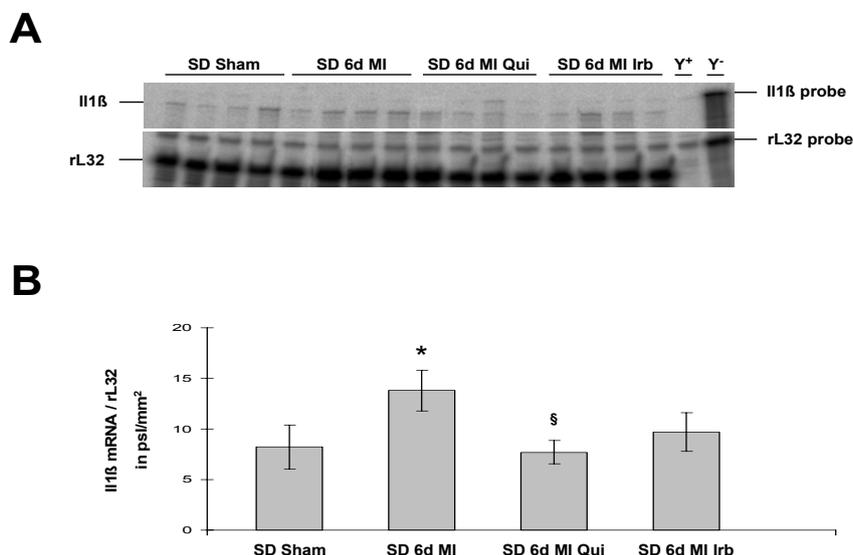


Abb. 4.57 IL1 β -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. mit dem AT₁R-Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA (n=4): IL1 β - (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der IL1 β -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0,05$ vs. Sham, § $P < 0,05$ vs. MI. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Qui – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

4.3.3.3.1.3. mRNA-Expression der Bradykinin-Rezeptoren im linken Ventrikel 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Im Nicht-Infarktgebiet zeigte sich eine 150% höhere ($P < 0,05$) mRNA-Expression des B₁R im Vergleich zu den Kontrollen. Der ACE-Inhibitor bewirkte im Vergleich zu den infarzierten Tieren keine, zu den scheinoperierten eine 400% ($P < 0,05$) höhere Expression. Im Vergleich zu den infarzierten Tieren wurde eine 320% ($P < 0,01$) höhere

Expression mit dem AT₁R-Antagonisten nachgewiesen (Abb. 4.58). Im Infarktgebiet wurde eine 310% ($P<0,05$) höhere Expression des als in den Kontrollen detektiert. Die ACE-Inhibitor behandelten Ratten exprimierten 105% ($P<0,05$) mehr B₁R als die scheinoperierten, jedoch nicht signifikant mehr als die infarzierten. Mit dem AT₁R-Antagonisten wurde eine 170% ($P<0,01$) höhere Expression nachgewiesen (Abb. 4.59). Der B₂R wurde im Nicht-Infarktgebiet um 65% höher ($P<0,05$) exprimiert als bei den Kontrollen. Mit Quinapril wurde eine 50% ($P<0,05$) höhere mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. Durch die Behandlung mit Irbesartan wurde eine Erhöhung um 75% ($P<0,05$) und war somit 25% ($P<0,05$) höherer als die mit Quinapril (Abb. 4.60). Auch im Infarktgebiet wiesen die infarzierten Herzen eine 65% ($P<0,05$) höhere mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollen auf. Die Behandlung mit Quinapril führte zur 35%ig ($P<0,05$) und die mit Irbesartan zur 60%ig ($P<0,05$) höheren Expression. Der Vergleich von Irbesartan und Quinapril zeigte eine 25% ($P<0,05$) höhere Expression bei den Irbesartan-behandelten Tieren (Abb. 4.61).

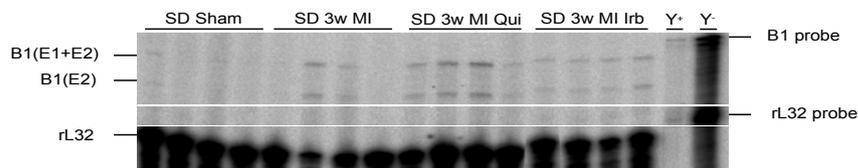
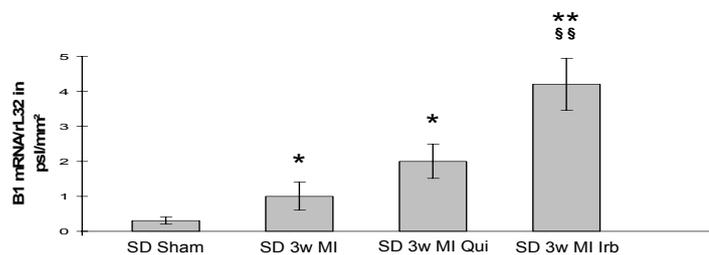
A**B**

Abb. 4.58 *B₁R-mRNA-Expression im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels 3 Wochen nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT₁R-Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (192 bp und 257 bp) und rL32- (127 bp) mRNA-Expression Herzens. B. Quantifizierung der B₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0,05$ vs. Sham, ** $P<0,01$ vs. Sham, §§ $P<0,01$ vs. MI. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.*

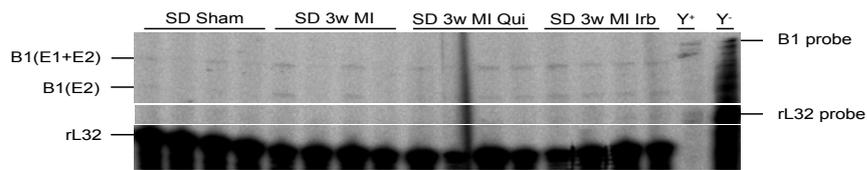
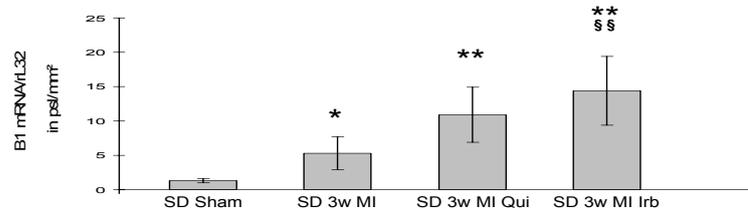
A**B**

Abb. 4.59 B_1R -mRNA-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikels drei Wochen nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtypmatten ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham, ** $P<0.01$ vs. Sham, §§ $P<0.01$ vs. MI. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

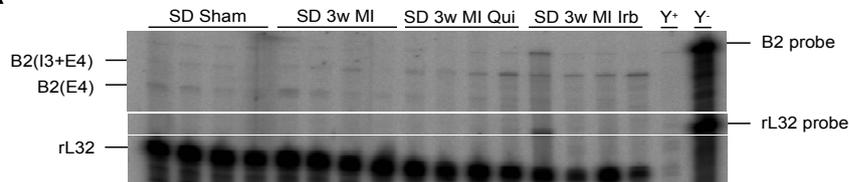
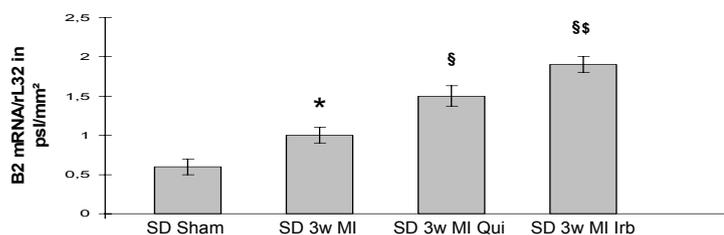
A**B**

Abb. 4.60 B_2R -mRNA-Expression im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham, § $P<0.05$ vs. MI, § $P<0.05$ vs. MI Qui. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

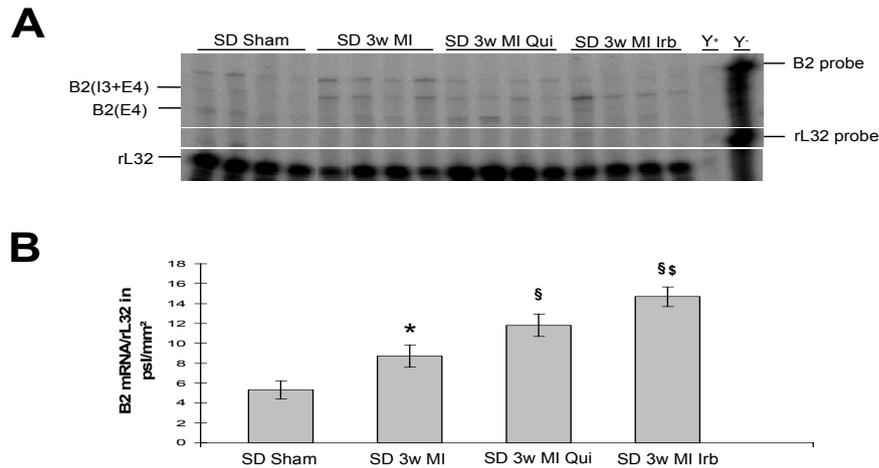


Abb. 4.61 B_2R -mRNA-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikels 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham, § $P<0.05$ vs. MI, § $P<0.05$ vs. MI Qui. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

4.3.3.3.1.4. Protein-Expression der Bradykinin-Rezeptoren im linken Ventrikel 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Drei Wochen nach MI zeigte das Nicht-Infarktgebiet des LV einen tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Unterschied in der Proteinexpression des B_1R (Abb. 4.62) und des B_2R (Abb. 4.64) im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen. Auch das Infarktgebiet wies einen tendenziellen, aber nicht signifikanten Unterschied in der B_1R - (Abb. 4.63) und B_2R -Expression (Abb. 4.65) im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollen auf. Die Behandlung mit dem AT_1R -Antagonisten Irbesartan bewirkte im Nicht-Infarktgebiet eine 9220% höhere B_1R -Proteinexpression ($P>0,05$) als bei den unbehandelten infarzierten Tiere (Abb. 4.62), im Infarktgebiet 1900% ($P>0,001$) höher (Abb. 4.63). Auch bei der B_2R -Proteinexpression führte die Behandlung mit Irbesartan im Nicht-Infarktgebiet zum Anstieg der Proteinexpression um 350% ($P>0,001$) im Vergleich zu den unbehandelten infarzierten Tiere (Abb. 4.64). Im Infarktgebiet offenbarte sich eine 280% ($P>0,01$) höhere Proteinexpression wie die unbehandelten infarzierten Tiere (Abb. 4.65).

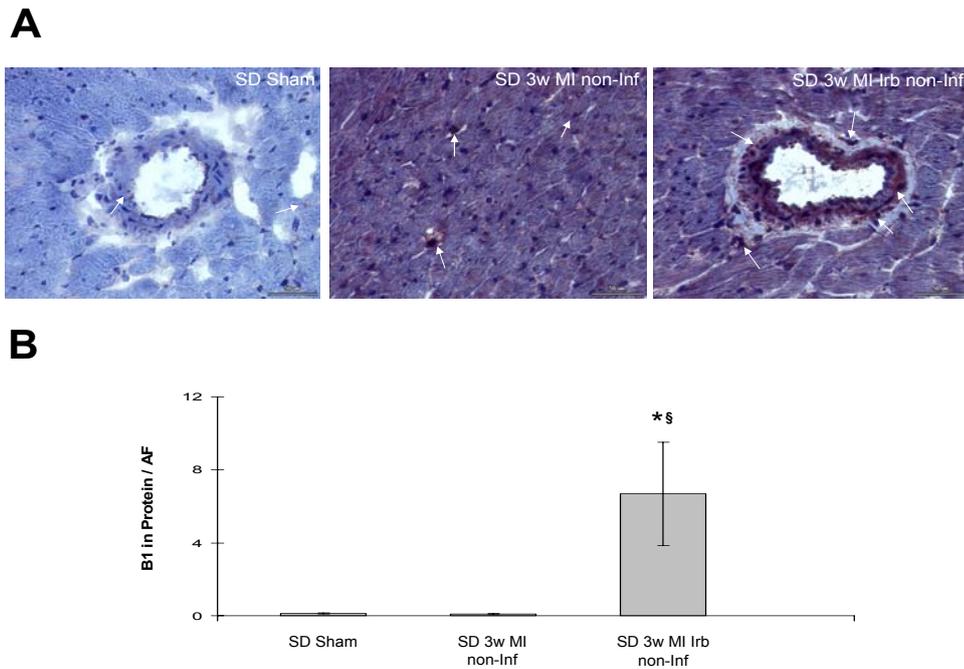


Abb. 4.62 B_1R -Proteinexpression im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels im Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_1R -Proteinexpression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -Proteinexpression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, AF – Flächenfraktion.

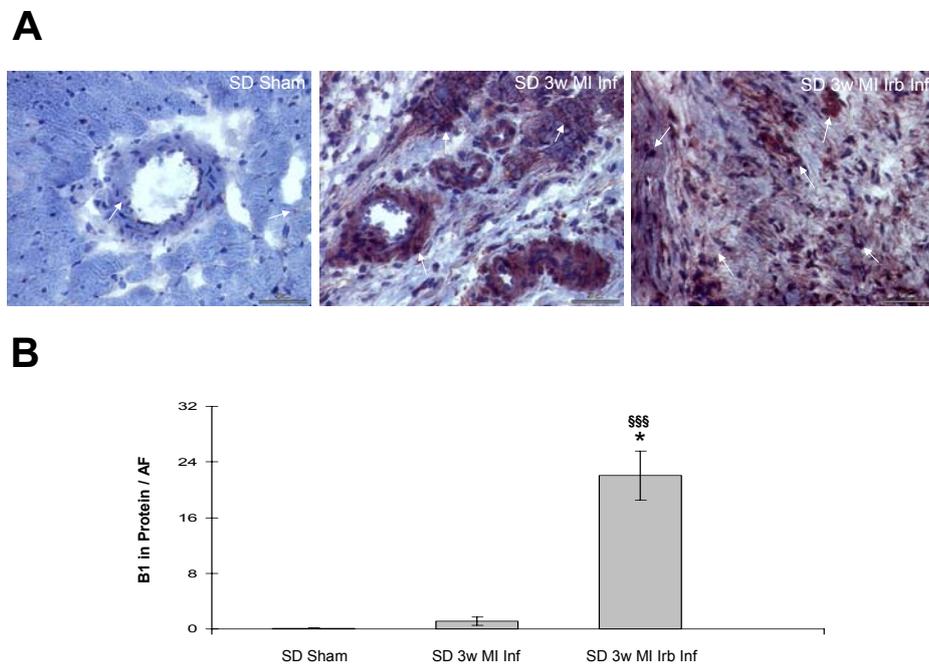


Abb. 4.63 B_1R -Protein-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikels im Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_1R -Proteinexpression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -Proteinexpression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, AF – Flächenfraktion.

