

5. Diskussion

Kinine sind Bestandteile des KKS und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des kardiovaskulären Systems (Kintsurashvili *et al.*, 2001; Spillmann *et al.*, 2002). Sie üben ihre Wirkung über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren aus, die B₁R und B₂R (Regoli & Barabé, 1980). Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit war auf die Untersuchung der Expression der beiden BKR unter pathophysiologischen Bedingungen gerichtet. Zusätzlich wurde die Genstruktur charakterisiert und die gewebespezifische Expression, sowie die ontogenetische Regulation unter physiologischen Bedingungen untersucht.

5.1. Genstruktur der Bradykinin-Rezeptoren

Die Genstruktur beider BKR wurde zuvor teilweise beschrieben (z.B. Ni *et al.*, 1998a; Pesquero *et al.*, 1994, 1996). Zur Untersuchung der Genexpression der BKR mussten entsprechende Sonden kloniert werden, wofür eine möglichst genaue Kenntnis der Genstruktur nötig war. Da es keine vollständigen Informationen in der Datenbank gab, wurden zuerst Sequenzvergleiche durchgeführt, um die genauen Genstrukturen zu ermitteln. Es wurde nach alternativen Transkripten und in den bekannten Gensequenzen nach weiteren Promotorregionen gesucht.

5.1.1. Genstruktur des B₁-Rezeptors

Die Sequenzen, die den B₁R kodieren, sind bei diversen Säugetierarten kloniert worden. Bei Mensch (Menke *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1994), Maus (Pesquero *et al.*, 1996c), Ratte (Ni *et al.*, 1998), Kaninchen (MacNeil *et al.*, 1995) und Hund (Hess *et al.*, 2001) wurden cDNAs des B₁R geklont. Beim Mensch (Bachvarow *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) und bei der Ratte (Ni *et al.*, 1998a) wurden Struktur und genomische Organisation analysiert. Bei der Ratte befindet sich das B₁R-Gen auf Chromosom 6 in der Region q3.2 (Gösele *et al.*, 2000), bei der Maus auf Chromosom 12 (Taketo *et al.*, 1995) und beim Menschen auf Chromosom 14, Region q32 (Chai *et al.*, 1996; Kammerer *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1994b).

Die Organisation des B₁R-Lokus bei Ratte, Maus und Mensch wurde in dieser Arbeit durch Vergleiche (Abb. 4.1, 4.2, 4.3) von B₁R-Sequenzen, sowie genomischen Basenpaarfolgen (Tab 4.1, 4.2, 4.3) erschlossen. Die Struktur des Gens unterschied sich bei Nagetieren und Menschen in der Anzahl der Exons. Während bei Ratte und Maus zwei Exons gefunden wurden, mit der kodierenden Region im Exon 2 (Abb. 4.4, Anlagen 1, 2), wurden beim Menschen drei Exons identifiziert. Das erste Intron ist beim Menschen ca. 6550bp lang, das Zweite entspricht ungefähr der Länge des Nagetier-Intons und die kodierende Region konnte komplett Exon 3 zugeordnet werden (Abb. 4.4, Anlage 3). Vom ermittelten Ratten-B₁R-Gen (Abb. 4.4, 4.12, Anlage 1) wurden im Herzen mit Hilfe einer 5'-RACE-Analyse zwei verschiedene Transkripte identifiziert, die an derselben Spleißdonorstelle (3'-Ende von Exon 1), jedoch an unterschiedlichen Spleißakzeptorstellen zusammengefügt werden (Abb. 4.11 B). Beide

Transkripte beinhalten Exon 1 und Exon 2, jedoch fehlen dem 268bp-Fragment die ersten 41bp von Exon 2 vor dem Translationsstart, womit der Leserahmen erhalten bleibt (Abb. 4.7; 4.11 A; 4.12).

Ni *et al.* (1998a) zeigten bei der Ratte und Pesquero *et al.* (1996c) bei der Maus, dass das B₁R-Gen aus 2 Exons besteht, wobei sich die kodierende Region auf dem zweiten Exon befindet (Ni *et al.*, 1998a; Pesquero *et al.*, 1996c). Ebenso konnten Ni *et al.* (1998a) zwei verschiedene mRNA-Transkripte des B₁R-Gen aus glatten Muskelzellen von Ratten isolieren und auch im Herzen von Ratten nachweisen (Ni *et al.* 1998a). Die aus den Zellen isolierten Transkripte unterschieden sich um 41 bp, die am Anfang von Exon 2 fehlen. Jones *et al.* (1998) isolierten kurz darauf in der Gebärmutter von Ratten zwei verschiedenen Transkripte, welche mit den von Ni *et al.* (1998a) isolierten Fragmenten übereinstimmen. Die zwei in dieser Arbeit mit der 5'-RACE isolierten Fragmente im Herzen von Ratten stimmen mit denen von Jones *et al.* (1998) und Ni *et al.* (1998a) überein. Mit dem RPA konnten die zwei Transkripte mit der B₁R-mRNA-Sonde (257 bp), die sich aus 65 bp des Exon 1 und 192 bp Exon 2 zusammensetzt, bestätigt werden. Die obere Bande im RPA repräsentiert das Fragment, das den Anfang von Exon 2 (257 bp) beinhaltet. Das Fragment (238 bp), dem die ersten 41bp von Exon 2 fehlen, bildet im RPA eine Bande mit 151 bp, was in etwa der unteren Bande im RPA entspricht. Eine mögliche 65 bp-Bande, die vom Primer B1N5 bis zum Ende von Exon 1 reicht und darauf beruht, dass die fehlenden 41bp des Exon 2 nicht protektiert sind und somit einen Angriffspunkt für die RNase A und T1 bieten. Die 65 bp-Bande geht in den Banden des ‚house keeping‘-Gen unter. Ebenfalls damit übereinstimmend, zeigten auch die RPA-Analysen mit einer mausspezifischen B₁R-mRNA-Sonde zwei verschiedene Transkripte in der Lunge und in den Ventrikeln. Bei weiblichen Mäusen konnten die Transkripte auch in den Ovarien detektiert werden (siehe 5.2.1.).

Da dem einen RACE-Fragment die ersten 41 bp von Exon 2 fehlen, kann man davon ausgehen, dass die Transkripte durch alternatives Spleißen entstehen. Dies wird durch die Analyse auf Spleißstellen bestätigt. Hier konnten die zwei entsprechenden Spleißakzeptorstellen in Exon 2 ermitteln werden (Abb. 4.22). Auch andere Arbeitsgruppen identifizierten die hier ermittelten Spleißakzeptorstellen in Exon 2 (Jones *et al.*, 1999; McIntyre *et al.*, 1993; Ni *et al.*, 1998a).

Weiterhin konnte in der B₁R-Sequenz (Anlage 1) nur der bereits aus der Datenbank bekannte Promotor im 5'-Bereich vor Exon 1 als potentielle Promotorregion identifiziert werden (Abb. 4.8, Anlage 18). Nur dort konnten die genutzten Programme eine Promotorregion identifizieren und die ermittelten TF-Bindungsstellen zuordnen. Auch in der Literatur wurde für die Ratte nur ein Promotor vor Exon 1 ermittelt (Ni *et al.*, 1998a; Wang *et al.*, 1994). Ni *et al.* (1998a) identifizierten in der 5'-flankierenden Region des Ratten B₁R-Gens eine Transkriptionsinitiationsstelle. Ebenso konnten sie nur vor Exon 1 regulatorische Elemente, wie die TATA-Box, das cAMP-,response'-Element und die *und* Bindungsstellen für NFκB und AP-1 lokalisieren (Ni *et al.*, 1998a). Aus den vorgelegten Analysen und der Literatur lässt sich somit Schlussfolgern, dass das B₁R-Gen bei Ratte und Maus nur einen Promotor aufweist und die zwei ermittelten Transkripte durch alternatives Spleißen entstehen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Sequenzanalysen dieser Arbeit, wurde bei Menschen in der Literatur ein Gen mit 3 Exons, bei der sich die kodierende Region im Exon 3 befindet, identifiziert (Bachvarow *et al.*, 1996; Chai *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Angers *et al.* (2000) und Bachvarow *et al.* (1996) fanden im humanen Gen nur vor Exon 1 eine Promotorregion und diverse Transkriptionselemente (Angers *et al.*, 2000; Bachvarow *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu identifizierten Yang und Polgar (1996) im humanen Gen allerdings zwei distinkte funktionelle Promotoren. Sie fanden typische Promotorelemente und TF-Bindungsstellen im 5'-Bereich vor Exon 1 und Exon 3. Beide Promotoren wurden durch ein Luziferase-Reporter-Gen-Assay bestätigt (Yang & Polgar, 1996). Der von Yang und Polgar (1996) ermittelte Promotor vor Exon 3 wurde nicht in dieser Arbeit übernommen, da dieser weder in der Datenbank zu finden war, noch in der Literatur von anderen Arbeitsgruppen im humanen Gen gezeigt wird. Auch Yang und Polgar erwähnen diesen in späteren Arbeiten nicht mehr. Um die Existenz eines weiteren Promotors im humanen Gen vor Exon 3 zu ermitteln, müssen 5'-RACE- und weitere Promotor-Analysen durchgeführt werden.

Der Vergleich des humanen Exon 1 bzw. Exon 2 mit dem Exon 1 von Maus und Ratte ergab in dieser Arbeit keinerlei Homologie. Das humane Exon 2 und deren Umgebung wiesen jedoch eine Homologie zu einem *Alu-J*-Element auf. Diese besitzen mehrere spezielle Regionen, die zu einer konservierten Spleißdonorstelle stark homolog sind und sich nur um ein bis zwei Nukleotide unterscheiden. Somit könnte das humane Exon 2 während der Evolution entstanden sein, durch die Integration eines *Alu-J*-Elements in diese Region und anschließende Punktmutationen, die zu funktionellen Spleißstellen geführt haben. Da *Alu-J*-Sequenzen nur bei Menschen und Primaten zu finden sind, kann die fehlende Homologie zum Nagetier-Gen erklärt werden. Die funktionelle Bedeutung des humanen Exon 2 ist bisher nicht bekannt, ebenfalls nicht ob ähnliche Transkripte des humanen B₁R-Gens existieren.