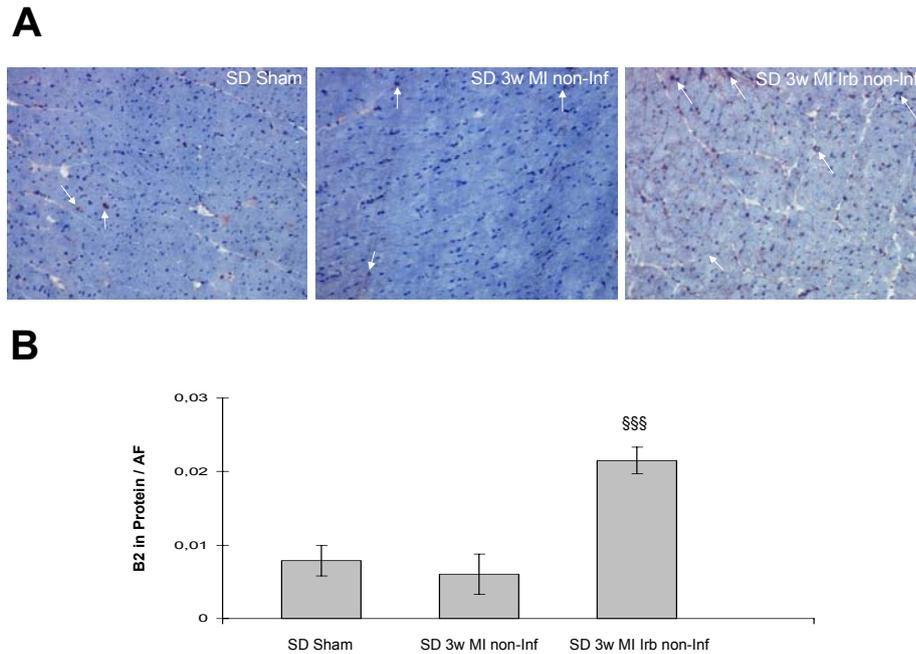


Abb. 4.64 B_2R -Proteinexpression im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels im Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_2R -Proteinexpression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -Proteinexpression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, AF – Flächenfraktion.

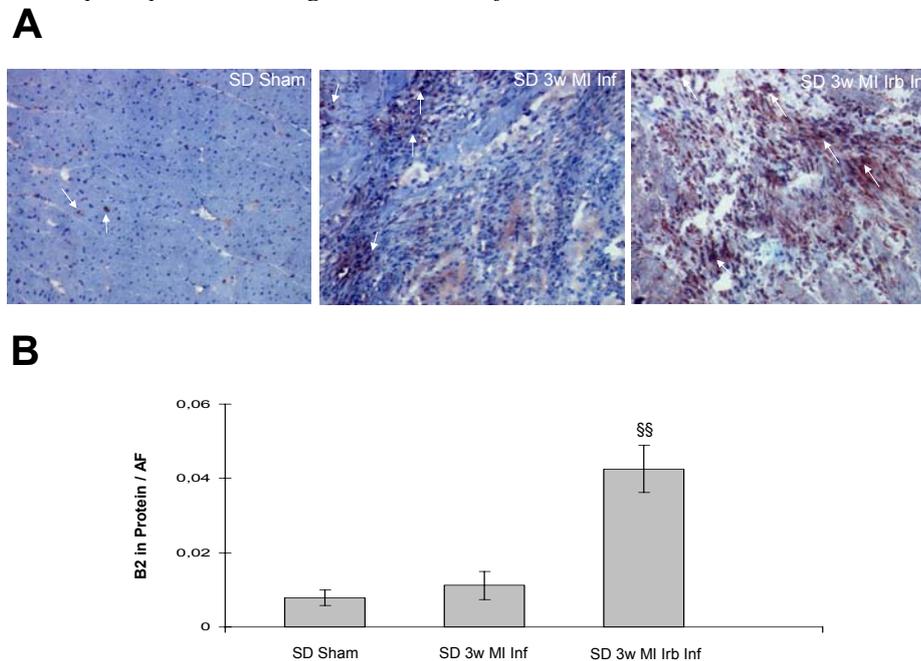


Abb. 4.65 B_2R -Protein-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikels im Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentative Bilder der immunhistologischen Färbung: B_2R -Proteinexpression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -Proteinexpression ($n=6$). ** $P<0.01$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, AF – Flächenfraktion.

4.3.3.3.1.5. Expression von Kollagen im linken Ventrikel 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Veränderungen der extrazellulären Matrix tragen durch Akkumulation von durch Fibroblasten gebildetem Kollagen zur Wandsteife der Ventrikel bei (Riva et al., 1998). Da Kollagen I und III den größten Anteil am myokardialen Kollagen ausmachen (Pelouch et al., 1993), wurde auch die Kollagen I (Col I)-mRNA-Expression studiert.

Im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels ist drei Wochen nach Induktion des Myokardinfarkt die Kollagen I-mRNA-Expression signifikant um 650% ($P < 0,05$) höher als bei den zeitgleich scheinoperierten Tieren. Die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor oder mit dem AT_1R -Blocker führt zu keinem Unterschied in der Kollagen I-mRNA-Expression im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels (Abb. 4.66).

Im Infarktgebiet des linken Ventrikels zeigt sich, drei Wochen nach Induktion des Myokardinfarkt, die Kollagen I-mRNA-Expression signifikant um 590% ($P < 0,01$) höher als bei den zeitgleich scheinoperierten Tieren. Die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor führt zu keiner Änderung der Kollagen I-mRNA-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikels. Jedoch senkt die Behandlung mit dem AT_1R -Blocker Irbesartan die mRNA-Expression des Kollagen I signifikant um 70% ($P < 0,05$) im Infarktgebiet des linken Ventrikels (Abb. 4.67).

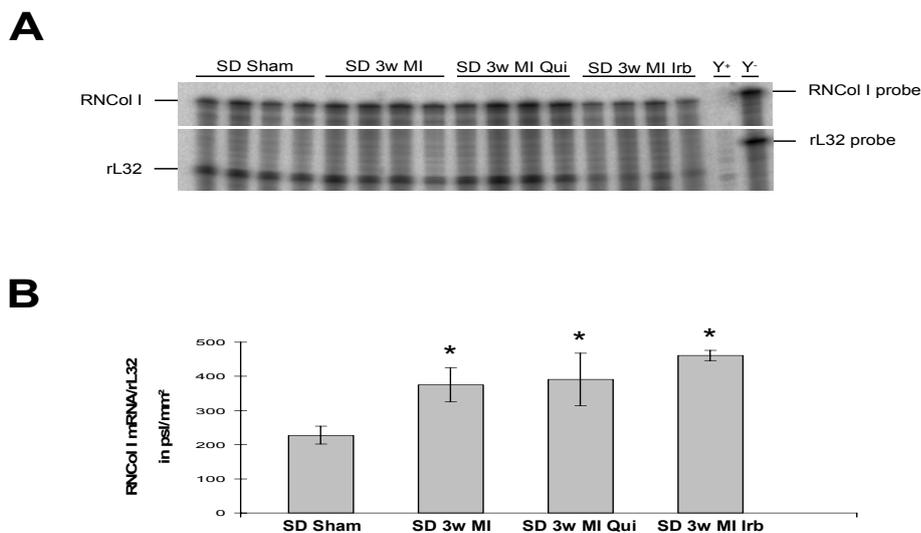


Abb. 4.66 Kollagen I-mRNA-Expression im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): Kollagen I- (315bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der Kollagen I-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0,05$ vs. Sham. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

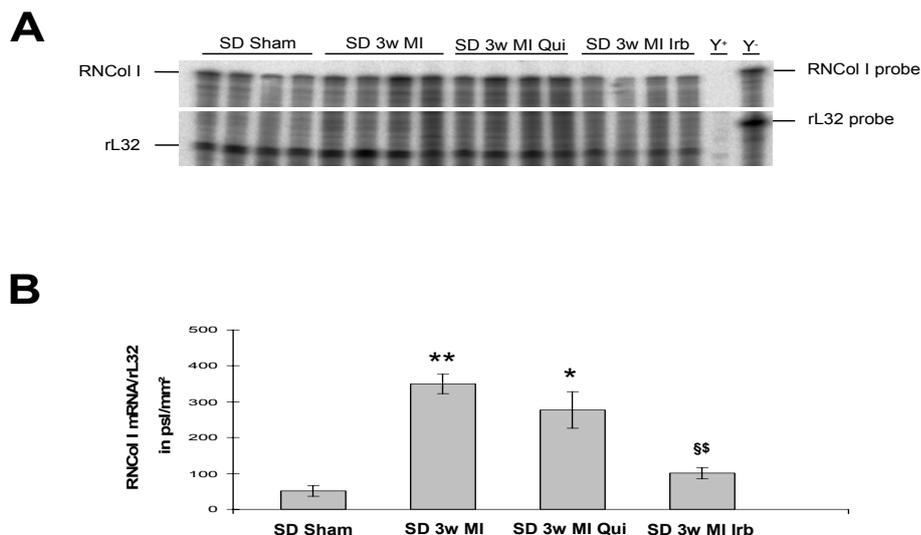


Abb. 4.67 Kollagen I-mRNA-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT₁R-Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA (n=4): Kollagen I- (315bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der Kollagen I-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0.05$ vs. Sham, ** $P < 0.01$ vs. Sham, § $P < 0.05$ vs. MI, § $P < 0.05$ vs. MI Qui. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

4.3.3.3.1.6. Expression von ACE im linken Ventrikel 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Drei Wochen nach MI war die ACE-mRNA-Expression im gesamten LV um 160% ($P < 0,01$) höher als bei scheinoperierten Tieren. Die Quinaprilbehandlung verringerte (65%; $P < 0,01$) die Expression, die mit Irbesartan hatte keinen Einfluss (Abb. 4.68). Im Infarktgebiet des LV war die Expression nach MI (85%; $P < 0,01$) höher als bei Kontrolltieren. Auch bewirkte die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor eine (30%; $P < 0,05$) geringere Expression. Bei den Irbesartan behandelten Tiere wurde im Infarktgebiet eine 50% ($P < 0,05$) geringere Expression als bei den unbehandelten Tieren gemessen. Dies kann nicht auf die Behandlung zurückgeführt werden, da diese keinen direkten Einfluss auf die ACE-Expression hat (Abb. 4.69). Im Infarkt des LV war nach MI die Expression signifikant um 100% ($P < 0,05$) höher wie im Nicht-Infarktgebiet des LV (Abb. 4.70, 4.71). Die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor bewirkte eine 40% ($P < 0,05$) geringere ACE-mRNA-Expression im Infarktgebiet. Jedoch hatte die Gabe von Quinapril im Nicht-Infarktgebiet keinen Einfluss auf die Expression (Abb. 4.70). Die Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten zeigte keinen Einfluss auf die Expression im Infarktgebiet. Im Nicht-Infarktgebiet wurde jedoch eine 150% ($P < 0,01$) höhere Expression detektiert (Abb. 4.71). Die Expression wurde im gesamten LV nicht durch die Gabe von Irbesartan beeinflusst, jedoch im Nicht-Infarktgebiet hochreguliert, was nur auf einen indirekten Einfluss zurückgeführt werden kann.

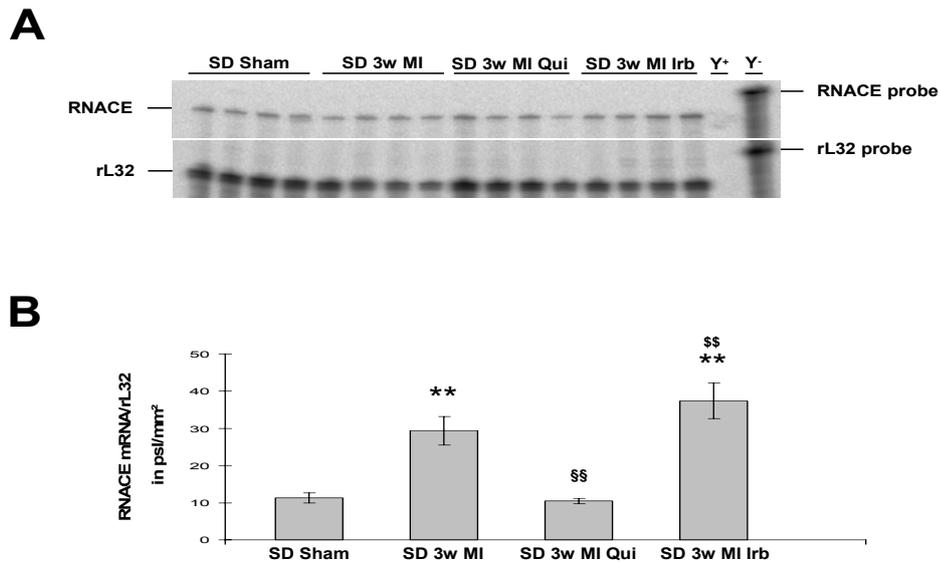


Abb. 4.68 ACE-mRNA-Expression im linken Ventrikel des Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): ACE- (261bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der ACE-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P<0.01$ vs. Sham, §§ $P<0.05$ vs. MI, §§§ $P<0.001$ vs. MI Qui. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

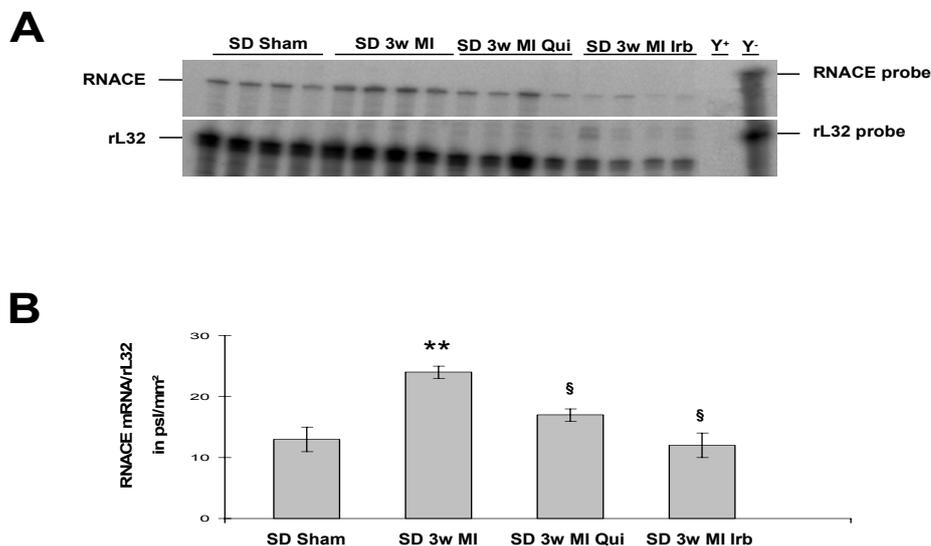


Abb. 4.69 ACE-mRNA-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril bzw. dem AT_1R -Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): ACE- (261bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der ACE-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P<0.01$ vs. Sham, § $P<0.05$ vs. MI. SD Sham – Wildtyp scheinoperiert, SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag.