Beide in dieser Arbeit ermittelten B₁R-Transkripte beinhalten das komplette Exon 1 und den kompletten kodierenden Bereich von Exon 2. Damit wird über beide Transkripte ein identisches Protein translatiert. Nur die fehlenden 41 bp des 5'-untranslatierten Bereichs (UTR) von Exon 2 unterscheiden beide. Warum diese beiden Spleißvarianten gebildet werden, kann nur vermutet werden. Jedoch ist von der 5'-UTR eukariontischer mRNAs bekannt, dass er die Effizienz der Translationsinitiation reguliert. Die 5'-untranslatierten Bereiche können stabile sekundäre Strukturen ausbilden, die das ribosomale 'Scanning' behindern (Kozak, 1989). Beispielsweise zeigten Curnow *et al.* (1995), dass Transkripte des AT₁R-Gens, die neben dem kodierenden Exon 5 im 5'-UTR auch Exon 1 besitzen, nicht translatiert wurden, da diese eine stabile Sekundär-Struktur ausbildet (Curnow *et al.*, 1995). Dies kann auch beim B₁R-Gen nicht ausgeschlossen werden, da sich stabile sekundäre Strukturen mit nur 40 bp bilden (Kozak, 1989). Somit könnten auch nur Teile eines Exons dafür verantwortlich sein. Die am schlechtesten translatierte mRNA, besitzt auch die kürzeste 5'-UTR (Jiang & Lucy, 2001; Yang *et al.*, 1998). Weiterhin könnten dort im 5'-UTR kurze offene Leserahmen präsent sein, welche die Translationsinitiation am dahinter angeordneten Startkodon reduzieren (Kozak, 1991). Auch dieses konnte

beim AT₁R-Gen gezeigt werden. Das alternativ gespleißte Exon 2 des Gens zeigte *in vivo* und *in vitro* starke inhibitorische Effekte auf die Translation, wahrscheinlich weil es ein Minicistron mit einem ATG mit optimalem Kontext enthält (Curnow *et al.*, 1995). Beim B₁R-Gen konnte allerdings weder ein Minicistron noch ein entsprechendes ATG mit den im Internet zur Verfügung gestellten Programmen gefunden werden (nicht gezeigte Daten). Zur Klärung müssten Analysen der sekundären Struktur der 5'-UTR und funktionelle *in vitro*-Analysen mit Konstrukten, die aus einem aktiven Promotor, den beiden 5'-UTR und einem Reporter gen bestehen, durchgeführt werden.

Eine andere Studie zeigte, dass verschiedene 5'-UTR-Spleißvarianten, neben dem Einfluss auf die Translationseffizienz, auch eine wichtige Rolle bei der RNA-Stabilität spielen können. Beim humanen SP-A1- und SP-A2-Gen zeigten die verschiedenen mRNA-Spleißvarianten neben unterschiedlicher Translationseffizienz auch zusätzlich unterschiedliche mRNA-Zerfallsraten (Wang *et al.*, 2005).

Weiterhin konnten Frankton *et al.* (2004) zeigen, dass 5'-UTR auch zellspezifische Effekte auf die mRNA- und Protein-Expression ausüben. Hier zeigten Transfektionsstudien, dass ein Teil (35 bp) von Exon 1 des Thyroidhormon β 1-Rezeptors in JEG-3-Zellen zu geringeren mRNA-Spiegeln bei gleicher Proteinexpression führte, in COS-7-Zellen die mRNA-Expression nicht inhibierte, aber die Translation unterdrückte (Frankton *et al.*, 2004). Dass dies beim B₁R eine Rolle spielen könnte, zeigen die RPA-Analysen der Kardiomyozyten. In den Kardiomyozyten konnte mit der RNB1-mRNA-Sonde nur die längere Transkriptvariante nachgewiesen werden, welche den untranslatierten Anfang, also die ersten 41 bp von Exon 2, beinhaltet. Weitere RPA-Analysen mit Kardiomyozyten, glatten Aorta-Muskelzellen und kardialen Fibroblasten zeigten, dass Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen nur diese B₁R-mRNA-Variante exprimieren. Die Kardiomyozyten wiesen die stärkste Expression auf. Bei kardialen Fibroblasten konnte keine B₁R-mRNA-Expression detektiert werden (nicht gezeigte Daten).

In welchen Zellarten das Transkript mit den ersten 41bp des Exon 2 exprimiert wird und welche Rolle diese spielen, könnte durch weitere 5'-RACE-, RPA- und funktionelle *in vitro*-Reporter gen-Analysen in anderen Zellarten ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals auch die Regulation der beiden Transkript-Varianten bei der Ratte unter basalen und pathophysiologischen Bedingungen näher betrachtet. Unter basalen Bedingungen wurde das Transkript, dem der Anfang von Exon 2 fehlt, ca. doppelt so stark exprimiert wie das Transkript, welches den Anfang von Exon 2 beinhaltet (4.1.1.3.2.). Auch bei der Maus konnte in Lunge, Ventrikel und in den Ovarien mit dem RPA diese Bande unter physiologischen Bedingungen als die dominanter identifiziert werden (Abb. 4.25-4.26). Ni *et al.* (1998) konnten abhängig vom Gewebe bei der Ratte zwei Transkripte zeigen, quantifizierten oder schätzten die Expression der Transkripte jedoch nicht.

Unter diabetischen Bedingungen wurden beide Transkripte zweimal stärker exprimiert als unter basalen Bedingungen und die Spleißvariante ohne den Anfang von Exon 2 bleibt die dominanter (Abb. 4.32, 4.35). Bei den scheinoperierten und infarzierten Ratten dominiert jedoch die Bande, die den Anfang von Exon 2 aufweist. Nach Induktion des Myokardinfarkts werden beide Banden, je nach Untersuchungszeitpunkt, ungefähr 2-6 stärker exprimiert (Abb. 4.43, 4.59, 4.72, 4.80). Nach dem abdominalen Aorten-

banding werden beide Transkripte ungefähr gleich stark exprimiert (Abb. 4. 29). Andere Arbeiten zu dem Aspekt konnten zum Vergleich jedoch nicht ermittelt werden. Damit scheint die Expression der Transkripte nicht nur von der Zellart, sondern auch von pathophysiologischen Bedingungen abhängig zu sein, jedoch bleiben die funktionelle Bedeutung und die Mechanismen der Regulation der Transkripte weiter unklar.

Zusammenfassend besteht das Gen aus 2 Exons und die komplette kodierende Sequenz liegt auf Exon 2. Es beinhaltet bei Nagetieren im 5'-untranslatierten Bereich ein Exon und weist einen Promotor vor Exon 1 auf. Das humane B₁R-Gen setzt sich aus 3 Exons und einem Promotor vor Exon 1 zusammen. Die komplette kodierende Region liegt hier auf Exon 3. Ob es einen weiteren Promotor vor Exon 3 gibt, ist nicht eindeutig klar, ebenso der Ursprung und die Bedeutung des humanen Exon 2. Die beiden bisher in der Literatur identifizierten alternativ gespleißten Transkripte konnten auch im Herzen der Ratte gefunden werden und durch RPA-Analysen bei Mäusen und Ratten bestätigt werden. Ob dies eine funktionelle Bedeutung hat und die RNA-Stabilität und die Effizienz der Translation dadurch beeinflusst werden oder zellspezifische Effekte auf die mRNA- und Protein-Expression ausüben, ist bisher noch unklar. Auch die Funktion der Transkripte unter pathophysiologischen Bedingungen ist bisher unklar. Weiterhin ist nicht bekannt, ob ähnliche Transkripte des humanen B₁R-Gens existieren. Dazu müssten 5'-RACE-Analysen durchgeführt werden. Die gefundenen B₁R-mRNA lassen darauf schließen, dass diese alternativ gespleißt werden, was auch durch die computergestützte Promotoranalyse gefestigt wird, da hier nur ein Promotor gefunden wurde. Weiterhin wird das Transkript, das den Anfang von Exon 2 beinhaltet unter basalen stärker exprimiert. Diese Dominanz bleibt unter diabetischen Bedingungen erhalten, kehrt sich aber bei den scheinoperierten und infarzierten Ratten um. Somit bleibt die funktionelle Bedeutung der zwei Spleißvarianten weiterhin ungeklärt und muß noch weiter untersucht werden.

5.1.2. Genstruktur des B₂-Rezeptors

Das B₂R-Gen ist das Nachbargen des B₁R und befindet sich somit auf demselben Chromosom wie der B₂R bei Ratte, Maus und Mensch (Ma *et al.*, 1994a, b; Kammerer *et al.*, 1995; Taketo *et al.*, 1995; Chai *et al.*, 1996; Gösele *et al.*, 2000). Vom B₂R wurden cDNA bei Mensch (Hess *et al.*, 1992), Maus (Ma *et al.*, 1994a; Yokoyama *et al.*, 1994), Ratte (McEachern *et al.*, 1991), Kaninchen (Bachvarow *et al.*, 1995), Meerschweinchen (Farmer *et al.*, 1998) und Hund (Hess *et al.*, 2001) geklont. Bei Ratte und Maus (Ma *et al.*, 1994a; Pesquero *et al.*, 1994, 1996), sowie beim Menschen (Kammerer *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1994b; Powell *et al.*, 1993) wurden die molekularen Strukturen untersucht. In dieser Arbeit offenbarte der Vergleich (Abb. 4.13, 4.14, 4.15) von Sequenzen des B₂R und chromosomalen Sequenzen (Tab 4.4, 4.5, 4.6), eine ähnliche Organisation des B₂R-Lokus bei Ratte, Maus und Mensch (Abb. 4.16, Anlage 4, 5, 6). Die Nagetiere besitzen 4 Exons, ein 25kb langes Intron 1 und die kodierende Region auf Exon 4 (Abb. 4.16, Anlage 4, 5). Beim Menschen fanden sich drei Exons mit einem ersten Intron, welches dem der Nagetiere entspricht. Hier befindet sich die kodierende