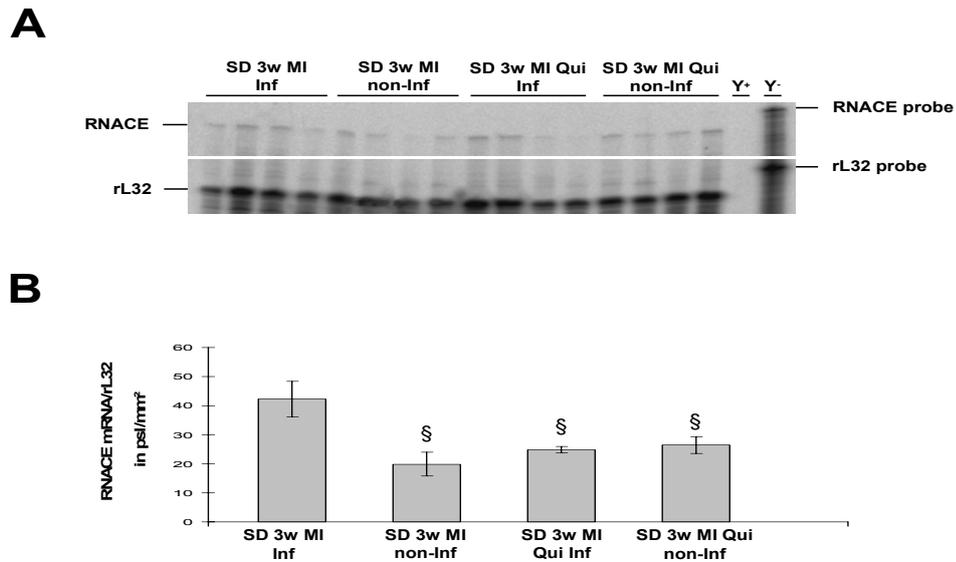


Abb. 4.70 ACE-mRNA-Expression im Infarktgebiet und Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril. A. Repräsentativer RPA (n=4): ACE- (261bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der ACE-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P < 0.05$ vs. MI Inf. SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, Inf – Infarktgebiet des linken Ventrikels, non-Inf – Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels.

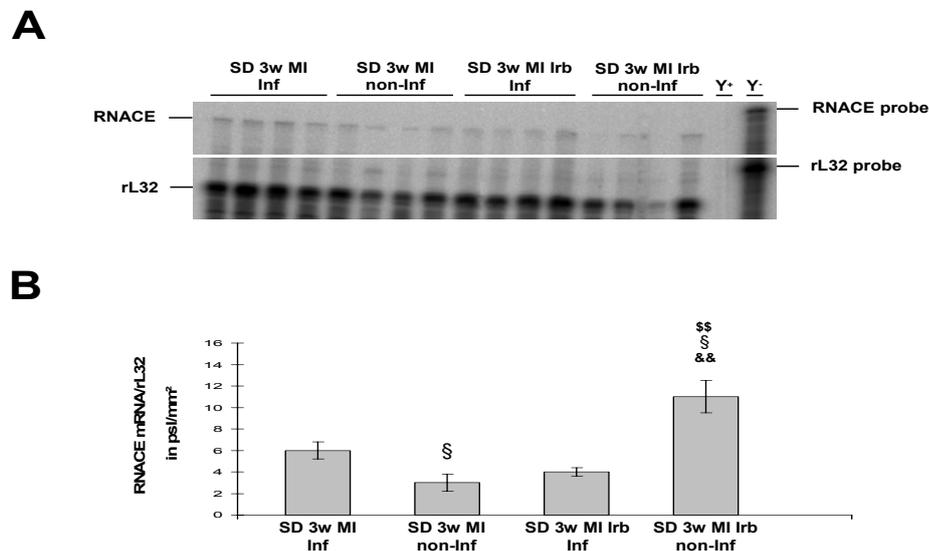


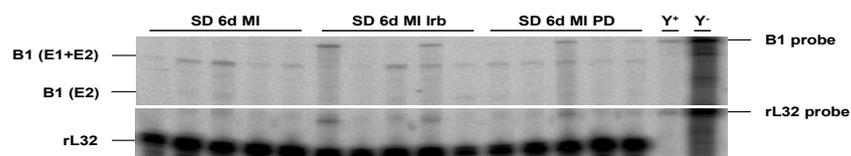
Abb. 4.71 ACE mRNA-Expression im Infarktgebiet und Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT_1 -Rezeptor-Antagonist Irbesartan. A. Repräsentativer RPA (n=4): ACE (261bp) und rL32 (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der ACE mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P < 0.05$ vs. MI Inf, §§ $P < 0.01$ vs. MI non-Inf, && $P < 0.01$ vs. MI Irb Inf. SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, Inf – Infarktgebiet des linken Ventrikels, non-Inf – Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels.

4.3.3.3.2. Behandlung mit AT₂-Rezeptor-Antagonist

4.3.3.3.2.1. Expression der Bradykinin-Rezeptoren und von Kollagen 6 Tage nach Myokardinfarkt

Die Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten bewirkte im LV der infarzierten Ratten eine 115% höhere ($P < 0,05$) mRNA-Expression des B₁R im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Die mit dem AT₂R-Antagonisten behandelten Tiere wiesen eine 95% ($P < 0,05$) höhere Expression auf (Abb. 4.72). Die B₂R-mRNA-Expression stieg nach Behandlung mit dem ACE-Inhibitor um 65% ($P < 0,01$) im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, nach Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten stieg sie um 120% ($P < 0,05$). Die Behandlung mit dem AT₂R-Antagonisten erhöhte die Expression (170%; $P < 0,05$) im Vergleich zu den nicht behandelten Ratten (Abb. 4.73). Sechs Tage nach MI zeigte sich keine Veränderung der Kollagen I-mRNA-Expression, ebenso nicht durch die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor bzw. mit dem AT₁R-Blocker. Die Behandlung mit dem AT₂R-Blocker erhöhte die Expression (45%; $P < 0,05$) (Abb. 4.74).

A



B

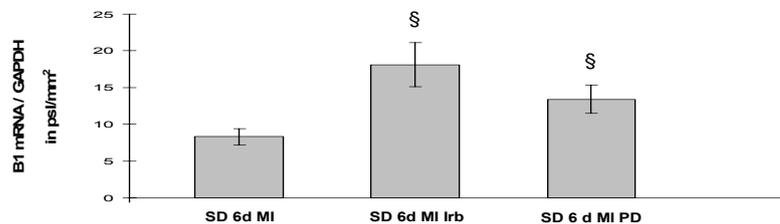


Abb. 4.72 *B₁R-mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem AT₁R-Antagonist Irbesartan bzw. dem AT₂R-Antagonist PD123319. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P < 0,05$ vs. MI. SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI PD – Wildtyp 6 Tage nach MI mit PD123319 ab 2. postoperativem Tag.*

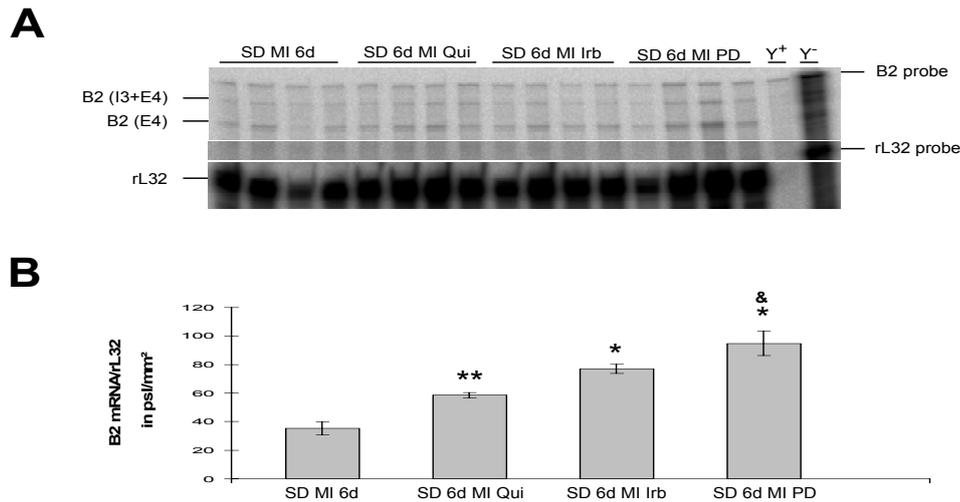


Abb. 4.73 *B₂R*-mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril, mit dem AT₁R-Antagonist Irbesartan bzw. mit dem AT₂R-Antagonist PD123319. A. Repräsentativer RPA (n=4): *B₂R*- (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *B₂R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P < 0.05$ vs. MI, §§ $P < 0.01$ vs. MI. SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Qui – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI PD – Wildtyp 6 Tage nach MI mit PD123319 ab 2. postoperativem Tag.

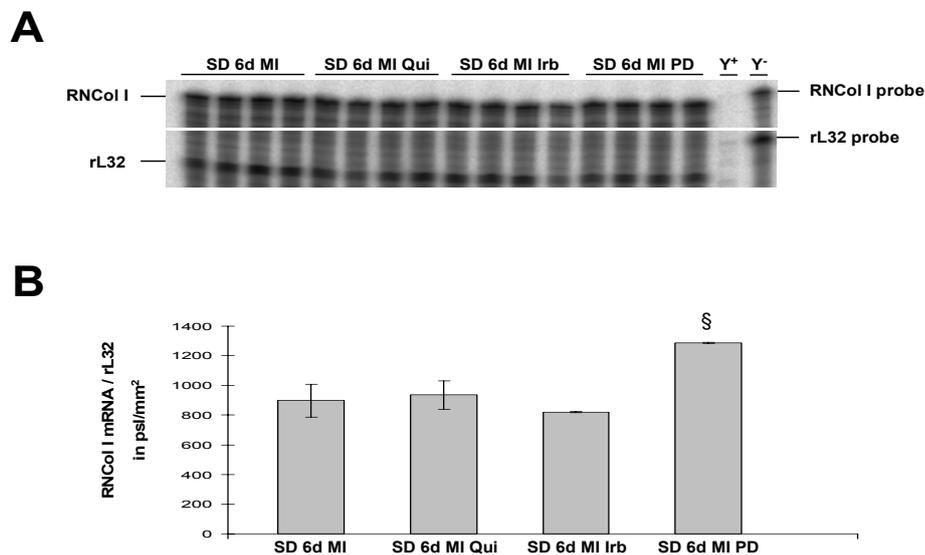


Abb. 4.74 *Kollagen I*-mRNA-Expression im linken Ventrikel des Herzens 6 Tage nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril, mit dem AT₁R-Antagonist Irbesartan bzw. mit dem AT₂R-Antagonist PD123319. A. Repräsentativer RPA (n=4): *Kollagen I*- (315bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *Kollagen I*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P < 0.05$ vs. MI. SD 6d MI – Wildtyp 6 Tage nach MI, SD 6d MI Qui – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI Irb – Wildtyp 6 Tage nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, SD 6d MI PD – Wildtyp 6 Tage nach MI mit PD123319 ab 2. postoperativem Tag.

4.3.3.3.2. Expression des B₂-Rezeptors 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Im LV der infarzierten mit Quinapril-behandelten Tiere zeigte sich eine 45% höhere ($P < 0,05$) mRNA-Expression des B₂R im Vergleich zu den unbehandelten. Bei den AT₁R-Antagonisten behandelten Tieren wurden eine 110% ($P < 0,01$) höhere Expression im Vergleich zu den nicht behandelten infarzierten Tieren gemessen. Durch die Behandlung mit den AT₂R-Antagonisten konnte eine 150% ($P < 0,05$) höhere Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.75).

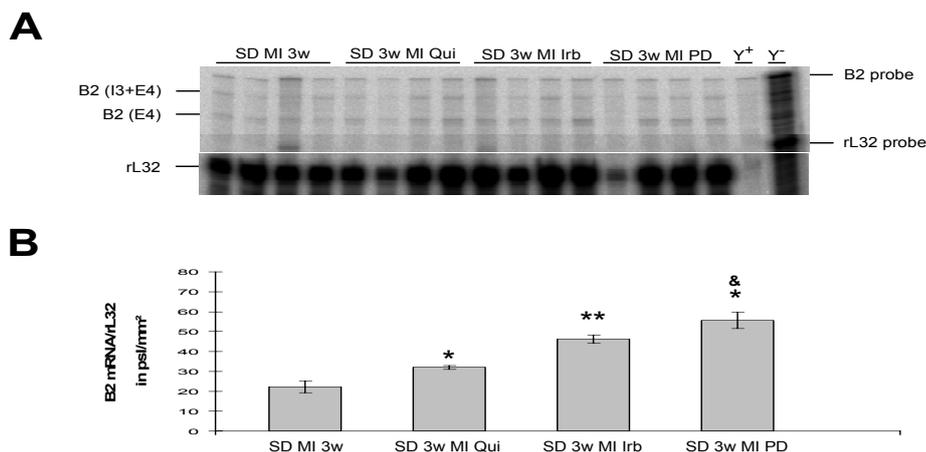


Abb. 4.75 B₂R-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ACE-Inhibitor Quinapril, mit dem AT₁R-Antagonist Irbesartan bzw. mit dem AT₂R-Antagonist PD123319. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₂R- (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B₂R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P < 0,05$ vs. MI, §§ $P < 0,01$ vs. MI. SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI Qui – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Quinapril ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI Irb – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit Irbesartan ab 2. postoperativem Tag, SD 3w MI PD – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit PD123319 ab 2. postoperativem Tag.

4.3.3.3.3. Behandlung mit ICE-Inhibitor

Kurz nach dem MI exprimiert das Herz verstärkt Zytokine, wie Interleukin 1 β (IL1 β) (Barbul *et al.*, 1990; Lowry *et al.*, 1993). Sie sind in der Lage, die Expression der BKR zu modulieren (Pagaelow *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1998). Um den direkten Einfluss von IL1 β auf die Expression der beiden Rezeptoren zu untersuchen, wurden Tiere ab dem ersten postoperativen Tag mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480 behandelt.