Region auf dem dritten Exon (Abb. 4.16, Anlage 6). Das Exon 3 von Ratte und Maus zeigte keinerlei Homologie zur humanen Sequenz. Mit der 5'-RACE wurde im Herzen ein Transkript des B₂R-Gens der Ratte gefunden, das Exon 1, Exon 2 und Exon 4 enthielt. Jedoch fehlte dem Transkript Exon 3 (Abb. 4.18). Der RPA deutet auf eine weitere mRNA-Variante, die ein 5'-verlängertes Exon 4 besitzt (Abb. 4.20, 4.22 A). Die Analyse auf Spleißstellen ergab 38 bp vor der bisher bekannten Spleißakzeptorstelle des Exon 4 eine weitere (Abb. 4.22 B). In der ermittelten Sequenz der Ratte (Anlage 4) konnten vor Exon 1 mehrere Programme verschiedene Promotorregionen, TATA-Boxen und TSS identifizieren, jedoch keine TF-Bindungsstellen. Pesquero *et al.* (1994) konnten bei der Ratte eine Genstruktur mit vier Exons nachweisen (Pesquero *et al.*, 1994), die sich auch in der hier erstellten Sequenz wiederfindet. Im Gegensatz dazu postulierten Park *et al.* (1994) und auch Wang *et al.* (1994) nur drei Exons in der Sequenz für das B₂R-Gen und fanden zwei verschiedene Transkripte (Park *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls zwei unterschiedliche Transkripte des B₂R-Gens in verschiedenen Geweben identifizieren, von denen eines Exon 3 enthält, das andere nicht (McEachern *et al.* 1991; McIntire *et al.*, 1993; Pesquero *et al.*, 1994). In dieser Arbeit wurde im Herzen nur das Transkript ohne Exon 3 gefunden, was daran liegen könnte, dass die Transkriptvariante mit Exon 3 nur gering exprimiert wird und deshalb schwerer nachweisbar ist. Jedoch könnte das Transkript mit Exon 3 auch gar nicht exprimiert werden, da auch andere Studien im Herzen von Ratten bisher nur das Transkript ohne Exon 3 identifizieren konnten (McEachern *et al.*, 1991). Obwohl die 5'-RACE-Analyse nur ein Transkript ermitteln konnte, wurden bei den RPA-Analysen mit der RNB2-mRNA-Sonde (274 bp), welche die letzten 63 bp des Intron 3 und den Anfang von Exon 4 (221 bp) umfasst, zwei Banden im Herzen von Ratten detektiert werden. Die untere Bande im RPA repräsentiert das 221 bp lange Fragment des B₂R, welches in der 5'-RACE-Analyse ermittelt werden konnte, da dieses den postulierten Anfang von Exon 4 beinhaltet. Die obere Bande zeigt ein weiteres Fragment, was abgeschätzt ungefähr 274 bp umfasst und nicht in der 5'-RACE nachgewiesen werden konnte. Der Teil der Sonde der im postulierten Intronbereich (63 bp) liegt, kann allerdings nur nachgewiesen werden, wenn dieser nach dem Spleißen als reife mRNA erhalten bleibt. Damit konnte mit der RPA-Analyse ein 5'-verlängertes Exon 4, was auch als Exon 4a bezeichnet wurde, ermittelt werden. Damit übereinstimmend konnten auch mit den RPA-Analysen bei Mäusen beide Transkripte bestätigt werden. Bei den Mäusen wurde in Ventrikel, Lunge, Vorderhirn, Hirnstamm, Dünndarm, Magen und Thymus neben der 221bp-Bande eine zweite Bande detektiert, die der 274bp-Bande bei den Ratten in etwa entspricht (siehe 5.2.2). Allerdings kann anhand der RPA-Analysen keine Aussage gemacht werden, ob dieses Fragment im Herzen von Ratten Exon 3 beinhaltet oder nicht. Die anderen Studien, welche das Fragment mit Exon 3 in anderen Geweben ermittelten, wiesen dort aber nur den bisher postulierten Anfang von Exon 4 nach (McEachern *et al.* 1991; McIntire *et al.*, 1993; Pesquero *et al.*, 1994). Damit deuten die ermittelten Banden entweder auf einen weiteren Promotor vor Exon 4 oder auf ein weiteres Transkript, das alternativ gespleiß wird.

Die Regulation der Genexpression und die damit verbundenen TF sind beim B₂R-Gen der Ratte weitgehend unbekannt, nur im humanen Gen konnten in der 5'-flankierenden Region eine TATA-Box und verschiedene Bindungsstellen für TF ermittelt werden (Ma *et al.*, 1994b). Um festzustellen ob das B₂R-Gen einen weiteren Promotor beinhaltet, wurde die ermittelte Sequenz des Gens computergestützt analysiert. Nicht alle Promotor-Analyse-Programme ergaben einen Hinweis auf die bekannte Promotorregion vor Exon 1. Nur die unspezifischen Programme konnten in der Region vor Exon 4 Promotoren identifizieren (Abb. 4.19; Anlage 19). Damit konnte weder die bekannte Promotorregion vor Exon 1, noch ein weiterer Promotor vor Exon 4 eindeutig identifiziert werden. Jedoch besitzen nur 70% der Promotoren eine TATA-Box und nicht alle Promotoren weisen typische Elemente auf. Auch andere Studien konnten beim B₂R-Gen von Maus und Ratte keine typischen TATA- oder CCAAT-Box 'upstream' des Transkriptionsstarts ermitteln (Ma *et al.*, 1994a; Kammerer *et al.*, 1995). Trotzdem exprimierten NG108-15-Zellen ein Konstrukt aus der 5'-flankierenden Region des Ratten-B₂R-Gens und einem Reporter-gen (Pesquero *et al.*, 1994, 1996).

Bisher konnte bei Ratte (Wang *et al.*, 1994) und Maus (Ma *et al.*, 1994a) vor dem Translationsstart in Exon 4 nur eine Spleißakzeptorstelle identifiziert werden. Allerdings ergab aber die hier durchgeführte Analyse auf Spleißstellen eine weitere Spleißakzeptorstelle vor der hier am Anfang von Exon 4 ermittelten und in der Literatur bekannten. Diese Spleißakzeptorstelle liegt am Ende des 5'-Primers der RNB2-mRNA-Sonde. Das mit dem RPA ermittelte Transkript bildet somit von der Spleißakzeptorstelle bis zum Ende der Sonde eine Bande von 258bp. Somit existiert anscheinend kein weiterer Promotor vor Exon 4, sondern es existiert ein weiteres alternatives Transkript mit einem 5'-verlängertem Exon 4, dass hier mit der 5'-RACE nicht ermittelt werden konnte. Da die bisher identifizierten Transkripte mit Exon 3 aber an derselben Spleißakzeptorstelle zusammengefügt werden, wie das hier identifizierte und bisher in der Literatur bekannte Transkript ohne Exon 3 und dieses nicht mit der 5'-RACE nachgewiesen werden konnte, ist nicht klar, ob das Transkript, mit dem 5'-verlängerten Exon 4, Exon 3 beinhaltet. Ebenso könnten dem Transkript auch andere Exons fehlen und dieses ein neu ermitteltes Fragment im Herzen von Ratten darstellen. Um diesen Umstand weiter zu klären müssen weitere 5'-RACE, RPA-Analysen mit anders konstruierten Sonden bzw. Northern-Blot-Analysen durchgeführt werden, um das Transkript mit Exon 4a nachzuweisen und festzustellen, ob es Exon 3 beinhaltet oder ob andere Exons fehlen.

Auch bei der Maus wurde die hier ermittelte Struktur für das B₂R-Gen postuliert (Ma *et al.*, 1994a), jedoch misslang bisher der Versuch Exon 3 zu bestätigen (Cayla *et al.*, 2002). Das hier ermittelte Exon 3 der Maus wurde durch Sequenzvergleiche ermittelt und zeigte eine hohe Homologie zur Ratte. Es wurden jedoch keine entsprechenden Experimente, wie bei Cayla *et al.* (2002) durchgeführt. Die Sequenz der Maus zeigt aber eine ungewöhnliche 3'-Spleißstelle (GGC statt GGT), was dazu führen könnte, dass die Sequenz nicht mehr von der Spleißmaschinerie erkannt wird. Des Weiteren konnten Saifudeen *et al.* (2000) in der 5'-flankierenden Region des Gens zwei p53-,like'-Bindungsstellen identifizieren, und berichteten, dass das cis-Element AP-1 bei Maus und Mensch konserviert ist (Saifudeen *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu Maus und Ratte zeigten frühere Untersuchungen beim Menschen, die auch hier ermittelte Struktur des humanen Gens mit 3 Exons (Park *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994b; Kammerer *et al.*, 1995). Cayla *et al.* (2002) konnten die Existenz von 4 Exons beim Menschen in mehreren Transkripten demonstrieren (Cayla *et al.* 2002). Auch hier beruhen die Unterschiede darauf, dass die ermittelte Sequenz aus Sequenzvergleichen zusammengestellt wurde und nicht auf Experimenten, wie bei Cayla *et al.* (2002), begründet ist.

Da beide Transkripte den kompletten kodierenden Bereich beinhalten, wird über beide das gleiche Protein translatiert. Das mit dem RPA detektierte Transkript mit dem Exon 4a weist zwar einen weiteren offenen Leserahmen mit Startcodon auf (nicht gezeigte Daten), allerdings mit verschobenem Leseraster. Die Nutzung dieses Leserahmens ist unwahrscheinlich, da ein komplett anderes Protein entstehen würde. Somit scheint der Unterschied in diesem Bereich eine andere Rolle zu spielen. Beide Transkripte unterscheiden sich im 5'-untranslatierte Bereich vor Exon 4 nur um 37 bp und warum beide Spleißvarianten gebildet werden, kann nur vermutet werden. Allerdings ist bekannt, dass die 5'-UTR eukariontischer mRNA die Translationsinitiationseffizienz reguliert. ‚Scanning‘ behindern (Kozak, 1989). Dies konnten Curnow *et al.* (1995) beim AT₁R-Gen zeigen. Hier wurden die Transkripte nicht translatiert, die neben dem kodierenden Exon 5 auch Exon 1 aufwiesen, da Exon 1 eine solche Struktur ausbildet (Curnow *et al.*, 1995). Da sich stabile sekundäre Strukturen mit nur wenigen Basenpaaren ausbilden können (Kozak, 1989) und somit auch nur Teile eines Exons dafür verantwortlich sein können, kann dies auch beim B₂R-Gen nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin könnten in der 5'-UTR kurze offene Leserahmen vorhanden sein, welche die Translationsinitiation am nachgelagertem Startcodon reduzieren (Kozak, 1991). Dies konnte beim AT₁R-Gen gezeigt werden. Das alternative Exon 2 des Gens inhibierte, *in vivo* und *in vitro*, stark die Translation, da es ein Minigen mit einem ATG im optimalen Kontext beinhaltet (Curnow *et al.*, 1995). Analysen mit im Internet zur Verfügung gestellten Programmen zeigten jedoch für den B₂R kein Minicistron mit ATG (nicht gezeigte Daten). Um zu ermitteln ob dies beim B₂R-Gen eine Rolle spielt, müssen weitere Analysen der Sekundär-Struktur in der 5'-UTR und funktionelle *in vitro*-Analysen mit Konstrukten, aus einem aktiven Promotor, den beiden 5'-UTR und einem Reporter gen, durchgeführt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verschiedene 5'-UTR-Spleißvarianten nicht nur einen Einfluss auf die Translationseffizienz haben, sondern auch auf die RNA-Stabilität. Beispielsweise wiesen die verschiedenen mRNA-Spleißvarianten des humanen SP-A1- und SP-A2-Gen eine unterschiedliche Translationseffizienz auf und zeigten unterschiedliche mRNA-Zerfallsraten (Wang *et al.*, 2005).