4.3.3.3.3.1. Expression der Bradykinin-Rezeptoren 6 Stunden nach Myokardinfarkt

Die Induktion des Myokardinfarktes beeinflusste die Herzfunktion negativ (Daten siehe 3.3.3.1.; Tab. 4.10). Im LV konnte in 30mg Gesamt-RNA keine mRNA-Expression des B₁R detektiert werden, jedoch in der Positiv-Kontrolle Ileum (Abb. 4.76). Im Gegensatz

dazu war sechs Stunden nach Induktion des MI die B_2R -mRNA-Expression um 465% ($P<0,01$) erhöht. Die Behandlung mit dem ICE-Inhibitor senkte diese um 55% ($P<0,01$) (Abb. 4.77).

A

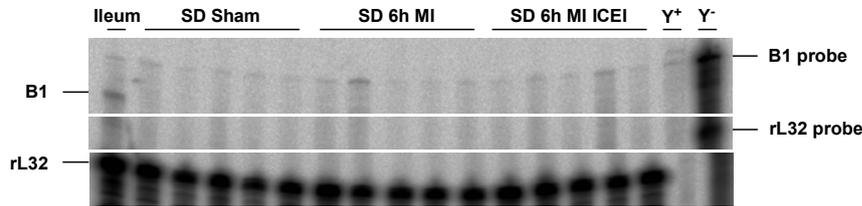
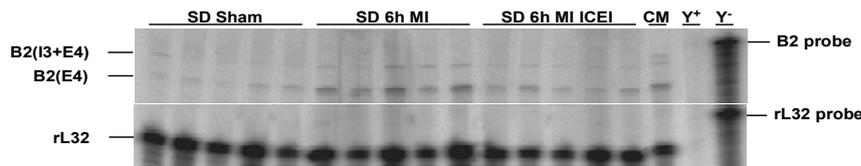


Abb. 4.76 B_1R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Stunden nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. SD Sham – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD 6h MI – Wildtyp 6 Stunden nach MI, SD 6h MI ICEI – Wildtyp 6 Stunden nach MI mit HMR3480 ab 1. postoperativem Tag.

A



B

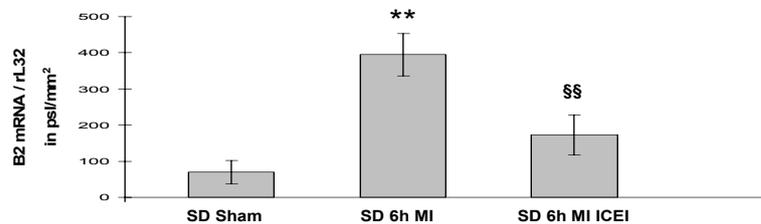


Abb. 4.77 B_2R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Stunden nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0,05$ vs. Sham; ** $P<0,01$ vs. Sham, §§ $P<0,01$ vs. MI. SD Sham – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD 6h MI – Wildtyp 6 Stunden nach MI, SD 6h MI ICEI – Wildtyp 6 Stunden nach MI mit HMR3480 ab 1. postoperativem Tag.

4.3.3.3.2. Expression der Bradykinin-Rezeptoren 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Im LV der infarzierten Ratten die mit ICE-Inhibitor behandelt wurden, zeigte sich nach Induktion des MI eine 65% ($P<0,05$) geringere mRNA-Expression des B_1R (Abb. 4.78). Die B_2R -mRNA-Expression sank um 45% durch Gabe des ICE-Inhibitors (Abb. 4.79).

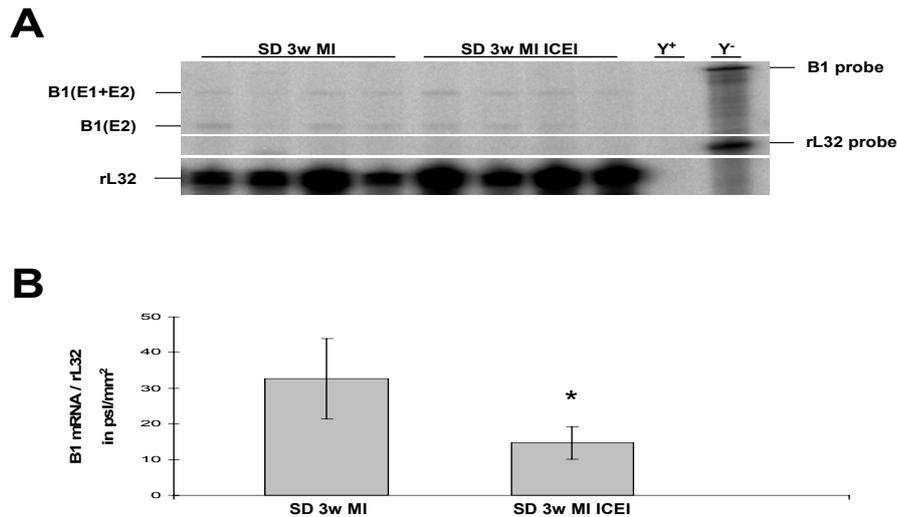


Abb. 4.78 B_1R -mRNA-Expression im LV des Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. § $P<0.05$ vs. MI. SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI ICEI – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit HMR3480 ab 1. postoperativem Tag.

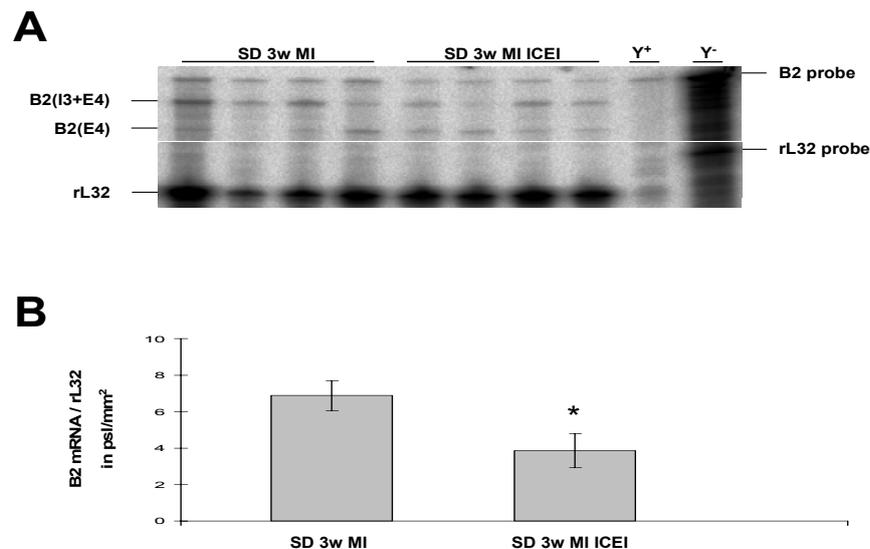


Abb. 4.79 B_2R -mRNA-Expression im linken Ventrikel des Herzens 3 Wochen nach Induktion eines MI im Wildtyp ohne und mit dem ICE-Inhibitor HMR 3480. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. SD 3w MI – Wildtyp 3 Wochen nach MI, SD 3w MI ICEI – Wildtyp 3 Wochen nach MI mit HMR3480 ab 1. postoperativem Tag.

4.3.3.4. Induktion des Myokardinfarktes bei AT_1R -transgenen Tiere

Da die Blockade des AT_1R mit dem AT_1R -Antagonisten Irbesartan (siehe 4.2.3.2.1.) untersucht wurde, sollte auch eine verstärkte Expression des AT_1R verfolgt werden. Da in den letzten Jahren der Einsatz von transgenen Tieren in der Forschung neue

Erkenntnisse gebracht hat, wurden beispielsweise Tiere gezüchtet, die zusätzlich bestimmte Gene exprimieren. Dazu gehören auch die TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten (Hoffmann *et al.*, 1996), die für diese Versuche genutzt wurden. Sie exprimieren zusätzlich den humanen AT₁R. Bei diesen Ratten wird die Expression des humanen AT₁R durch den α MHC-Promotor kontrolliert, der diesen speziell im Herzen hochreguliert. Dieser Promotor ist jedoch maximal drei Monate aktiv, weshalb für die Versuche Tiere verwendet wurden, die erst sechs Wochen alt waren. Die Kontrolltiere wurden altersgleich genutzt.

4.3.3.4.1. Kardiale Charakterisierung 6 Tage nach Myokardinfarkt

Der Herzindex war bei den infarzierten Wildtyptieren im Vergleich zum scheinoperierten Wildtyp (15%; $P < 0,05$) erhöht, ebenso bei den transgenen Tieren (15%; $P < 0,05$). Der LVP war bei der infarzierten Wildtypgruppe signifikant geringer (35%, $P < 0,001$) wie bei der Kontrollgruppe, auch bei den transgenen Tieren (25%; $P < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen. Die dP/dt_{max} war bei den infarzierten Wildtyppratten um 35% geringer ($P < 0,001$) als bei den Kontrollen, dP/dt_{min} um 25% ($P < 0,05$). Die transgenen Ratten zeigten nach Induktion des MI eine geringere dP/dt_{max} (20%; $P < 0,01$), auch dP/dt_{min} verringerte sich (30%; $P < 0,001$) im Vergleich zu den Kontrollen. Die Induktion des MI bewirkte bei Wildtyp- und transgenen Ratten eine Verschlechterung der Herzfunktion. Die zusätzliche Expression des humanen AT₁R bewirkte keinen Unterschied (Tab. 4.13).

	SD Sham	SD MI 6d	AT ₁ Sham	AT ₁ MI 6d
Herzindex [mg/g]	3,9 ± 0,01	4,5 ± 0,02*	3,8 ± 0,03	4,3 ± 0,02 [#]
LVP [mm Hg]	82 ± 5,0	55 ± 2,5***	82 ± 3,0	61 ± 1,8 ^{###}
dP/dt_{max} [mmHg/s]	4656 ± 375	3111 ± 181***	4459 ± 202	3460 ± 140 ^{##}
dP/dt_{min} [mmHg/s]	-3221 ± 562	-2411 ± 218*	-3445 ± 166	-2523 ± 138 ^{###}

Tab. 4.13 Kardiale Charakterisierung der Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten 6 Tage nach Induktion des MI. Es wurden Herzindex, LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} gemessen ($n=6-8$). * $P < 0,05$ vs. Sham; *** $P < 0,001$ vs. Sham; # $P < 0,05$ vs. AT₁ Sham; ## $P < 0,01$ vs. AT₁ Sham; ### $P < 0,001$ vs. AT₁ Sham. SD Sham 6d – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD MI 6d – Wildtyp 6 Tage nach MI, AT₁ Sham – AT₁R-Transgene 6 Tage nach Scheinoperation, AT₁ MI 6d – AT₁R-Transgene 6 Tage nach MI, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.

4.3.3.4.2. Expression der Bradykinin-Rezeptoren 6 Tage nach Myokardinfarkt

Die infarzierten Wildtyppratten wiesen keinen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression des B₁R auf, jedoch exprimierten die transgenen infarzierten Tiere weniger (80%; $P < 0,05$) im Vergleich zu ihren Kontrollen. Der Vergleich von Wildtyp und Transgenen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.80). Die B₂R-mRNA-Expression stieg nach der Induktion des MI beim Wildtyp (50%; $P < 0,05$) und den

transgenen Tieren (50%; $P < 0,01$) im Vergleich zu den Kontrollen. Infarzierte Transgene im Vergleich mit infarzierten Wildtyp-Tieren offenbarten eine höhere Expression (25%; $P < 0,05$) (Abb. 4.81).

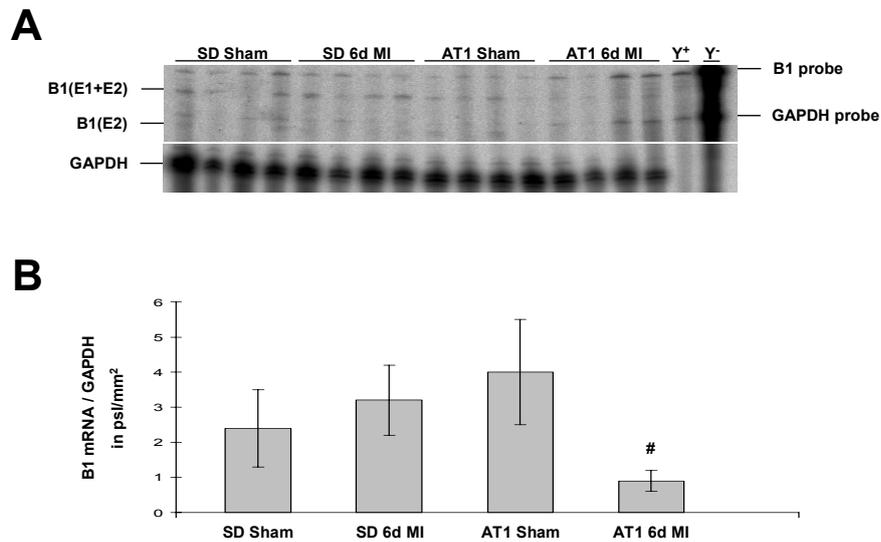


Abb. 4.80 B_1R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC- hAT_1)-Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_1R - (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_1R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. # $P < 0,05$ vs. AT1 Sham. SD Sham 6d – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD MI 6d – Wildtyp 6 Tage nach MI, AT1 Sham – AT_1R -Transgene 6 Tage nach Scheinoperation, AT1 MI 6d – AT_1R -Transgene 6 Tage nach MI.

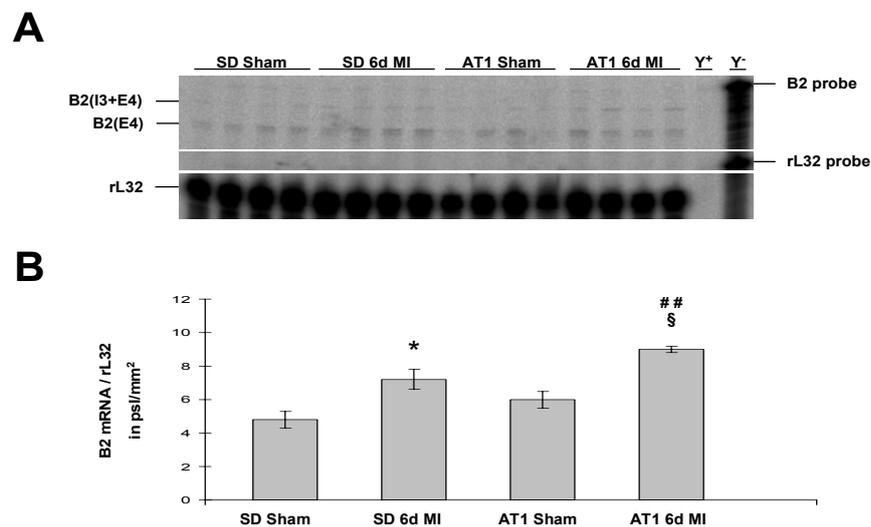


Abb. 4.81 B_2R -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC- hAT_1)-Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): B_2R - (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0,05$ vs. Sham, § $P < 0,05$ vs. MI, ## $P < 0,01$ vs. AT1 Sham. SD Sham 6d – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD MI 6d – Wildtyp 6 Tage nach Mi, AT1 Sham – AT_1R -Transgene 6 Tage nach Scheinoperation, AT1 MI 6d – AT_1R -Transgene 6 Tage nach MI.