Da das Transkript mit Exon 4a nur im Herzen der Ratte gezeigt werden konnte, könnte dies auf eine gewebe- bzw. zellspezifische Expression des Exon 4a deuten. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die obere Bande bei den RPA-Analysen mit Mäusen im Ventrikel etwas größer ist, als die obere Bande der anderen untersuchten Gewebe mit zwei Banden. Auch Frankton *et al.* (2004) zeigten, dass 5'-UTR auch gewebe- bzw. zellspezifische Effekte auf die mRNA- und Protein-

Expression ausüben. Ihre Transfektionsstudien demonstrierten, dass 35 bp von Exon 1 des Thyroidhormon β 1-Rezeptors in JEG-3-Zellen zu geringeren mRNA-Spiegeln bei gleicher Proteinexpression führten, diese in COS-7-Zellen die mRNA-Expression nicht inhibierten, aber die Translation unterdrückten (Frankton *et al.*, 2004). Auch bei den RPA-Analysen mit Kardiomyozyten konnte mit der RNB2-mRNA-Sonde zwei Transkripte nachgewiesen werden. Weitere Analysen mit Kardiomyozyten, glatten Aorta-Muskelzellen und kardialen Fibroblasten zeigten, dass Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen beide Banden exprimieren. Die Kardiomyozyten wiesen die stärkste Expression auf und die kardialen Fibroblasten keine (nicht gezeigte Daten). Um zu ermitteln, in welchen Geweben und Zellarten das Transkript mit Exon 4a exprimiert wird und welche Rolle es spielt, muss durch weitere 5'-RACE-, RPA- und funktionelle in vitro-Reporter-Gen-Analysen in anderen Geweben und verschiedenen Zellarten untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals auf die Regulation der beiden Transkript-Varianten bei der Ratte unter basalen und pathophysiologischen Bedingungen näher eingegangen. Das kürzere Transkript mit Exon 4 wurde unter basalen Bedingungen deutlich stärker (4-mal) exprimiert als das Transkript mit Exon 4a (4.1.1.3.2.). Ebenso zeigten die Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen eine stärkere Transkription dieser Spleißvariante. Auch bei der Maus konnte in Ventrikel, Lunge, Vorderhirn, Hirnstamm, Dünndarm, Magen und Thymus mit dem RPA diese Bande unter physiologischen Bedingungen als die dominantere ermittelt werden (Abb. 4.27-4.28). Vergleichbare Arbeiten konnten nicht gefunden werden. Aber Pesquero *et al.* (1994) zeigten bei verschiedenen Rattengeweben eine deutlich stärkere Expression des Transkriptes ohne Exon 3, jedoch wurden keine Herzen untersucht (Pesquero *et al.*, 1994). Weiterhin konnten McEachern *et al.* (1991) bei der Ratte zwei unterschiedliche Transkripte in verschiedenen Geweben nachweisen. Das kleinere Transkript wurde in den meisten Geweben deutlich stärker exprimiert. Jedoch konnte im Herz der Ratte nur das kürzere Transkript gezeigt werden (McEachern *et al.*, 1991). Auch unter pathophysiologischen Bedingungen ist das dominantere Transkript im Herzen, das Transkript mit Exon 4. Da aber beide Transkripte unter pathophysiologischen Bedingungen vergleichbar hochreguliert werden (Abb. 4.33, 4.36, 4.45, 4.54, 4.73, 4.81), ist die funktionelle Bedeutung der beiden Transkripte nicht klar.

Zusammengenommen umfasst das B₂R-Gen bei Nagetieren 3 Exons im untranslatierten Bereich des Gens und ein weiteres Exon auf dem sich die komplette kodierende Region befindet. Beim Menschen konnten in dieser Arbeit insgesamt nur 3 Exons ermittelt werden, aber laut Literatur ist auch beim Menschen ein weiteres vorhanden. Das Gen wird wahrscheinlich von dem bekannten Promotor vor Exon 1 reguliert, da kein weiterer vor Exon 4 identifiziert werden konnte. Im Herzen der Ratte existiert nicht nur die Transkriptvariante ohne Exon 3, sondern auch eine weitere mit einem 5'-verlängerten Exon 4 (Exon 4a). Bei diesem Transkript ist allerdings nicht klar, ob diese Exon 3 beinhaltet, weiterhin könnte ein weiteres vorhanden sein. Die funktionelle Bedeutung der B₂R-Transkripte ist bisher

nicht bekannt, könnten aber mit der Translationseffizienz, der RNA-Stabilität oder auch mit der zellspezifischen bzw. gewebespezifischen Expression im Zusammenhang stehen. Das Transkript mit Exon 4 wird unter basalen Bedingungen stärker exprimiert als das mit Exon 4a, diese Dominanz bleibt unter pathophysiologischen Bedingungen erhalten. Somit bleibt die funktionelle Bedeutung beider Spleißvarianten weiter ungeklärt.

5.2. Expression der Bradykinin-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen

5.2.1. Gewebespezifische und zeitabhängige Expression des B₁-Rezeptors unter physiologischen Bedingungen

Der B₁R wurde bei Mensch, Ratte, Maus und zahlreichen anderen Säugetieren in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Untersuchungen verschiedener Spezies konnten den B₁R im kardialen Gewebe, sowie in Venen und Arterien, und im zentralen Nervensystem nachweisen (Raidoo *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2000). Weitere Autoren zeigten, dass viele Spezies den Rezeptor auch in der Bauchspeicheldrüse, Milz, Darm, Uterus, Ovar, Hirn, Hippocampus, Hypophyse, Niere, Schilddrüse, Leber, Lunge, Prostata, Hoden exprimieren (Chai *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Marin-Castano *et al.*, 1998; Marceau *et al.*, 1998; Mahabeer & Bhoola, 2000).

Da das KKS laut Literatur in vielen Organen nachzuweisen ist, wurden ausgewählte Organe auf die Expression des B₁R untersucht. In dieser Arbeit exprimierten die männlichen Mäuse den Rezeptor in Hoden, Leber, kardialen Ventrikel, Atrium, Lunge, Niere, Dünndarm, Magen und Thymus. Die höchsten Expressionen zeigten sich in Lunge, Herz und Magen. Die weiblichen Tiere exprimierten den Rezeptor in denselben Geweben. Statt des Hodens wurden die Ovarien untersucht und auch hier konnte der B₁R detektiert werden. Bei den Weibchen war die Expression in Ovar, Lunge und Thymus am stärksten. In Milz, Vorderhirn, Hirnstamm konnte bei beiden Geschlechtern keine mRNA-Expression des B₁R gezeigt werden (Abb. 4.25). Bei den vier Monate alten Mäusen war die Expression des B₁R bei beiden Geschlechtern in Lunge, Magen und Thymus am stärksten (bei den Weibchen auch in den Ovarien), weshalb das ontogenetische Profil dieser Organe erstellt wurde. Der Rezeptor wurde schon bei Neugeborenen in Lunge, Magen und Thymus exprimiert. Im Laufe der Geschlechtsreifung verändert sich die mRNA-Expression des B₁R in Lunge und Magen bei Männchen und Weibchen nicht. Jedoch verringerte sich im Thymus die mRNA-Expression des B₁R im Verlauf der Ontogenese (Abb. 4.26).

Diese Daten stehen im Einklang mit anderen Arbeitsgruppen. Wie zu erwarten war exprimierten beide Geschlechter den B₁R auch in den Organen des Herz-Kreislauf-Systems und des Magen-Darm-Traktes, wie auch andere Arbeitsgruppen (Nolly *et al.*, 1985; Saed *et al.*, 1990). Auch Pesquero *et al.* (1996c) konnten bei Mäusen in Herz, Lunge, Niere und Leber schon unter basalen Bedingungen eine geringe Expression des B₁R detektieren (Pesquero *et al.*, 1996c). Des Weiteren fanden auch Allogho *et al.* (1995) unter physiologischen Bedingungen im Magen und Dünndarm von Mäusen den B₁R (Allogho *et al.*, 1995).

Die Reproduktionsorgane exprimierten den B₁R in beiden Geschlechtern mit am stärksten. In der Literatur fanden sich zur Expression des B₁R im Ovar und Hoden der Maus keine Daten. In anderen Spezies, wie der Ratte konnte der B₁R jedoch im Hoden (Ni *et al.*, 1998a) unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Auch beim Menschen wurde er unter physiologischen Bedingungen in Hoden und Ovar detektiert (Chai *et al.*, 1996). Die hohe mRNA-Expression im Ovar der Maus, wie in dieser Arbeit gezeigt, könnte durch die Östrogenproduktion im Ovar erklärt werden, da ein Einfluß von Östrogen auf das Expressionsverhalten von KKS-Komponenten bei weiblichen Tieren behauptet wird (Chao *et al.*, 1996; Madeddu *et al.*, 1997; Pelzer *et al.*, 2002).

In Milz, Vorderhirn und Hirnstamm wurden bei beiden Geschlechtern mit dem RPA keine mRNA-Expression des B₁R gezeigt. Da der B₁R als ein Rezeptor gilt, der unter physiologischen Bedingungen nur schwer, mit sehr sensitiven Methoden nachweisbar ist (Zhou *et al.*, 2000), könnte die B₁R-mRNA-Expression so gering sein und unter der Nachweisgrenze liegen um sie in diesen Geweben zu detektieren. Andererseits könnten diese Gewebe den B₁R unter basalen Bedingungen auch nicht exprimieren. Da aber bei der Maus in Nervenzellen (Seabrook *et al.*, 1997) der B₁R detektiert werden konnte, scheint es wahrscheinlicher, dass die Organe des zentralen Nervensystems den B₁R nur sehr gering exprimieren, unter der Nachweisgrenze des RPA. Die Milz (lymphatisches System) exprimiert den Rezeptor wahrscheinlich, wie das Vorder- und Stammhirn, nur unter der Nachweisgrenze, da sie von einem Gefäßnetz umgeben ist und im Endothel der B₁R nachgewiesen werden konnte.

In der Literatur fand sich zur Expression des B₁R im Thymus (lymphatisches System) der Maus keine Literatur. Da aber bei der Ratte, der B₁R unter physiologischen Bedingungen im Thymus nachgewiesen werden konnte (Jones *et al.*, 1999), ist es wahrscheinlich, dass der Rezeptor im Thymus der Maus vorhanden ist.

Zur murinen Expression des B₁R im Laufe der Ontogenese fand sich keine Literatur. Jedoch könnte die Abnahme der Expression im Thymus im Zusammenhang mit der Rückbildung des Thymus im Laufe der Geschlechtsreife stehen und hierbei eine funktionelle Bedeutung haben.

Bei der Ratte zeigten auch Niere, Lunge, Dünndarm und Herz unter physiologischen Bedingungen die Expression des B₁R (Jones *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1998). Wie auch bei den Mäusen in dieser Arbeit, konnte in Leber (Ni *et al.*, 1998a) und Gehirn (Jones *et al.*, 1999) von Ratten keine Expression des B₁R festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Daten bei der Maus in dieser Arbeit, konnte bei der Ratte keine Expression des Rezeptors in der Leber detektiert werden (Ni *et al.*, 1998a). Beim Menschen wurde der B₁R außer in Niere, Lunge, Magen, Atrium, LV auch in Hirn, Milz, Hoden, Ovarien und Leber gezeigt (Chai *et al.*, 1996).

Insgesamt wird der B₁R bei der Maus unter basalen Bedingungen nur sehr geringfügig oder nicht in allen Geweben exprimiert und ist nur mit sehr sensitiven Methoden nachweisbar. Man weiß, dass der B₁R unter pathophysiologischen Bedingungen stark hochreguliert wird, aber die Bedeutung unter physiologischen Bedingungen ist noch unklar. Von der Geburt bis zur Geschlechtsreife könnte der B₁R eine funktionelle Bedeutung haben, die im Thymus und weiteren lymphatischen Geweben noch näher untersucht gehört.

5.2.2. Gewebespezifische und zeitabhängige Expression des B₂-Rezeptors unter physiologischen Bedingungen

Bei Mensch, Maus und Ratte konnte der B₂R in zahlreichen Geweben detektiert werden (Regoli *et al.*, 1980; Ma *et al.*, 1994a; Hess *et al.*, 1994b; Shams *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996; Pesquero & Bader, 1998; Marceau *et al.*, 1998; Walden *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurden ausgewählte Organe, zB. des Herzkreislaufsystems, des Reproduktionssystems, des Magen-Darm-Traktes, des lymphatischen Systems und des zentralen Nervensystems auf die Expressions des B₂R untersucht. Bei männlichen Mäusen wurde hier eine Expression des B₂R in Hoden, Ventrikel, Atrium, Lunge, Niere, Hirnstamm, Vorderhirn, Magen und Dünndarm detektiert. Die Weibchen zeigten außer in diesen Organen, auch eine Expression des Rezeptors im Thymus. In der Leber und in der Milz wurde bei beiden Geschlechtern keine Expression des B₂R nachgewiesen (Abb. 4.27). Die stärkste Expression konnte bei beiden Geschlechtern in Lunge, Magen und Dünndarm gezeigt werden. In Lunge, Magen und Dünndarm wurde die Expression des B₂R im Verlauf der Ontogenese untersucht. Der Rezeptor wurde schon bei neugeborenen Mäusen in diesen Organen exprimiert und im Verlauf der Ontogenese zeigten beide Geschlechter keine Änderungen der Expressionsstärke in Lunge, Magen und Dünndarm (Abb. 4.28).

Die Daten dieser Arbeit sind in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen bei der Maus. Hess *et al.* (1993) konnten unter anderem in Gehirn, Herz und Niere die Expression des B₂R nachweisen (Hess *et al.*, 1993). Auch Ma *et al.* (1994a) detektierten in Gehirn, Herz und Niere den B₂R. Daneben wurde die Expression in Dünndarm, Lunge, Ovar und Hoden gezeigt (Ma *et al.*, 1994a). Wie auch in dieser Arbeit konnte bei der Maus in der Leber (Hess *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1994a) und in der Milz (Ma *et al.*, 1994a) keine Expression des B₂R festgestellt werden. Somit scheinen diese Organe den B₂R nicht zu exprimieren. Es könnte aber auch sein, dass die Organe den B₂R nur in sehr geringen Mengen exprimieren und deshalb in der Leber und Milz keine Expression nachweisbar war. Dann könnte die Nachweismethode nicht sensitiv genug ist. Die breite Verteilung der B₂R-mRNA in den Organen stimmt mit der weit verteilten B₂R-Aktivität überein (Bhoola *et al.*, 1992). Zur Expression des B₂R in der Maus oder anderen Spezies zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ontogenese fand sich keine Literatur. In der vorliegenden Arbeit änderte sich jedoch die Expression in Lunge, Magen und Dünndarm im Laufe der Alterung nicht.

Die Expression des B₂R im Magen der Maus konnte nicht durch Literatur belegt werden, auch für die Ratte fand sich keine Literatur. Jedoch wurde beim Menschen der B₂R auch im Magen nachgewiesen (Ma *et al.*, 1994b).

Im Einklang mit den Daten dieser Arbeit stehen auch die Arbeiten von Pesquero *et al.* (1996) und McEachern *et al.* (1991). Pesquero *et al.* (1996) konnte, passend zur Maus, auch bei der Ratte eine Expression des B₂R in Gehirn, Lunge Darm und Niere festgestellt werden. Im Gegensatz zur Maus konnte sie bei Ratten auch eine Expression des Rezeptors in der Leber detektieren (Pesquero *et al.*, 1996). McEachern *et al.* (1991) wies bei der Ratte in Herz, Lunge, Niere, Hoden und Hirn die Expression des B₂R.

Auch beim Menschen, konnte passend zu den Daten dieser Arbeit, der B₂R unter anderem in Lunge, Niere, Dünndarm, Hoden, Atrium, Ventrikel, Ovar und Magen festgestellt werden (Ma *et al.*, 1994b). Auch Song *et al.* (1996) zeigten im Gehirn die Expression des B₂R. Andere Untersuchungen beim Menschen wiesen im kardialen Gewebe, im zentralen Nervensystem und in endothelialen und vaskulären glatten Muskelzellen von Arteriolen die Expression des Rezeptors nach (Raidoo *et al.*, 1997; McLean *et al.*, 2000).

Der B₂R wird schon unter basalen Bedingungen bei der Maus in zahlreichen Geweben exprimiert, was die weitreichende Bedeutung des B₂R bei vielen physiologischen Vorgängen verdeutlicht und auch auf eine wichtige Rolle bei vielen pathophysiologischen Vorgängen hinweist. Beide Rezeptoren konnten in unterschiedlichen Systemen nachgewiesen werden, jedoch wurden die weiteren Untersuchungen auf das kardiovaskuläre System konzentriert, da hier das Hauptaugenmerk der Arbeit liegt.

5.3. Regulation der Bradykinin-Rezeptoren unter pathophysiologischen Bedingungen

Alle Komponenten eines funktionierenden KKS werden im Herzen exprimiert. Kinine sind an den wichtigsten kardiovaskulären Effekten, wie vaskuläre Dilatation und Permeabilität, verbesserte myokardiale Glukoseaufnahme, positiver Einfluss auf die Kontraktilität und Hemmung der Fibroseinduktion beteiligt (Tschöpe *et al.*, 1997a). Viele dieser Wirkungen werden durch die Stimulation des B₁R und B₂R über NO und Prostaglandine vermittelt. Unter Stressbedingungen ist die Regulation beider BKR unterschiedlich. So können pro-inflammatorische Zytokine, wie IL1 β und TNF α (Phagoo *et al.*, 1999; Sabourin *et al.*, 2002), und Stimuli verschiedener Peptidsysteme, wie die des RAS, an der Regulation der BKR beteiligt sein (Dean *et al.*, 1997; Tschöpe *et al.*, 2002; Marin-Castano *et al.*, 2002). Obwohl bekannt ist, dass der B₁R vor allem unter Stressbedingungen hoch reguliert wird, sind die Expression der BKR unter verschiedenen kardiovaskulären pathophysiologischen Bedingungen noch nicht im Detail untersucht worden. Eventuelle Einflussfaktoren, wie Zytokine müssen dabei mit einbezogen werden.

5.3.1. Modell der linksventrikulären Hypertrophie

Die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) erhöht beträchtlich das Risiko des plötzlichen Herztodes und anderer kardiovaskulärer Komplikationen (Lorell *et al.*, 2000). Neben verschiedenen Polymorphismen des RAS, spielt auch der +9/-9-B₂R-Polymorphismus bei Patienten mit LVH eine Rolle. Unter bestimmten Bedingungen besitzen Patienten mit niedrigen B₂R-Leveln (+9/+9 Genotyp) ein erhöhtes Risiko eine LVH zu entwickeln (Brull *et al.*, (2001). Dies zeigt die wichtige Rolle des KKS bei der Regulation des linksventrikulären Wachstums.

In dieser Arbeit wiesen die Tiere mit einer LVH nach Aorten-Banding einen enormen Anstieg des LVEDP auf. Die anderen hämodynamischen Herzparameter waren nicht

signifikant verändert (Tab. 4.7). Dies war mit einer Hochregulation beider Kinin-Rezeptor-mRNA-Spiegel assoziiert (Abb. 4.29) und zeigt die Bedeutung des Kininsystems bei der LVH.

Im Gegensatz zu dieser Arbeit, fanden Schunkert *et al.* (1990) 9 Wochen nach Aorten-Banding bei Wistar-Ratten eine signifikante Abnahme von dP/dt_{\max} und dP/dt_{\min} (Schunkert *et al.*, 1990). Die Sprague-Dawley-Ratten dieser Arbeit wiesen 6 Wochen nach dem Aorten-Banding nur eine tendentielle, aber keine signifikante, Verschlechterung dieser Parameter. Dies könnte an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten liegen und erst später zu einer signifikanten Veränderung der Parameter führen. Auch in einem Meerschweinchen-Modell mit abdominalen arterieller Verengung war die linksventrikuläre Relaxation nach 3 Wochen noch nicht signifikant beeinträchtigt (MacCarthy *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu dieser Arbeit zeigten Yayama *et al.* (2001, 2003), dass der kardiale B_2R in einem Mausmodell, mit abdominalen Aorteneinengung zwischen rechter und linker Arteria renalis, runter reguliert war (Yayama *et al.*, 2001). Gegensätzlich zum Modell dieser Arbeit, entwickelten die Tiere dieses Modells eine Hypertonie, was zur massiven Stimulation des systemischen RAAS führt. Das in dieser Arbeit genutzte Modell zeigte keine auffällige Aktivierung des systemischen RAS, aber eine enorme Zunahme des LVEDP. Die Zunahme des LVEDP gilt als Indikator für mechanischen Stress. So könnten die gegensätzlichen Ergebnisse bei thoraxialem und abdominalen ‚Aortenbanding‘ daran liegen, dass dort das systemische RAS unterschiedlich aktiviert ist. Des Weiteren könnten für die unterschiedlichen Ergebnisse der B_2R -mRNA-Expression bei Brust- und abdominalen ‚Aortenbanding‘ auch zeitabhängig sein. Da Yayama *et al.* (2001, 2003) die Runterregulation der B_2R -mRNA nur nach 2 und 7 Tagen fanden, nach 14 und 28 Tagen war diese unverändert (Yayama *et al.*, 2001, 2003). Da das Modell dieser Arbeit erst nach 6 Wochen analysiert wurde, scheinen die Änderungen erst im Laufe der Zeit zu entstehen. Zur Regulation des B_1R finden sich keine Arbeiten zum Vergleichen. Für die Hochregulation des B_1R könnten jedoch Zytokine und das RAAS als auslösende Faktoren verantwortlich sein. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse von Baumgarten *et al.* (2002) unterstützt, die eine Hochregulation von $NF\kappa B$ beim der supra-valvulären Aorteneinengung zeigten (Baumgarten *et al.*, 2002). Die Beteiligung der MAP-Kinase p38 deutet ebenfalls auf den Einfluss von $NF\kappa B$ und damit auf die Hochregulation des B_1R unter mechanischem Stress (Zhang *et al.*, 2000).

Zellkulturstudien mit Fibroblasten von Menschen und Ratten zeigten, dass BK die Wirkungen der proliferativen Stimuli des ‚transforming growth factor β ‘ (TGF- β), des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und des plättchenabgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF) verhindern kann (McAllister *et al.*, 1993). Des Weiteren hemmt BK über die Aktivierung des B_2R und folgender NO-Ausschüttung bei ventrikulären Ratten-Myozyten die Hypertrophie, die durch Stimulierung mit ANGI-II- und Phenylephedrin herbeigeführt wird (Ishigai *et al.*, 1997). Somit scheint ein intaktes KKS wesentlich für die Regulation des myokardialen Wachstums zu sein. Tatsächlich entwickelten B_2R -defiziente Mäuse eine LVH und Herzversagen

(Emanuelli *et al.*, 1999). Transgene Ratten, die zusätzlich humanes Gewebe-KLK exprimieren, zeigten weniger kardiale Hypertrophie und Fibrose als Wildtyp-Ratten (Silva *et al.*, 2000). Andererseits bewirkt der genetische ‚knockout‘ des B₂R eine Verbesserung der Salz-induzierten Hypertonie und der hypertrophischen Kardiomyopathie (Emanuelli *et al.*, 1999).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die beiden Kinin-Rezeptoren im kardiovaskulären System an der Regulation der LVH beteiligt sind. Obwohl das Tier ohne einen gewissen Grad an Hypertrophie die Stenose nicht überwinden und nicht überleben kann, scheint die Hochregulation beider Rezeptoren einen positiven Effekt bei der LVH nach ‚Aortenbanding‘ zu haben. Da Kinine anti-hypertrophe Effekte aufweisen (Ishigai *et al.*, 1997; Kintsurashvili *et al.*, 2001), könnte die Hochregulation der B₁R und B₂R einen Kompensationsversuch darstellen um die Hypertrophie zu begrenzen. Weitere Studien in diesen und anderen Tiermodellen, sowie beim Menschen sind nötig um das Wissen über die Beteiligung des KKS bei der linksventrikulären Hypertrophie zu vertiefen.