4.3.3.4.3. Expression von Interleukin 1 β und des AT₁-Rezeptors 6 Tage nach Myokardinfarkt

Nach MI wurde beim Wildtyp (650%; $P < 0,05$) und Transgenen (130%; $P < 0,05$) eine höhere IL1 β -mRNA-Expression nachgewiesen. Der Vergleich von Wildtyp und Transgenen ergab nach Scheinoperation schon eine erhöhte (220%; $P < 0,05$) Expression. Nach der Induktion des MI ist die Expression bei den Transgenen im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren unverändert (Abb. 4.82). Durch die Induktion des MI konnte im LV der transgenen Tiere eine 100% ($P < 0,01$) höhere Ratten-AT₁R-mRNA-Expression ermittelt werden. Die Wildtyp-Tiere zeigten danach keine Änderung der Expression. Der humane AT₁R konnte in den transgenen Tieren nachgewiesen werden und sank dort nach der Induktion des MI um 50% ($P < 0,01$) (Abb. 4.83). Bei den Wildtyp-Tieren war wie zu erwarten, keine humane AT₁R-mRNA-Expression zu detektieren.

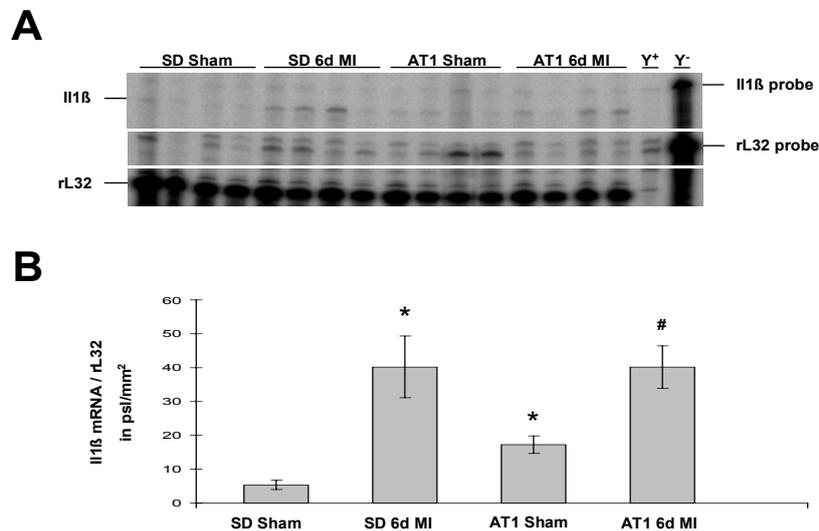


Abb. 4.82 IL1 β -mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): IL1 β - (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der IL1 β -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung der Daten wurden diese über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0,05$ vs. Sham, # $P < 0,05$ vs. AT1 Sham. SD Sham 6d – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD MI 6d – Wildtyp 6 Tage nach MI, AT1 Sham – AT₁R-Transgene 6 Tage nach Scheinoperation, AT1 MI 6d – AT₁R-Transgene 6 Tage nach MI.

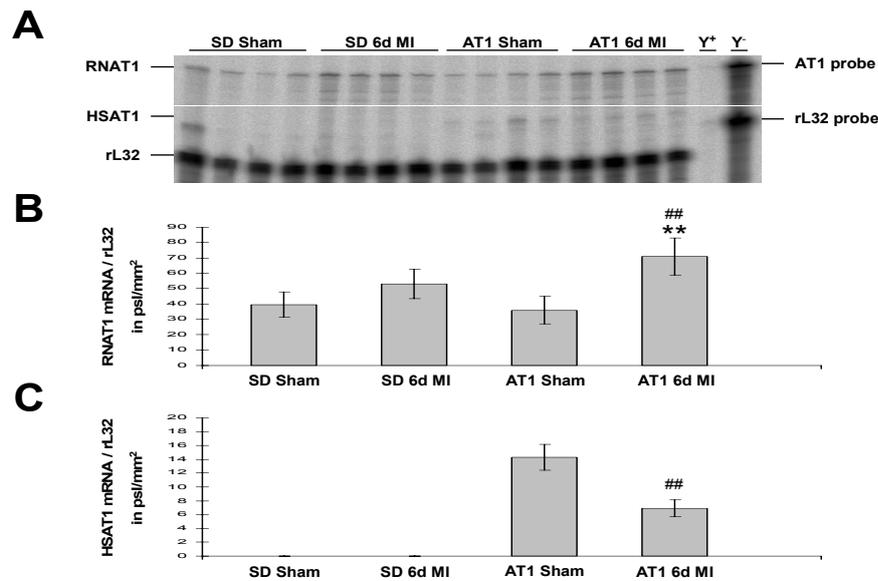


Abb. 4.83 *AT₁R-mRNA-Expression im linken Ventrikel 6 Tage nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): AT₁R-(352bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der murinen AT₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). C. Quantifizierung der humanen AT₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** P<0.01 vs. Sham, ## P<0.01 vs. AT1 Sham. SD Sham 6d – Wildtyp 6 Tage nach Scheinoperation, SD MI 6d – Wildtyp 6 Tage nach MI, AT1 Sham – AT₁R-Transgene 6 Tage nach Scheinoperation, AT1 MI 6d – AT₁R-Transgene 6 Tage nach MI.*

4.3.3.4.4. Kardiale Charakterisierung 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Durch die Induktion des MI erhöhte sich der Herzindex im Vergleich zu den scheinoperierten Wildtyp-tieren (17%; $P<0,01$) und Transgenen (25%; $P<0,01$). Der Vergleich der scheinoperierten Ratten zeigte einen höheren Herzindex durch die zusätzliche Expression des humanen AT₁R (15%; $P<0,01$), der Vergleich der infarzierten Ratten eine 20% ($P<0,01$) höheren. Der LVP war beim infarzierten Wildtyp und Transgenen geringer (35%, $P<0,001$). Die dP/dt_{max} (30%; $P<0,01$) und dP/dt_{min} (35%; $P<0,001$) waren beim infarzierten Wildtyp geringer. Die transgenen Ratten zeigten nach Induktion des MI ebenfalls eine geringere dP/dt_{max} (35%; $P<0,01$). Auch die dP/dt_{min} verringerte sich bei den Transgenen nach Myokardinfarkt (25%; $P<0,01$). Die Induktion des MI bewirkte bei den transgenen und den Wildtyp-ratten eine Beeinträchtigung der Herzfunktion. Die zusätzliche Expression des humanen AT₁R hatte schon unter basalen Bedingungen einen negativen Einfluss auf den Herzindex, nach MI verschlechterte diese die Herzfunktion noch weiter (Tab. 4.14).

	SD Sham	SD MI 3w	AT ₁ Sham	AT ₁ MI 3w
Herzindex [mg/g]	2,9 ± 0,07	3,4 ± 0,16**	3,3 ± 0,13**	4,1 ± 0,15**§§#
LVP [mm Hg]	84 ± 2,5	56 ± 1,5***	84 ± 2,6	59 ± 3,8###
dP/dt _{max} [mmg Hg/s]	4465 ± 317	3121 ± 182**	4888 ± 485	3108 ± 246*##
dP/dt _{min} [mmg Hg/s]	-3516 ± 149	-2279 ± 154***	-3577 ± 131 [§]	-2643 ± 253*##

Tab. 4.14 Kardiologische Charakterisierung der Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten 3 Wochen nach Induktion des MI. Es wurden Herzindex, LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} gemessen (n=6-8). * P<0.05 vs. Sham; ** P<0.01 vs. Sham; § P<0.05 vs. MI; ## P<0.01 vs. AT₁ Sham; ### P<0.001 vs. AT₁ Sham. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AT₁ Sham – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach Scheinoperation, AT₁ MI 3w – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach MI, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.

4.3.3.4.5. Expression der Bradykinin-Rezeptoren 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Im LV der infarzierten Wildtypmatten war kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression des B₁R im Vergleich zu den Kontrollen zu finden, jedoch exprimierten die transgenen infarzierten Tieren weniger (45%; P<0,05). Der Vergleich der Wildtypmatten mit den Transgenen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der B₁R-Expression auf (Abb. 4.84). Die B₂R-mRNA-Expression stieg nach des MI beim Wildtyp um 45% (P<0,05). Die transgenen Tiere zeigten ebenfalls nach MI eine erhöhte Expression (55%; P<0,05). Der Vergleich der infarzierten Transgenen, mit den infarzierten Wildtypmatten offenbarte eine höhere Expression (35%; P<0,05) (Abb. 4.85).

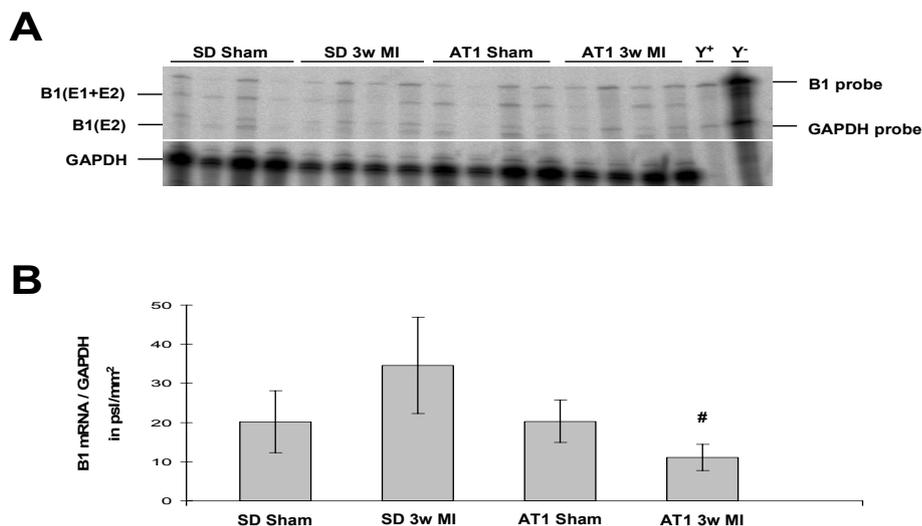


Abb. 4.84 B₁R-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (192bp und 257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. # P<0.05 vs. AT₁ Sham. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AT₁ Sham – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach Scheinoperation, AT₁ MI 3w – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach MI.

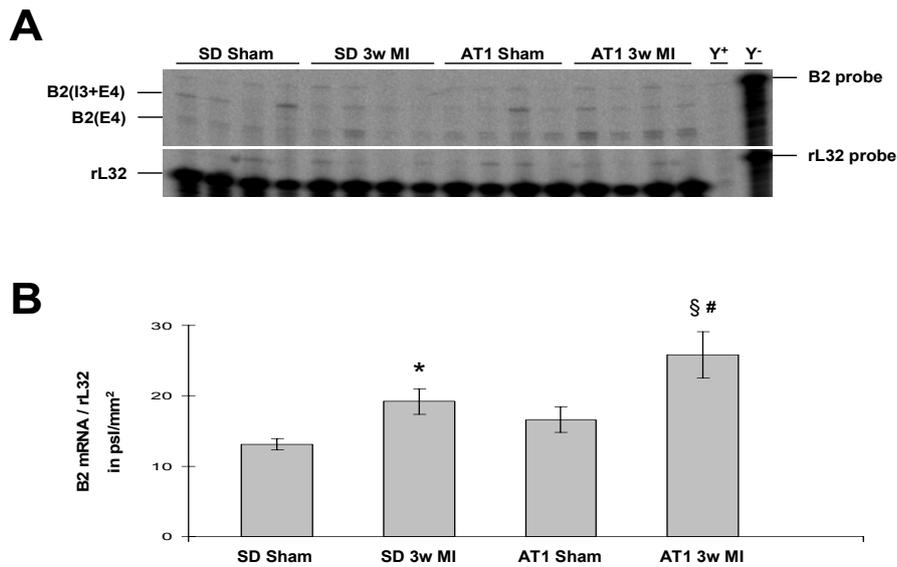


Abb. 4.86 *B₂R*-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): *B₂R*- (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der *B₂R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P < 0.05$ vs. Sham, § $P < 0.05$ vs. MI, # $P < 0.05$ vs. AT1 Sham. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AT1 Sham – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach Scheinoperation, AT1 MI 3w – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach MI.

4.3.3.4.6. Expression von Interleukin 1 β und des AT₁-Rezeptors 3 Wochen nach Myokardinfarkt

Nach Induktion des MI stieg im LV die IL1 β -mRNA-Expression um 425% ($P < 0,01$) beim Wildtyp und bei den Transgenen um 150% ($P < 0,01$). Die zusätzliche Expression des humanen AT₁R erhöhte (185%; $P < 0,05$) die IL1 β -mRNA-Expression unter basalen Bedingungen (Abb. 4.87). Der Vergleich vom Wildtyp mit den transgenen Tieren offenbarte keinen Unterschied. Nach Induktion des MI konnte im LV der transgenen Tiere eine 75% ($P < 0,01$) höhere Ratten-AT₁R-mRNA-Expression ermittelt werden. Die Wildtyp-tiere zeigten nach der MI ebenfalls eine höhere (35%; $P < 0,05$) Expression. Beim Vergleich der infarzierten Tiere wiesen die transgenen Tiere eine 40% ($P < 0,05$) höhere Expression auf. Der humane AT₁R konnte weder in den transgenen Tieren noch in den Wildtyp-tieren nachgewiesen werden (Abb. 4.88).