5.3.2. Modell der diabetischen Kardiomyopathie

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die B₁R und B₂R unter diabetischen Bedingungen verhalten, da beide Rezeptoren in pathophysiologische kardiovaskuläre Vorgänge verwickelt sind.

In der Framingham Studie wurde erstmals die Existenz der diabetischen Kardiopathie bestätigt (Kannel *et al.*, 1974). Diese ist unabhängig von Hypertonie und koronarer Herzkrankheit (Zarich 1989; Grossman & Messerli 1996; Tschöpe & Rösen, 1998). Daten aus experimentellen Studien weisen auf die Aktivierung von vasokonstriktorisch- und proliferativ wirkenden Peptidsystemen unter diabetischen Bedingungen hin. Hierbei müssen nicht alle Komponenten des RAS erhöht sein, sondern das antagonistisch wirkende KKS könnte abgeschwächt oder wirkungslos sein (Tschöpe *et al.*, 1997a). Bei der diabetischen Kardiopathie ist das KKS nur unzureichend untersucht. Die kardioprotektiven Effekte des KKS könnten jedoch bei der Behandlung der diabetischen Kardiopathie von Nutzen sein.

In dieser Arbeit wurde die Induktion des Diabetes mellitus Typ I mit dem Breitband-Antibiotikum STZ induziert. Dieses Breitband-Antibiotikum wird aus *Streptomyces achromogenis* isoliert (Herr *et al.*, 1960) und weist neben antibiotischen, auch karzinogene Eigenschaften auf (Arison & Feudale, 1967). Daneben besitzt es auch eine stark diabetogene Wirkung, was bei Ratten, Hunden, Hamstern, Affen, Mäusen und Meerschweinchen nachgewiesen wurde (Rerup, 1970). Diese Tiere benötigen keine Insulintherapie, was vorteilhaft ist, da KLK durch Insulin kontrolliert wird (Rösen *et al.* 1996).

Das Streptozotocin (STZ) bewirkte bei den behandelten Wildtyp-Tieren, eine erwartete Erhöhung des Blutglukosespiegels. Ebenso wiesen die STZ-diabetischen Tiere einen typischen Körpergewichtsverlust auf (Abb. 4.31; Anlage 20). Die Werte für Hyperglykämie und Gewichtsverlust der TGR(hKLK1)-Ratten unterschieden sich

nicht von den typischen Werten bei STZ-induzierten Wildtyp-Ratten (Abb. 4.31; Anlage 21).

Zu den Spätfolgen des Diabetes mellitus zählen unter anderem die diabetische Nephropathie, Arteriosklerose, koronare Herzkrankheiten und Herzinfarkt. Das in dieser Arbeit genutzte Modell zeigt zwar schon nach 4-6 Wochen hämodynamische und Gewebeveränderungen des Herzens, weist aber noch keine fortgeschrittenen Schädigungen auf. Damit hat dieses Modell noch keine Querverbindungen zwischen den Gefäßen ausgebildet. Auch die Veränderungen an der Niere sind noch nicht fortgeschritten, was beim Menschen wiederum eine Aktivierung des RAAS bewirkt. Die Werte zeigen die Stoffwechselstörung mit irreversibler Schädigung der B-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas (Mansford & Opie, 1968; Rerup et al., 1970) und spiegeln die veränderte Stoffwechsellage beim Diabetes mellitus wider. Ebenso kann man von vergleichbaren hyperglykämischbedingten systemischen Wirkungen bei den transgenen Tieren ausgehen. Die behandelten Tiere waren für die weiteren Experimente geeignet.

5.3.2.1. Expression der Bradykinin-Rezeptoren beim diabetischen Wildtyp

Diabetes mellitus wird mit der Entwicklung myokardialer Funktionsstörungen verbunden, die unabhängig von Koronararterienerkrankungen, systemischer Hypertonie oder Herzklappenerkrankungen sind (Kannel *et al.*, 1974). Zahlreiche Veränderungen des KKS wurden bei diabetischen Patienten und entsprechenden Tiermodellen abhängig vom Schweregrad der Erkrankungen beschrieben. Im Verlauf der Diabetes kommt es zu myokardialen und vaskulären Veränderungen. Einige dieser Veränderungen beeinträchtigen die endotheliale Synthese und Ausschüttung der vasoaktiven Peptide des kardialen KKS (Tooke, 1987). Neben diesen Veränderungen scheint auch die Wirkung von BK bei Diabetes mellitus beeinträchtigt zu sein. Ha und Dunham (1987) konnten eine deutlich reduzierte gefäßdilatorische Wirkung von exogen appliziertem BK bei STZ-diabetischen Tieren zeigen (Ha & Dunham, 1987).

Die diabetischen Tiere dieser Arbeit wiesen im Vergleich zu den stoffwechselgesunden Tieren einen höheren Herzindex auf. Ebenfalls waren LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den stoffwechselgesunden Tieren beeinträchtigt. (Tab. 4.8). Die B_1R - (Abb. 4.32, 4.35) und die B_2R - (Abb. 4.33, 4.36) mRNA-Expression waren bei den diabetischen Tieren im linken und rechten Ventrikel signifikant erhöht. Auch konnte eine Hochregulation von IL1 β im linken (Abb. 4.34) und rechten (Abb. 4.37) Ventrikel des Herzens von diabetischen Ratten demonstriert werden.

Auch andere Arbeitsgruppen zeigten eine eingeschränkte kardiale Funktion bei der diabetischen Kardiopathie. Passend zu den Daten dieser Arbeit, wurde von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass die diabetische Kardiopathie durch eine Reduktion von LVP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} und einen erhöhten Herzindex gekennzeichnet ist

(Dhalla *et al.*, 1998; Litwin *et al.*, 1990; Miric *et al.*, 2001; Penpargkul *et al.*, 1980; Sharma *et al.*, 1998; Vadlamudi *et al.*, 1982).

In dieser Arbeit ist die eingeschränkte Herzfunktion durch Änderungen von KKS-Komponenten begleitet. Passend dazu, deuteten Untersuchungen von Pheng *et al.* (1997) an, dass diabetische Mäuse eine erhöhte B₁R- bzw. B₂R-Expression aufweisen. Sie demonstrierten 15 Tage nach STZ-Gabe bei männlichen Mäusen eine signifikant höhere Kontraktion von Magengewebe durch Applikation von des-Arg-BK und BK (Pheng *et al.*, 1997). Die Untersuchungen von Christopher *et al.* (2001) weisen auf eine Hochregulation des B₁R und B₂R bei STZ-induziertem Diabetes. Sie zeigten eine signifikante Hochregulation der B₁R- und B₂R-mRNA durch Glukose in vaskulären, glatten Muskelzellen aus Aorten von Ratten, die von der Glukose-Inkubationszeit abhängig war (Christopher *et al.*, 2001). Die Daten dieser Arbeit wurden 6 Wochen nach STZ-induziertem Diabetes erhoben. Weitere Untersuchungen von Christopher und Jaffa (2002) offenbarten in der Niere 3, 7 und 21 Tage nach STZ-Induktion von Diabetes eine Expression von B₁R- und B₂R-mRNA. Die B₁R-mRNA war bei den diabetischen Ratten zu allen Zeitpunkten signifikant höher als bei den Kontrollen und war nach 7 Tagen deutlich höher als nach 3 Tagen. Nach 21 Tagen jedoch war sie schon geringer als nach 7 Tagen. Die B₂R-mRNA-Expression war 3 Tage nach STZ-Gabe am höchsten, sank nach 7 Tagen auf einen Tiefpunkt, wobei die Expression geringer war als bei den Kontrollen. 21 Tagen nach der STZ-Injektion war sie wieder deutlich höher als die Kontrollen, aber nicht so hoch wie nach 3 Tagen (Christopher & Jaffa, 2002).

Bei Diabetikern ist die endotheliumabhängige Vasodilatation beeinträchtigt. Da die Aktivierung des B₁R zur endotheliumabhängigen Relaxation führen kann (Toda *et al.*, 1987; Rhaleb *et al.*, 1989), könnte dies eine Alternative des KKS sein. Weiterhin ist bei der diabetischen Kardiopathie, die potentielle NO-vermittelte Eigenschaft der Kinine, Radikale abzufangen, sind von besonderer Bedeutung. Auch die endothelabhängige Vasodilatation, die antifibrotische Funktion und die anregende Wirkung auf die Glukoseaufnahme sind beim Diabetes nützlich (Rett *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2000; Shiuchi *et al.*, 2002). Unter diabetischen Bedingungen wird der Stoffwechselstress durch die Stimulierung des RAAS und der Zytokinkaskade begleitet (Lechleitner *et al.*, 2000). So wird beispielsweise NF κ B unter STZ-Bedingungen in der Retina, der Niere und im Herzen hoch reguliert, was die Rolle der Zytokine bei der Hochregulation des B₁R verdeutlicht (Chen *et al.*, 2003). Weiterhin scheint die Hochregulation der p38-MAP-Kinase eine Rolle dabei zu spielen (Helliwell *et al.*, 2000; Igarashi *et al.*, 1999), da diese abhängig von Glukose-Konzentration und Inkubationszeit in vaskulären, glatten Muskelzellen von Rattenaorten hochreguliert wird (Igarashi *et al.*, 1999).

Weitere Arbeiten zeigten, dass bei der diabetischen Nephropathie die Gewebe-KLK-Konzentration und Aktivität im Herzen von SHR- und WKY-Ratten reduziert ist (Sharma und Kaveso, 1996; Sharma *et al.*, 1998). Auch die Reduktion der rKLK-Expression konnte gezeigt werden (Tschöpe *et al.*, 1999b.) Damit könnte unter STZ-diabetischen Bedingungen eine Störung der Kinin-Bildung vorliegen und die Hochregulation der beiden BKR eine Kompensation dieser sein. Die Hochregulation

der B₂R-Expression könnte so den koronaren Blutfluss und die kardiale Arbeit aufrechterhalten.