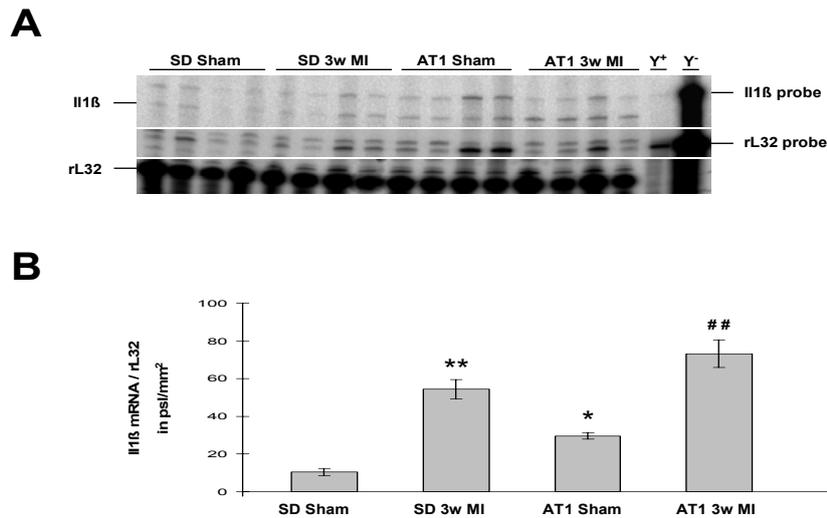


Abb. 4.87 *IL1 β -mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Scheinoperation und nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): IL1 β - (365bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der IL1 β -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * P<0.05 vs. Sham, ** P<0.01 vs. Sham, ## P<0.01 vs. AT1 Sham. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AT1 Sham – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach Scheinoperation, AT1 MI 3w – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach MI.*

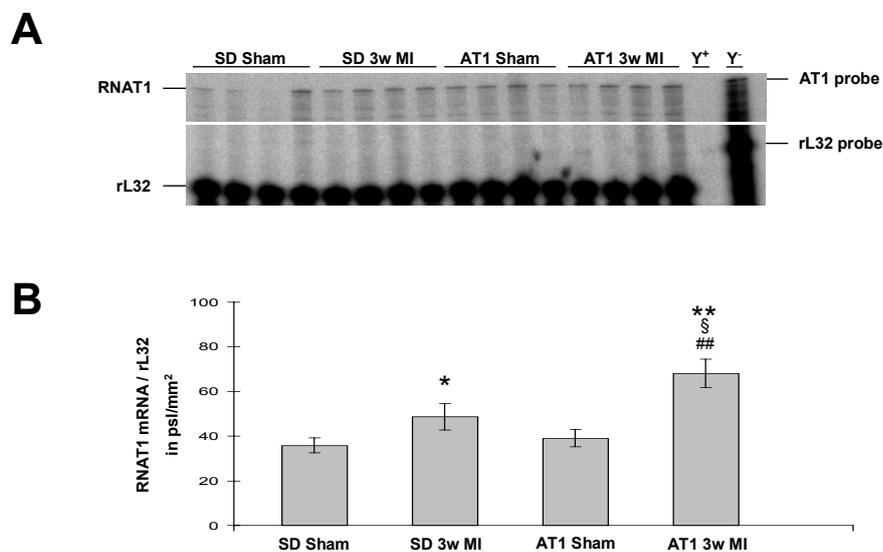


Abb. 4.88 *AT₁R-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Scheinoperation und nach Induktion eines MI in Wildtyp- und TGR(α MHC-hAT₁)-Ratten. A. Repräsentativer RPA (n=4): AT₁R- (352bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der Ratten-AT₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * P<0.05 vs. Sham, ** P<0.01 vs. Sham, § P<0.05 vs. MI, ## P<0.01 vs. AT1 Sham. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, AT1 Sham – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach Scheinoperation, AT1 MI 3w – AT₁R-Transgene 3 Wochen nach MI.*

4.3.3.5. KLK-transgene Tiere 3 Wochen nach Myokardinfarkt

4.3.3.5.1. Kardiologische Charakterisierung der infarzierten Tiere

Der LVP war beim infarzierten Wildtyp (25%, $P < 0,001$) geringer im Vergleich zu den Kontrollen, ebenfalls bei den transgenen Tieren (30%; $P < 0,05$). Der Vergleich der scheinoperierten Gruppen ergab eine Reduktion des LVP um 10% ($P < 0,01$). Die dP/dt_{max} war bei den infarzierten Wildtypmännchen um 40% geringer ($P < 0,001$) wie bei den Kontrollen und dP/dt_{min} um 30% ($P < 0,01$). Die transgenen Ratten zeigten nach der Induktion des MI eine geringere dP/dt_{max} (40%; $P < 0,05$) und dP/dt_{min} (34%; $P < 0,05$). Der Vergleich der scheinoperierten Gruppen zeigte eine geringere dP/dt_{max} (20%; $P < 0,01$) und dP/dt_{min} (37%; $P < 0,05$). Die Induktion des MI bewirkte eine Verschlechterung der Herzfunktion, die durch das aktivierte KKS nicht beeinflusst wurde (Tab. 4.15).

	SD Sham	SD MI 3w	KLK Sham 3w	KLK MI 3w
LVP [mm Hg]	86 ± 1,6	62 ± 2,4***	75 ± 1,5*	53 ± 4,5 [§]
dP/dt_{max} [mmHg/s]	5039 ± 150	3013 ± 187***	3968 ± 309*	2353 ± 300 [§]
dP/dt_{min} [mmHg/s]	-3336 ± 317	-2298 ± 221**	-3302 ± 222*	-1379 ± 180 [§]

Tab. 4.15 Kardiologische Charakterisierung des Wildtyps 3 Wochen nach Induktion des MI bei Wildtyp- und TGR(hKLK1)-Ratten. Es wurden Herzindex, LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} gemessen ($n=6-8$). * $P < 0,05$ vs. Sham; ** $P < 0,01$ vs. Sham; *** $P < 0,001$ vs. Sham; § $P < 0,05$ vs. KLK Sham. SD Sham – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, KLK Sham 3w – KLK-transgene Tiere 3 Wochen nach Scheinoperation, KLK 3w MI – KLK-transgene Tiere 3 Wochen nach MI, LVP – max. linksventrikulärer Druck, dP/dt_{max} – max. linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} – min. linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit.

4.3.3.5.2. Expression von Kollagen

Im LV der infarzierten Wildtypmännchen war die mRNA-Expression von Kollagen I um 235% ($P < 0,05$) höher. Die transgenen infarzierten Tiere exprimierten ebenfalls mehr (65%; $P < 0,05$) mRNA im Vergleich zu ihren Kontrollen. Der Vergleich der Wildtypmännchen mit den Transgenen offenbarte bei den scheinoperierten Tieren eine höhere (65%; $P < 0,05$) Expression (Abb. 4.89).

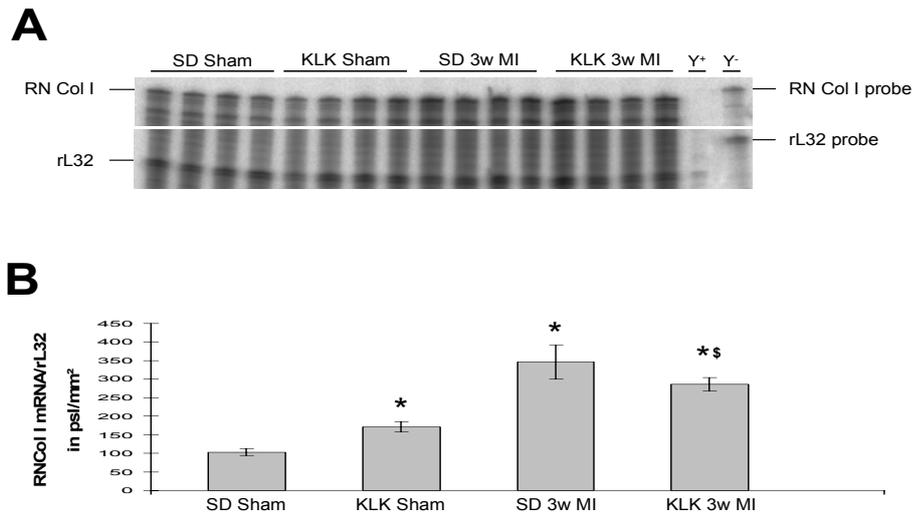


Abb. 4.89 Kollagen I-mRNA-Expression im linken Ventrikel 3 Wochen nach Scheinoperation bzw. nach Induktion eines MI in Wildtyp- und in KLK-transgenen Ratten. A. Repräsentativer RPA ($n=4$): Kollagen I- (315bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der Kollagen I-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0.05$ vs. Sham; § $P<0.05$ vs. KLK Sham. SD Sham 3w – Wildtyp 3 Wochen nach Scheinoperation, SD MI 3w – Wildtyp 3 Wochen nach MI, KLK Sham – KLK-Transgene 3 Wochen nach Scheinoperation, KLK MI 3w – KLK-Transgene 3 Wochen nach MI.

4.4. Regulation der Bradykinin-Rezeptoren in anderen Tiermodellen

Rezeptorantagonisten sind unverzichtbare Werkzeuge, um bestimmte Einflüsse des KKS auf die Expression der BK-Rezeptoren und die Interaktion mit dem RAS unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen, können aber den Rezeptor nur blockieren und nicht komplett ausschalten. Der Einsatz von transgenen Tieren, beispielsweise von Tieren, die bestimmte Gendefekte aufweisen und als ‚knockout‘-Tiere bezeichnet werden, hat in der Forschung zu neuen Erkenntnissen geführt. Mit diesen kann der Ausfall eines Genproduktes isoliert betrachtet werden, weshalb einige dieser Mausmodelle hier verwendet wurden. Aus den vereinten Ventrikeln wurde die Gesamt-RNA isoliert (3.2.1.) und diese mit dem RPA (3.2.4.) und den Sonden MMB1, MMB2, MMBNP und dem ‚house keeping‘-Gen rL32 (2.2.2.) untersucht. Die BNP-Expression wurde verfolgt, da eine eingeschränkte Herzleistung in der Regel mit einer Erhöhung der natriuretischen Peptide einhergeht und es als kardialer Marker gilt (Vasan *in situ*, 2002; Maisel *in situ*, 2003). Es wirkt über komplexe kardiovaskuläre, renale und zentrale Mechanismen und führt zur Gegenregulation bei Volumenexpansion und Druckbelastung des Herzens. Ebenso weist es natriuretische, diuretische und vasodilatatorische Eigenschaften auf. Im kardiovaskulären System führt es zur Senkung des peripheren Widerstandes, indem die Blutgefäße dilatatiert werden, was eine Senkung des Blutdruckes bewirkt (Holmes *in situ*, 1993).

4.4.1. Charakterisierung von AT₁-Rezeptor-defizienten Tieren

Da die pharmakologische Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan die B₁R-Expression nach dem MI hochregulierte (4.2.3.2.1.) und diese durch die zusätzliche Expression des humanen AT₁R bei den infarzierten TGR- α MHCAT1-Ratten runterreguliert wurde (4.2.3.4.), war die komplette Ausschaltung des AT₁R unter basalen Bedingungen von Interesse. Dazu wurden Mäuse genutzt, bei denen das AT₁R-Gen komplett ausgeschaltet ist (Ito *et al.*, 1995). Sie wurden genotypisiert, um die Defizienz des AT₁R („knockout“) zu überprüfen. Dazu wurde aus Ohrstückchen genomische DNA (3.1.5.) isoliert, diese in der PCR mit den Primern AT15 und AT13N (3.1.9.) zum Nachweis des Wildtyps und zum Nachweis der AT₁R-defizienten Tiere die Primer AT1TW33 und NeoTho eingesetzt. Die Tiere, die den AT₁R exprimieren (+/+) sind in Spur 1 bis 4 und 7 bis 8 (Abb. 4.90 A) zu sehen, die Tiere in Spur 5 und 6 exprimieren die Neo®-Kassette (-/-) (Abb. 4.90 B). Somit sind die Tiere in Spur 5 und 6 AT₁R-defizient („knockout“).

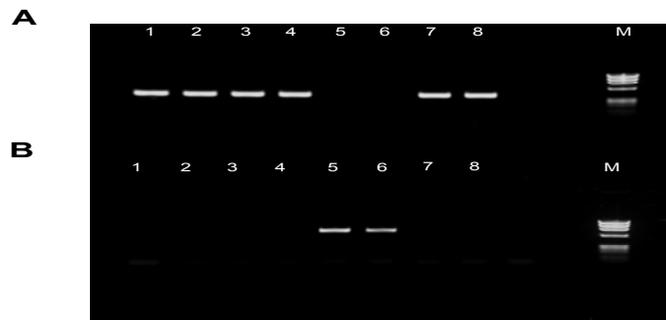


Abb. 4.90 Genotypisierung der AT₁R^{-/-}-Mäuse mittels PCR. Amplifizierte Proben der Ohrstückchen-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel. A. PCR zum Nachweis des Wildtypallels. B. PCR zum Nachweis der Insertion der Neo®-Kassette. Spur 5 und 6 – AT₁R^{-/-}-Mäuse; Spur 1 bis 4 und 7 bis 8 – Wildtyp. M – Marker.

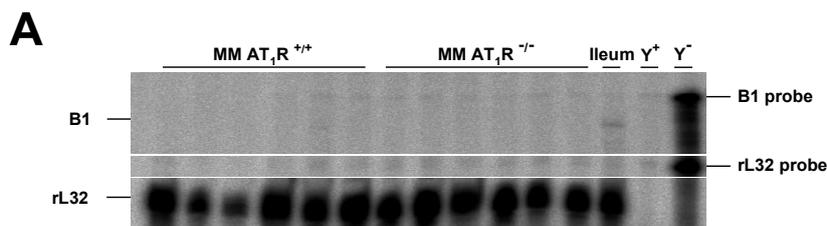


Abb. 4.91 B₁R-mRNA-Expression in den Ventrikeln von Wildtyp- und AT₁R-defizienten Mäusen. A. Repräsentativer RPA (n=6): B₁R- (268bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. MM AT₁R^{+/+} – Wildtyp; MM AT₁R^{-/-} – AT₁R-defiziente Mäuse.

In 30mg Gesamt-RNA konnte weder beim Wildtyp noch bei den „knockout“-Mäusen eine B₁R-mRNA-Expression nachgewiesen werden, jedoch in der Positivkontrolle (Abb. 4.91). Somit exprimierten die AT₁R-defizienten Mäuse entweder gar keine B₁R-mRNA oder nur unter der Nachweisgrenze.

4.4.2. Charakterisierung von B₁-Rezeptor-defizienten Tieren

Der induzierbare B₁R wird nur unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert (Marceau *in situ*, 1998; Aiguo *in situ*, 1998). Bisher nicht bekannt, wie sich der B₂R verhält, wenn der B₁R komplett ausgeschaltet ist. Dazu wurden Mäuse untersucht, denen das B₁R-Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen fehlt (Pesquero *et. al.*, 2000). Da 12 Monate alte B₂R-defiziente Mäuse eine Hypertrophie aufweisen (Maestri *in situ* 2003), sollte dies auch bei Ausschaltung des B₁R untersucht werden. Dazu wurden fünf und 15 Monate alte Mäuse überprüft, ob sie B₁R-defizient sind („knockout“). Aus Ohrstückchen wurde genomische DNA isoliert (3.1.5.), diese in der PCR zum Nachweis des Wildtyps mit den Primern MMB12 und MMB18 und zum Nachweis der B₁R-defizienten Tiere (Insertion der Neo[®]-Kassette) mit den Primern MMB1ES und Neo1L eingesetzt. Die Tiere in Spur 5 bis 11 exprimierten das B₁R-Gen (+/+) (Abb. 4.92 A) und in Spur 1 bis 4 befinden sich die Tiere mit Neo[®]-Kassette (-/-) (Abb. 4.92 B). Somit sind die Tiere in Spur 1 bis 4 B₁R-defizient („knockout“).