Zusammengenommen zeigt diese Arbeit, dass es bei der diabetischen Kardiomyopathie zu einer Hochregulation der BKR kommt. Wahrscheinlich ist, dass die Zytokinkaskade an der Hochregulation der BKR beteiligt ist, was auch durch die Hochregulation von IL1 β in dieser Arbeit und durch die Hochregulation anderer Zytokine in anderen Untersuchungen angedeutet wird. Weitere Untersuchungen zu den BKR im Verlauf der diabetischen Kardiomyopathie könnten dazu beitragen, die Rolle der Rezeptoren bei STZ-diabetischem Diabetes zu vertiefen.

5.3.2.2. Expression der Bradykinin-Rezeptoren bei diabetischen Tieren mit aktiviertem Kallikrein-Kinin-System

Ein entscheidender Faktor für die Herzfunktion ist der Zustand des KKS und unter STZ-diabetischen Bedingungen ist wahrscheinlich eine Kininbildungsstörung vorhanden. Durch pharmakologische Eingriffe und ‚gene targeting‘ kann eine Potenzierung von Kininen induziert werden. Diese Potenzierung schwächt unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen kardiale Funktionsstörungen und Schäden ab (Yoshida *et al.*, 2000; Emanuelli *et al.*, 2002; Tschöpe *et al.*, 2004). Bei transgenen Ratten, die zusätzlich das humane KLK1 exprimieren (TGR(hKLK1)), konnten kardioprotektive Effekte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, wie kardialer Ischämie und bei Isoproterenol-induziertem Stress, festgestellt werden (Pinto *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000; Tschöpe *et al.*, 2004).

Da sich die basalen Hyperglykämiewerte und Gewichtsverluste der TGR(hKLK1)-Ratten nicht von den Werten bei STZ-induzierten Wildtypmännchen unterscheiden, kann man von vergleichbaren Bedingungen bei den transgenen Tieren ausgehen. Auch die diabetischen transgenen Tiere in dieser Arbeit hatten im Vergleich zu den stoffwechselgesunden einen höheren Herzindex, zwischen TGR(hKLK1)- und Wildtyp-Tieren gab es keinen Unterschied. Wie bei den Wildtypmännchen, waren LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} auch bei den diabetischen transgenen Tieren im Vergleich zu den stoffwechselgesunden Tieren reduziert. Jedoch zeigten die transgenen Tiere eine geringere Beeinträchtigung als die Wildtyp-Tiere (Tab. 4.8). Bei den TGR(hKLK1)-Tieren konnte die Expression des humanen KLK1 detektiert werden, bei den Wildtypmännchen nicht. Durch die Induktion von Diabetes verringerte sich die humane KLK1-Expression im Vergleich zu den stoffwechselgesunden transgenen Ratten (Tab. 4.9). Die B₁R-mRNA-Expression (Abb. 4.32, 4.35), sowie auch die des B₂R (Abb. 4.33, 4.36) waren bei den TGR(hKLK1)-Tieren im linken Ventrikel signifikant erhöht, im rechten nur die des B₁R. Die B₁R- und B₂R-Spiegel waren bei den transgenen Tieren deutlich höher als beim Wildtyp. Ebenso war IL1 β im linken (Abb. 4.34) und rechten (Abb. 4.37) Ventrikel des Herzens hochreguliert.

Die signifikante Beeinträchtigung der Parameter LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} bei diabetischen Wildtypmännchen früherer Untersuchungen (Penpargkul *et al.*, 1980; Dixon *et al.*, 1990), konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Das aktivierte KKS unter diabetischen Bedingungen führte zu einer deutlichen Verbesserung dieser

Parameter, ebenso zur deutlichen Verbesserung des Herzindex. Passend zu diesen Ergebnissen, berichteten Fujii *et al.* (2002) über einen nützlichen Effekt des BK auf die linksventrikuläre Funktion bei Tachikardie-induziertem Herzversagen in Hunden (Fujii *et al.*, 2002). Beim STZ-induzierten Diabetesmodell kommt es 2-3 Wochen nach der Injektion von STZ zur linksventrikulären Funktionsstörung. Die Diabetes-induzierte Funktionsstörung der Kontraktilität wurde durch die Expression von hKLK1 deutlich abgeschwächt.

Die Einschränkung der Herzfunktion wurde auch bei den Tieren, die das humane KLK exprimieren, von Änderungen der KKS-Komponenten begleitet. Die diabetischen transgenen Tiere exprimierten weniger humanes KLK als die stoffwechselgesunden transgenen Tiere. Im Gegensatz dazu demonstrierten Jaffa *et al.* (1995) in der Niere von diabetischen Ratten erhöhte Gesamt-KLK-Spiegel. Diese Tiere wurden allerdings mit Insulin behandelt (Jaffa *et al.*, 1995). Da auch Glukose einen Einfluß auf andere KKS-Komponenten zeigte (Christopher *et al.*, 2001, 2002), scheint die KLK-Aktivität insulinabhängig zu sein. Passend zu den Daten dieser Arbeit, konnten Tschöpe *et al.*, (1999a) eine Reduktion der KLK-Aktivität in der Nebennierenrinde und im Nierenmark, 12 Wochen nach STZ-Gabe in Wistar-Ratten detektieren (Tschöpe *et al.*, 1999a). Tschöpe *et al.* (1999b) beschrieben 12 Wochen nach Diabetes-Induktion auch im Herzen eine Reduktion der Expression von KLK1 und 7 in Wistar-Ratten (Tschöpe *et al.*, 1999b). Ebenso wurden gezeigt, dass die kardialen immunreaktiven KLK-, sowie die Kininogen-Spiegel bei diabetischen Tieren reduziert sind (Sharma *et al.*, 1998). Die reduzierte KLK-Expression hatte jedoch keinen Einfluss auf die kardialen BK-Spiegel (Tschöpe *et al.*, 1999a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BKR-Spiegel unter STZ-diabetischen Bedingungen, trotz der reduzierten KLK-Spiegel, hochreguliert sind. Dieses stimmt mit anderen Studien überein, die eine frühe Hochregulation der BKR in den Gefäßen und im Rückenmark unter STZ-diabetischen Bedingungen zeigten (Cloutier & Couture, 2000; Christopher *et al.*, 2001; Mage *et al.*, 2002). Zugleich wurde bei den diabetischen TGR(hKLK1)-Tieren eine stärkere Zunahme der B₁R-mRNA-Expression als bei den diabetischen Wildtypmatten im linken und rechten Ventrikel detektiert, die auch bei den transgenen Tieren von einer signifikanten Erhöhung der IL1 β -Expression begleitet war. Die B₂R-mRNA war ebenfalls erhöht. Folglich führte schon allein die Expression des hKLK1 zu erhöhten BKR-Spiegel. Bei den transgenen Ratten, die zusätzlich das humane KLK1 exprimieren (TGR(hKLK1)), konnten auch kardioprotektive Effekte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, wie kardialer Ischämie und bei Isoproterenol-induziertem Stress, festgestellt werden (Pinto *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000; Tschöpe *et al.*, 2004). Eine Verbesserung der derangierten extrazellulären Matrix war dabei am bedeutensten (Tschöpe *et al.*, 2004). Weiterhin konnten Emanuelli *et al.* (2001) nach adenoviralem Gentransfer des hKLK bei Ratten eine erhöhte Gefäßentwicklung zeigen, die vermutlich durch die vermehrt freigesetzten Kinine über den B₁R und B₂R eine vermehrte NO- und Prostaglandinausschüttung bewirkt wird.

Somit deuten die Ergebnisse auf einen TGR(hKLLK1)-spezifischen kompensatorischen Mechanismus, der mit einem gesteigerten BKR-Umsatz bei einem aktivierten KKS verbunden sein könnten. Auch eine Glukoseabhängigkeit wie bei anderen KKS-Komponenten könnte hier eine Rolle spielen. Auch hier scheint die Zytokinkaskade, was in dieser und anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, an der Hochregulation der BKR bei der diabetischen Kardiomyopathie beteiligt zu sein. Die stärkere Aktivierung der BKR scheint die Folgen des STZ-induzierten Diabetes mellitus deutlich zu vermindern und das Fortschreiten der diabetischen Kardiopathie zu verzögern, was die kardioprotektive Rolle der BKR beim Diabetes zeigt.

5.3.3. Der Myokardinfarkt

Beim MI kommt es bei anhaltender Ischämie durch mangelhafte Sauerstoffversorgung des Herzmuskels zur Nekrose der Herzmuskulatur (Riede et al., 1999). Nach dem MI kommt es zur Ausbildung einer Narbe und zum kardialen ‚Remodeling‘ (Braunwald et al., 2001; Cleutjens et al., 2002; Pfeffer et al., 1995). Beim MI wird das KKS aktiviert, was mit einem Anstieg von BK im Plasma und Kininogen einhergeht (Hashimoto et al., 1978; Kimura et al., 1973). Ebenso spielen Zytokine bei den verschiedenen Phasen der Wundheilung eine Rolle (Weber et al., 2000). Das Zytokins Interleukin 1 β (IL1 β) wird während des Herzinfarktes hoch reguliert und ist in der Lage, die Expression der BKR unter inflammatorischen Bedingungen zu modulieren (Pan et al., 1996; Tschöpe, 1997b; Zhou et al., 1998). Dies könnte zum ‚Remodeling‘ der extrazellulären Matrix beitragen (Mizushige et al., 2000). Die Veränderungen der extrazellulären Matrix tragen durch die Akkumulation von Kollagen, zur Wandsteife der Ventrikel bei (Riva et al., 1998). ACE und Mediatoren, wie Prostaglandin und NO, die durch BK, über die BKR stimuliert werden, wurden mit der kardialen Fibrose in Verbindung gebracht (Fabris et al., 1990; Zhou et al., 1993). Kollagen I und III machen den größten Anteil am myokardialen Kollagen aus (Pelouch et al., 1993).

Die kardiale Charakterisierung der Wildtyptiere zeigte, dass der MI, zu allen untersuchten Zeitpunkten (Tab. 4.10 - 4.12), durch Erhöhung des Herzindexes, eine Reduktion des LVP und der dP/dt_{max} , sowie einer Beeinträchtigung des LVEDP und dP/dt_{min} gekennzeichnet ist. Auch andere Untersuchungen und Studien konnten zeigen, dass die Herzfunktion beim MI eingeschränkt ist (Guillen *et al.*, 1995 Ono *et al.*, 1998; Stauss *et al.*, 1994). Ein Einfluss der erfolgten operativen Eingriffe wurde in dieser Arbeit ausgeschlossen, indem scheinoperierte Tiere als Kontrollen verwendet wurden.

Bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit und dem Beschwerdebild Angina Pectoris treten immer wieder kurzzeitige Ischämien auf, was die Bildung von Kollateralgefäßen stimuliert. Bei dem hier genutzten Modell, mit akuten und dauerhaften Verschluss der RIVA, wurden keine Querverbindungen zwischen den Gefäßen bzw. Umgehungen ausgebildet, da der Verschluss der Arterie nicht allmählich, sondern abrupt entstand. Somit besitzt auch dieses Tiermodell einschränkende Faktoren.