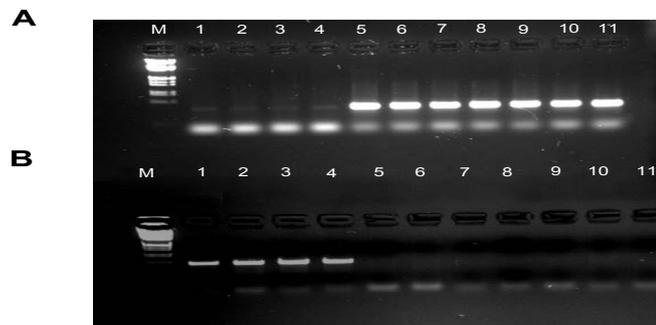


Abb. 4.92 Genotypisierung der B₁R^{-/-}-Mäuse mittels PCR. Amplifizierte Proben aus Ohrstückchen-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung auf einen Agarosegel. A. PCR zum Nachweis des Wildtypallels. B. PCR zum Nachweis der Insertion der Neo[®]-Kassette. Spur 1 bis 4 – B₁R^{-/-}-Mäuse; Spur 5 bis 11 – Wildtyp. M – Marker.

4.4.2.1. Expression des B₂-Rezeptors bei 5 Monate alten Tieren

In den Wildtyptieren konnte eine B₂R-mRNA-Expression nachgewiesen werden, bei den B₁R-defizienten Mäuse war diese tendentiell, aber nicht signifikant geringer (Abb. 4.93).

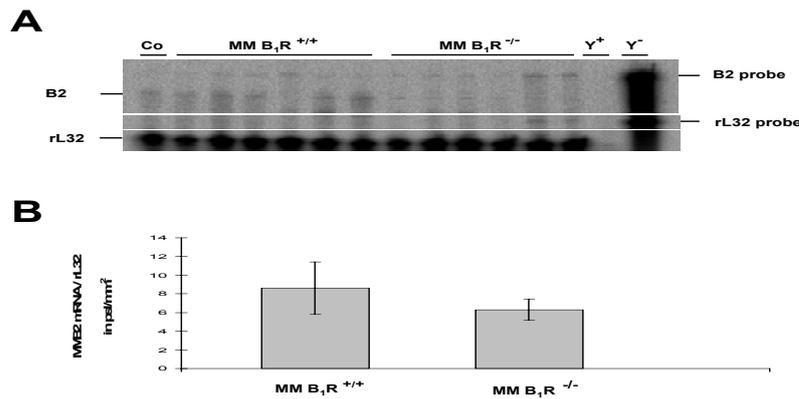


Abb. 4.93 B_2R -mRNA-Expression in den Ventrikeln 5 Monate alter Wildtyp- und B_1R -defizienter Mäuse. A. Repräsentativer RPA ($n=6$): B_2R - (274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B_2R -mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse ($n=6$). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** $P<0.01$ vs. $MM B_1R^{+/+}$. $MM B_1R^{+/+}$ – Wildtypmäuse; $MM B_1R^{-/-}$ – B_1R -defiziente Mäuse.

4.4.2.2. Expression des B_2 -Rezeptors und von BNP bei 15 Monate alten Tieren

Der Herzindex der Wildtyp- unterscheidet sich um 9% ($P<0,05$) von B_1R -defizienten Mäuse. Die $B_1R^{-/-}$ -Tiere zeigen keinen Unterschied im Gewicht und weisen eine leichte Hypertrophie auf (Tab. 4.16). Die 15 Monate alten Tiere exprimierten, im Gegensatz zu den fünf Monate alten Tieren, den B_2R . Die Expression war signifikant um 40% ($P<0,05$) geringer als bei den Wildtypmäusen (Abb. 4.94). Die 15 Monate alten B_1R -defizienten Tiere zeigen eine signifikante um 75% höhere mRNA-Expression von BNP (Abb. 4.95).

	$MM B_1^{+/+}$	$MM B_1^{-/-}$
Körpergewicht [g]	$31,2 \pm 1,1$	$31,7 \pm 1,5$
Herzindex [mg/g]	$5,8 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,3^*$

Tab. 4.16 Körpergewicht und Herzindex (Herzgewicht/Körpergewicht) der Wildtyp- und B_1R -defizienten Mäuse. Zur Bestimmung des Herzindexes wurde Herz- und das Körpergewicht bestimmt ($n=6-8$). * $P<0.05$ vs. $MM B_1R^{+/+}$. $MM B_1R^{+/+}$ – Wildtypmäuse; $MM B_1R^{-/-}$ – B_1R -defiziente Mäuse.

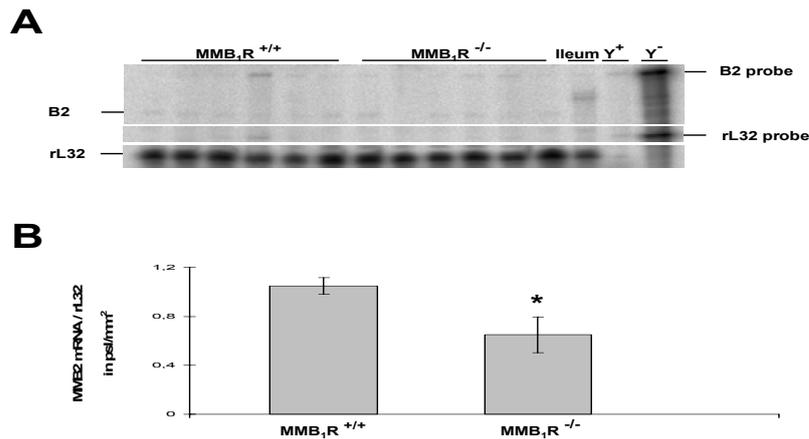


Abb. 4.94 *B₂-mRNA-Expression 15 Monate alter Wildtyp- und B₁R-defizienten Mäuse. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₂R- (274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der B₂R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * P<0.05 vs. MM B₁R^{+/+}. MM B₁R^{+/+} – Wildtypmäuse; MM B₁R^{-/-} – B₁R-defiziente Mäuse.*

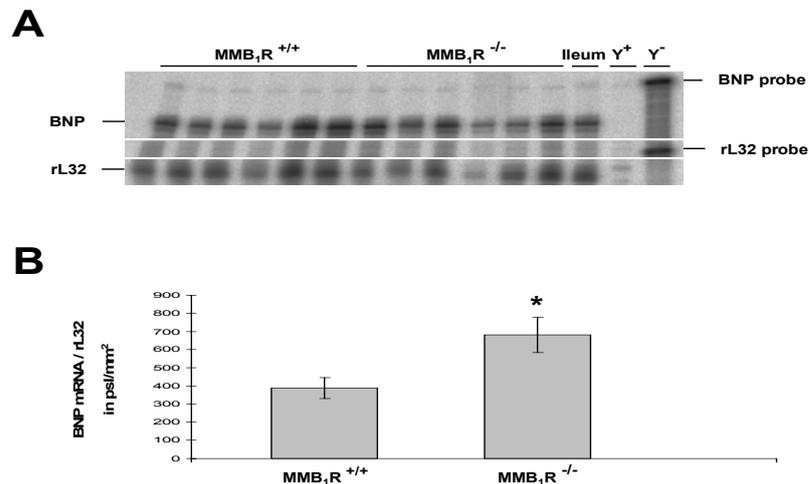


Abb. 4.95 *BNP-mRNA-Expression 15 Monate alter Wildtyp- und B₁R-defizienten Mäuse. A. Repräsentativer RPA (n=4): BNP- (371 bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der BNP-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * P<0.05 vs. MM B₁R^{+/+}. MM B₁R^{+/+} – Wildtypmäuse; MM B₁R^{-/-} – B₁R-defiziente Mäuse.*

4.4.3. Charakterisierung von B₂-Rezeptor-defizienten Tieren

Der B₂R wird im Gegensatz zum induzierbaren B₁R, basal exprimiert und unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert (Marceau *in situ*, 1998; Aiguo *in situ*, 1998). Jedoch ist bisher nicht bekannt, wie sich der B₁R verhält, wenn der B₂R komplett ausgeschaltet ist. Dazu wurden Mäuse genutzt, bei denen das B₂R-Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen nicht mehr vorhanden ist (Borkowski *et. al.*, 1995). 12 Monate alte B₂R-defiziente Tiere wiesen eine Hypertrophie des Herzens auf (Maestro *in situ*, 2003). Um zu sehen ob sich die Expression des B₁R bei jungen und alten Tieren unterscheidet und um die Hypertrophie zu bestätigen wurden fünf und 15

Monate alte Mäuse genotypisiert. Aus den Ohrstückchen wurde genomische DNA (3.1.5.) isoliert, zum Nachweis des Wildtyps mit den Primern MMB12 und MMB18 (3.1.9.) und zum Nachweis der B₂R-Defizienz mit den Primern MMB1ES und Neo1L amplifiziert. Das Tier 11 exprimierte den B₁R (Wildtyp; +/+) (Abb. 4.96 A). Die Tiere 1 bis 10 weisen die Neo®-Kassette auf (Abb. 4.96 B) und sind B₁R-defizient („knockout“).

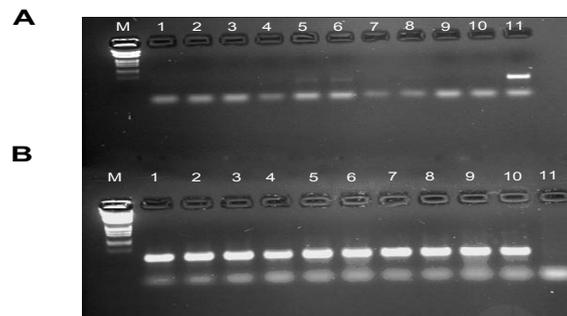


Abb. 4.96 Genotypisierung der B₂R^{-/-}-Mäuse mittels PCR. Amplifizierte Proben aus Ohrstückchen-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung. A. PCR zum Nachweis des Wildtypallels. B. PCR zum Nachweis der Insertion der Neo®-Kassette. Spur 1 und 10 – B₂R^{-/-}-Mäuse, Spur 11 – Wildtyp. M – Marker.

4.4.3.1. Expression des B₁-Rezeptors bei 5 Monate alten Tieren

In den Wildtyptieren konnte der B₁R nur bei einem Tier nachgewiesen werden. Bei den B₂R-defizienten Mäusen zeigten auch nur zwei Tiere den B₁R, was wahrscheinlich nicht auf den Gendefekt zurückzuführen ist (Abb. 4.97).

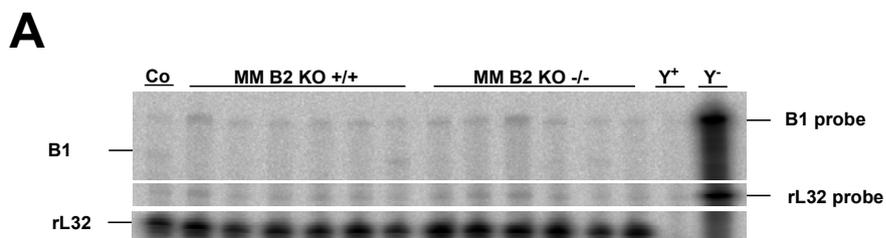


Abb. 4.97 B₁R-mRNA-Expression im Herzen 5 Monate alter Wildtyp- und B₂R-defizienter Mäuse. A. Repräsentativer RPA (n=6): B₁R- (268bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. MM B₂R^{+/+} – Wildtypmäuse; MM B₂R^{-/-} – B₂R-defiziente Mäuse.

4.4.3.2. Expression des B₁-Rezeptors und von BNP bei 15 Monate alten Tieren

Bei den 15 Monate alten B₂R-defizienten Mäusen konnte keine Erhöhung des Herzindex festgestellt werden. Das Körpergewicht zeigte auch keine Veränderung durch die Ausschaltung des B₁R (Tab. 4.17). In den 15 Monate alten Wildtyp- und B₂R-defizienten Mäusen konnte keine B₁R-mRNA-Expression in 30mg Gesamt-RNA nachgewiesen werden, jedoch in der Positiv-Kontrolle (Abb. 4.98). Die 15 Monate alten B₂R-defizienten Tiere zeigten keine höhere mRNA-Expression von BNP (Abb. 4.99).

	MM B ₂ ^{+/+}	MM B ₂ ^{-/-}
Körpergewicht [g]	30,1 ± 3,2	29,1 ± 1,8
Herzindex [mg/g]	4,4 ± 0,1	4,4 ± 0,32*

Tab. 4.17 Körpergewicht und Herzindex der Wildtyp- und B₂R-defizienten Mäuse. Zur Bestimmung des Herzindexes wurde die Ratio von Herz- zu Körpergewicht ermittelt (n=6-8). MM B₂R^{+/+} – Wildtypmäuse; MM B₂R^{-/-} – B₂R-defiziente Mäuse.

A

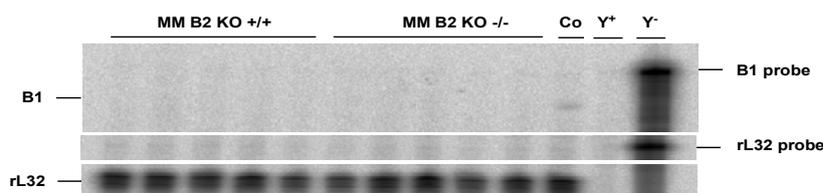
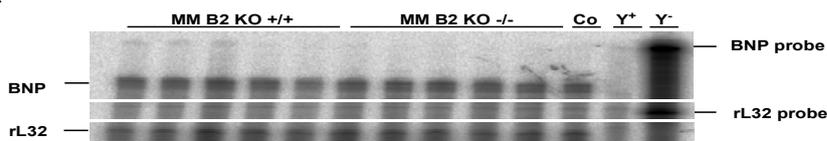


Abb. 4.98 B₁R-mRNA-Expression im Herzen 15 Monate alter Wildtyp- und B₂R-defizienter Mäuse. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (268bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. MM B₂R^{+/+} – Wildtypmäuse; MM B₂R^{-/-} – B₂R-defiziente Mäuse.

A



B

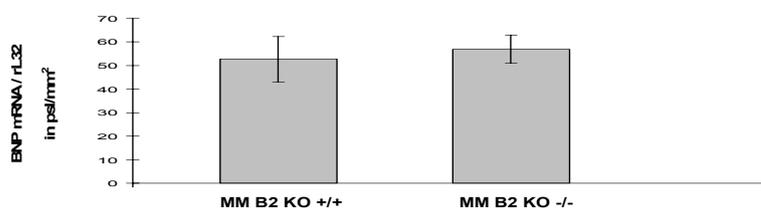


Abb. 4.99 BNP-mRNA-Expression im Herzen 15 Monate alter Wildtyp- und B₂R-defizienter Mäuse. A. Repräsentativer RPA (n=4): BNP- (274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression des Herzens. B. Quantifizierung der BNP-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. MM B₂R^{+/+} – Wildtypmäuse; MM B₂R^{-/-} – B₂R-defiziente Mäuse.

4.5. Regulation der Bradykinin-Rezeptoren in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Die BKR werden in verschiedenen Zellarten, wie Endothelzellen (Keravis *et al.*, 1991), bronchialen glatten Muskelzellen (Schmidlin *et al.*, 1998), Lungenfibroblasten (Webb *et al.*, 1994) Kardiomyozyten (CMC) (Yayama *et al.*, 2000), Neuralzellen (Fujiwara *et al.*, 1988) und Deziduazellen (Rehbock *et al.*, 1999) exprimiert. Des Weiteren ist bekannt, dass Herzgewebe aus verschiedenen Zellarten besteht und die Interaktionen gleicher und verschiedener Zellarten die hypertrophen Wirkungen modulieren. Die CMC

umfassen 70 bis 80% der Herzmasse, machen aber nur 20 bis 30% der gesamten kardialen Zellen aus. Den Hauptteil der Zellen bilden Fibroblasten, Neuronen und Endothelzellen (Schaub *et al.*, 1997). Bei den betrachteten pathophysiologischen Zuständen, spielen die Hypertrophie und der ANG II-Spiegel eine Rolle. ANG II ist dafür bekannt die kardiale Hypertrophie zu verursachen, was eine Rolle bei der LVH, der diabetischen und der ischämischen Kardiomyopathie spielt. CMC wurden für *in vitro*-Experimente genutzt, um festzustellen wie sich die Expression der beiden BKR im Verlauf der Expositionszeit mit ANG II verhält. Ebenso wurde untersucht, wie sich die Expression der BKR bei Behandlung mit ANG II in Kombination dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan und/oder dem AT₂R-Antagonisten PD 123319 verhalten, da sich bei den *in vivo*-Experimenten Einflüsse der AT₁R- und AT₂R-Blockade auf die Expression der Rezeptoren gezeigt haben. Dazu wurden zunächst zwei bis vier Tage alten Ratten die Herzen entnommen, daraus Zellen gewonnen, diese kultiviert (3.4.1.) und behandelt (3.4.2.). Am Ende der Behandlung wurde aus den Zellen sofort RNA isoliert (3.2.1.). Zur Untersuchung der BKR-Expression wurden die Sonden RNB1, RNB2 und das ‚house keeping gene‘ rL32 (2.2.2.) im RPA (3.2.4.) eingesetzt.

4.5.1. Einfluss von Angiotensin II auf die Expression der Bradykinin-Rezeptoren

Um die höchsten ANG II-induzierten B₁R- und B₂R-Spiegel festzustellen, wurden neonatale CMC im Verlauf der Zeit (3, 6 und 9 Stunden) mit ANG II inkubiert (3.4.2.).

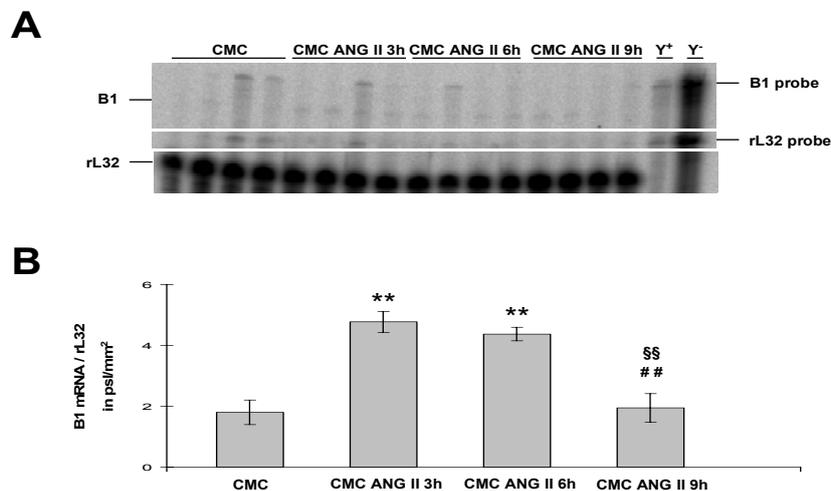


Abb. 4.100 B₁R-mRNA-Expression in neonatalen CMC aus Wildtyp-Ratten im Verlauf der Expositionszeit mit ANG II. Die Zellen wurden mit ANG II für 3, 6 und 9 Stunden inkubiert. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₁R- (257bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression. B. Quantifizierung der B₁R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. ** P<0.01 vs. CMC, §§ P<0.01 vs. 3h ANG II, ## P<0.01 vs. 6h ANG II. CMC – Kardiomyozyten, CMC ANG II 3h – Kardiomyozyten 3 Stunden mit ANG II, CMC ANG II 6h – Kardiomyozyten 6 Stunden mit ANG II, CMC ANG II 9h – Kardiomyozyten 9 Stunden mit ANG II.

In CMC konnte unter basalen Bedingungen die B₁R-mRNA-Expression nachgewiesen werden, die nach 3 Stunden Inkubation mit ANG II um 165% ($P<0,01$) anstieg. Nach 6 Stunden verblieb sie auf diesem Niveau, nach 9 Stunden sank (um 55%; $P<0,01$) sie wieder auf das basale Niveau ab (Abb. 4.100).

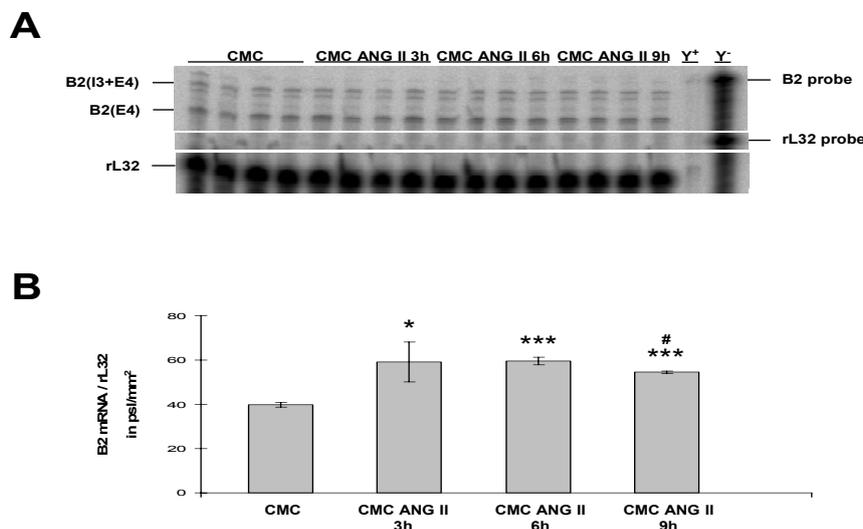


Abb. 4.101 B₂R-mRNA-Expression in neonatalen CMC aus Wildtypmatten im Verlauf der Expositionszeit mit ANG II. Die Zellen wurden mit ANG II für 3, 6 und 9 Stunden inkubiert. A. Repräsentativer RPA (n=4): B₂R- (221bp und 274bp) und rL32- (127bp) mRNA-Expression. B. Quantifizierung der B₂R-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von rL32 normalisiert. * $P<0,05$ vs. CMC, *** $P<0,001$ vs. CMC, # $P<0,05$ vs. 6h ANG II. CMC – Kardiomyozyten, CMC ANG II 3h – Kardiomyozyten 3 Stunden mit ANG II, CMC ANG II 6h – Kardiomyozyten 6 Stunden mit ANG II, CMC ANG II 9h – Kardiomyozyten 9 Stunden mit ANG II.

Auch die B₂R-mRNA-Expression konnte unter basalen Bedingungen detektiert werden. Nach 3 Stunden Inkubation stieg (um 50%; $P<0,05$) diese an, verblieb bis zu 6 Stunden auf diesem Level, um dann nach 9 Stunden leicht zu sinken (um 10%; $P<0,05$). Die Expression war aber höher (um 40%; $P<0,001$) als das basale Niveau (Abb. 4.101). Die B₁R und B₂R mRNA-Expression ist in neonatalen CMC nach drei Stunden auf dem höchsten Niveau.

4.5.2. Expression der Bradykinin-Rezeptoren bei pharmakologischer Behandlung

Als Inkubationszeit wurde drei Stunden gewählt, da sich hier mit ANG II in den CMC die höchste Expression beider Bradykinin-Rezeptoren zeigte (Abb. 4.100, 4.101).

Die Behandlung mit ANG II und dem AT₁R-Antagonisten bewirkte eine höhere mRNA-Expression des B₁R um 425% ($P<0,01$) (Abb. 4.102) und des B₂R um 175% ($P<0,001$) im Vergleich zu den nur mit ANG II behandelten CMC (Abb. 4.103). Die Kombination von ANG II und AT₂R-Antagonist erhöhte die B₂R-Expression um 295% ($P<0,001$) im Vergleich zu ANG II allein und war 45% ($P<0,01$) höher als bei den mit ANG II- und Irbesartan-behandelten CMC (Abb. 4.103).

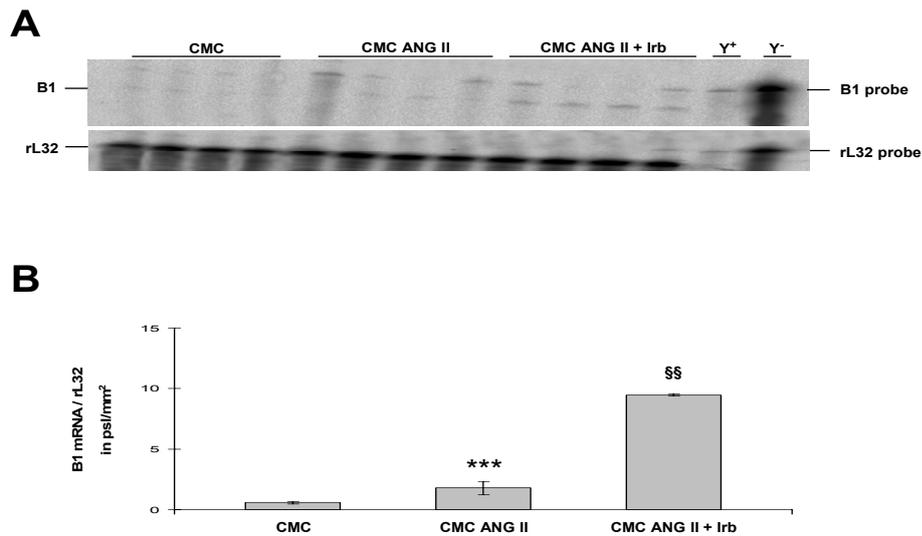


Abb. 4.102 *B₁R*-mRNA-Expression in neonatalen CMC aus Wildtypmatten mit Behandlung von ANG II oder Irbesartan. Die Zellen wurden 3 Stunden mit den entsprechenden Wirkstoffen inkubiert. A. Repräsentativer RPA (n=4): *B₁R*- (257bp) und *rL32*- (127bp) mRNA-Expression. B. Quantifizierung der *B₁R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von *rL32* normalisiert. *** $P < 0.001$ vs. CMC, §§ $P < 0.01$ vs. CMC ANG II. CMC – Kardiomyozyten, CMC ANG II – Kardiomyozyten mit ANG II, CMC Irb – Kardiomyozyten mit Irbesartan.

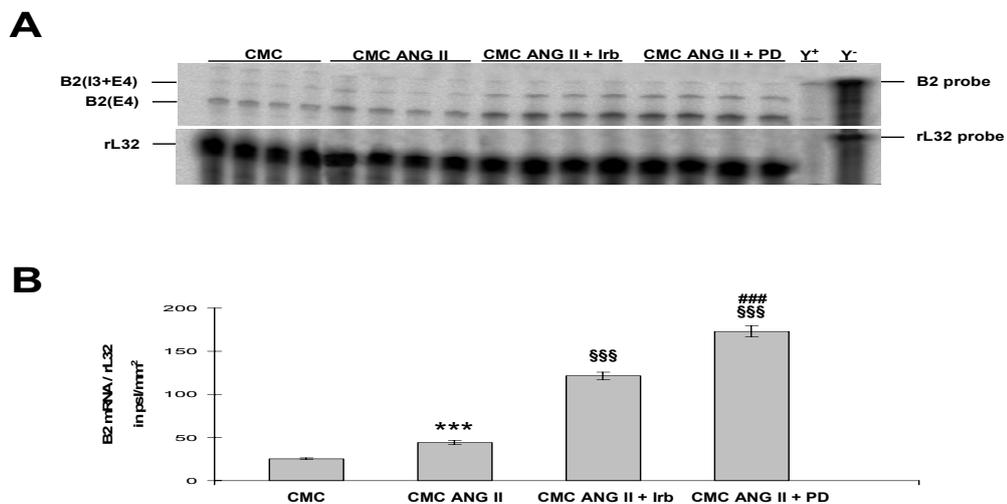


Abb. 4.103 *B₂R*-mRNA-Expression in neonatalen CMC aus Wildtypmatten mit Behandlung von ANG II und Irbesartan oder PD 123319. Die Zellen wurden 3 Stunden mit den entsprechenden Wirkstoffen inkubiert. A. Repräsentativer RPA (n=4): *B₂R*- (221bp und 274bp) und *rL32*- (127bp) mRNA-Expression. B. Quantifizierung der *B₂R*-mRNA-Expression nach autoradiographischer Signalanalyse (n=6). Zur Quantifizierung wurden die Daten über das mRNA-Level von *rL32* normalisiert. *** $P < 0.001$ vs. CMC, §§§ $P < 0.001$ vs. CMC ANG II, ## $P < 0.01$ vs. CMC ANG II + Irb, ### $P < 0.001$ vs. CMC ANG II + Irb. CMC – Kardiomyozyten, CMC ANG II – Kardiomyozyten mit ANG II, CMC Irb – Kardiomyozyten mit Irbesartan, CMC PD – Kardiomyozyten mit PD 123319.