Nach dem MI werden zahlreiche Stoffwechselwege aktiviert, die für die erste Stabilisierung nach dem Myokardinfarkt notwendig zu sein scheinen. Dauerhaft sind diese vasokonstriktorisches wirkenden Peptide, wie das Angiotensin II, Endothelin und das Noradrenalin, jedoch schädigend für das Herz. Neben den vasokonstriktiven Peptiden werden aber auch vasodilatative Peptide ausgeschüttet, wie die Kinine, welche ihre Effekte über die Bradykinin-Rezeptoren B₁R und B₂R ausüben (Parrat *et al.*, 1993).

5.3.3.1. Expression des B₁-Rezeptors beim Myokardinfarkt

Der B₁R gilt als ein Rezeptor, der unter physiologischen Bedingungen nur schwer mit sehr sensitiven Methoden nachweisbar ist und bei einer Stimulation, wie der Inflammation, *de novo* synthetisiert wird. Er ist ein induzierbarer Rezeptor, weist keine Reduktion der Affinität zu seinem Liganden auf und dieser dissoziiert nur langsam. Ebenso findet keine Rezeptorsequestration statt, nur eine partielle Desensitisation (Zhou *et al.*, 2000). Durch diese Eigenschaften zeigt der B₁R eine stabile Signalführung (Faussner *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit konnte die B₁R-mRNA im linken Ventrikel zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Scheinoperation und nach Myokardinfarkt noch nicht gezeigt werden (Abb. 4.76). Jedoch wurde 6 Tage (Abb. 4.40, 4.53, 4.55) und 3 Wochen (Abb. 4.43, 4.44, 4.47) nach der Scheinoperation sowohl die mRNA und das Protein des B₁R im linken Ventrikel detektiert werden. Im rechten Ventrikel konnte 3 Wochen nach Scheinoperation der B₁R nicht detektiert werden (Abb. 4.51). 6 Tagen und 3 Wochen nach Myokardinfarkt war sowohl die mRNA- (Abb. 4.43, 4.44, 4.53, 4.58, 4.59) als auch das Protein (Abb. 4.40, 4.47, 4.55, 4.62, 4.63) des Rezeptor im linken Ventrikel zu finden. Auch im rechten Ventrikel wurde 3 Wochen nach Myokardinfarkt die B₁R-mRNA nachgewiesen (Abb. 4.51). Sowohl die mRNA- (Abb. 4.44) als auch die Protein-expression (Abb. 4.40, 4.47) war in den Infarktarealen stärker hochreguliert als in den Nicht-Infarktarealen. Dieses war beim B₁R wesentlich deutlicher zu sehen als beim B₂R.

In 30µg mRNA war sechs Stunden Scheinoperation im linken und 3 Wochen danach im rechten Ventrikel keine Expression des B₁R zu detektieren, obwohl die mitgeführte Positivkontrolle (Ratten-Ileum) eine zeigte. So ist die Expression, wenn überhaupt, nur unter der Nachweisgrenze des RPA vorhanden. In dieser Arbeit konnte erst zu späteren Zeitpunkten nach Scheinoperation sowohl die mRNA und das Protein des B₁R im linken Ventrikel nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten andere den B₁R schon unter basalen Bedingungen in verschiedenen Organen, wie Herz, Lunge und Magen mit sehr empfindlichen Methoden nachweisen. Auch die Mäuse in dieser Arbeit exprimierten den Rezeptor schon unter basalen Bedingungen im Herzen (siehe auch 5.2.1.). Beispielsweise wies Marceau *et al.* (1999) mit der nicht-quantitativen ‚duplex PCR‘, mit vielen Amplifikationszyklen, die B₁R-mRNA im Kaninchen nach (Marceau *et al.* 1999) und die Applikation eines B₁R-Agonisten führte zu einer kontraktilen Antwort bei Magengewebe von gesunden Mäusen (Allogho *et al.*, 1995). Somit wird der B₁R wahrscheinlich auch schon 6 Stunden nach

Scheinoperation exprimiert. Eine Ursache für die stärkere Expression des B₁R 6 Tage und 3 Wochen nach Scheinoperation könnte der operative Eingriff sein, der sich 6 Stunden nach der Scheinoperation noch nicht bemerkbar macht. Dabei könnten eine minimale Herzgewebeverletzung oder Reizung des Herzgewebes durch das Einlegen des Fadens zu einer inflammatorischen Reaktion geführt haben. Womit die Expression des B₁R durch Zytokine verursacht worden wäre, da diese die Expression des B₁R induzieren können (Bachvarow *et al.*, 1998; Marceau *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1996; Tschöpe, 1997b; Zhou *et al.*, 1998). Auch in dieser Arbeit waren die B₁R-Spiegel parallel zu den IL1 β -Spiegeln angehoben (siehe auch 5.3.3.5.). Passend dazu konnten Vianno und Calixto (1998) zeigen, dass die Injektion von desArg⁹-BK bei Mäusen eine inflammatorische Reaktion in der Pleurahöhle induzierte (Vianna & Calixto, 1998).

Weiterhin konnten, obwohl der B₁R unter basalen Bedingungen im Herzen nur schwer nachweisbar ist, trotzdem kardiale Effekte durch klassische B₁R-Agonisten, wie desArg⁹-BK und desArg⁹-KL beobachtet werden. Diese Effekte unterscheiden sich jedoch nicht von denen der B₂R-Agonisten (Chahine *et al.*, 1993). Die Vermutung, dass die B₁R-Agonisten ihre Wirkung über den B₂R ausüben, ist aber relativ unwahrscheinlich, da die Affinität der B₁R-Agonisten zum B₂R nur sehr gering ist (Menke *et al.*, 1991; Pesquero *et al.*, 1996; Marceau *et al.*, 1998). Andererseits könnten B₁R-Agonisten ihre Effekte über weitere BKR, wie bei Vögeln nachgewiesen (Bhoola *et al.*, 1992; Hall, 1997), auch bei Säugetieren bewirken.

Zur Hochregulation des B₁R nach dem Myokardinfarkt sind kaum Daten verfügbar. Die Beteiligung der B₁R-Achse und seine Rolle beim Myokardinfarkt sind kaum untersucht und noch unklar. Bisher demonstrierte nur unsere Arbeitsgruppe eine Hochregulation des B₁R in der frühen (6 und 24 Stunden nach Myokardinfarkt) und der späten (6 Tage nach Myokardinfarkt) entzündlichen Phase der Wundheilung nach dem Myokardinfarkt. Jedoch konnte in dieser Arbeit in der frühen Phase (6 Stunden nach Myokardinfarkt) noch keine B₁R-mRNA nachgewiesen werden. Erst 6 Tagen und 3 Wochen nach Myokardinfarkt konnte in beiden Ventrikeln eine Expression des B₁R gezeigt werden, die durch den Nachweis der Proteinexpression bestätigt wurde. Tschöpe *et al.* (2000a) konnten im rechten Ventrikel jedoch zu keiner Zeit nach dem Myokardinfarkt eine Expression des B₁R feststellen, aber im linken Ventrikel (Tschöpe *et al.*, 2000a, b, c). Für die Hochregulation des B₁R nach dem Myokardinfarkt im Herzen, sprechen, die zuvor in anderen Studien gezeigten gesteigerten Spiegel an KLK, Kininogen und BK im Plasma (Kimura *et al.*, 1973; Hashimoto *et al.*, 1977). Hier korrelierte die Zunahme des Plasma-KLK positiv mit der Überlebensrate der Patienten mit Myokardinfarkt (Hashimoto *et al.*, 1978). Lamontagne *et al.* (1995) zeigten, dass während des Myokardinfarktes Kinine direkt vom Myokardium ausgeschüttet werden (Lamontagne *et al.*, 1995) und an den Effekten der ischämischen Schädigung beteiligt sind (Hashimoto *et al.*, 1978).

Ferner könnten Zytokine und das RAS an der ischämieabhängigen B₁R-Hochregulation beteiligt sein, da alle Phasen der Gewebeheilung durch eine frühe Zunahme an Zytokinen, wie TNF α und IL1 β (Yue *et al.*, 1998; Phagoo *et al.*, 1999; Sabourin *et al.*, 2002), und durch die Aktivierung des RAS (Dean *et al.*, 1997; Marin-Castano *et al.*,

2002; Tschöpe *et al.*, 2002) charakterisiert sind. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL1 β , parallel zum B₁R, nach dem Myokardinfarkt zu den untersuchten Zeitpunkten hochreguliert ist (siehe 5.3.3.5.).

Da der natürliche Agonist des Arg⁹-BK zur starken Kontraktion von Myofibroblasten im Granulationsgewebe führte, was auf die Hochregulation des B₁R im Infarktareal deutet und somit die Kontraktion vermittelt (deBlois *et al.*, 1992), könnte auch die erhöhte Wandspannung nach dem Myokardinfarkt im linken Ventrikel mit der Hochregulation der B₁R-mRNA im Zusammenhang stehen.

Die Verteilung des B₁R im Infarkt- und Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels 3 Wochen nach Induktion des MI interessant, weil sowohl der rechte und linke Ventrikel des Herzens, sowie das Septum nach dem Myokardinfarkt ein ‚Remodeling‘ durchlaufen. Sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression war in den Infarktgebieten stärker hochreguliert, als in den nicht vom Infarkt betroffenen Arealen und dieses war wesentlich deutlicher beim B₁R als beim B₂R zu sehen. Das könnte darauf hindeuten, dass der B₁R im stark geschädigten Areal eine wichtigere Rolle als der B₂R spielt. Auch Ergebnisse von Xu *et al.* (2005) weisen darauf, dass der B₁R eher in die Regulation der strukturellen Homöostase involviert ist, da sie bei B₁R-defizienten Mäusen ein erhöhtes Herzgewicht, Myozytengröße und linksventrikuläre Kammerdimension zeigen konnten. Außerdem erhöhte der Mangel des B₁R tendenziell die Kollageneinlagerung, was die Hypothese unterstützt, dass der B₁R in die Erhaltung der kardialen Strukturintegrität verwickelt ist.

Der B₁R ist unter basalen Bedingungen nur schwer mit sehr sensitiven Methoden nachweisbar und seine Rolle unter basalen Bedingungen bleibt weiterhin ungeklärt. Nach dem Myokardinfarkt wird er stark hochreguliert. Da die Funktion des B₁R nach dem Myokardinfarkt noch nicht vollständig untersucht ist, kann nur spekuliert werden, ob hämodynamische oder Gewebereparaturmechanismen an der B₁R-Regulation beteiligt sind. Jedoch deutet die unterschiedliche Hochregulation des B₁R im Infarkt- und Nicht-Infarktareal, in allen Phasen der Gewebeheilung, auf eine Rolle bei der Wundheilung und dem ‚Remodeling‘ nach dem Myokardinfarkt hin. In den stark geschädigten Arealen könnte er eine größere Rolle bei der strukturellen Homöostase spielen. Auch die Inflammation scheint einen Einfluss auf die starke Hochregulation des B₁R zu haben. Zusammengefasst deutet alles auf eine wichtige Funktion des B₁R und des Kallikrein-Kinin-Systems bei den komplexen Prozessen des Remodelings nach der Gewebeschädigung.

5.3.3.2. Expression des B₂-Rezeptors beim Myokardinfarkt

Der B₂R ist unter physiologischen Bedingungen in vielen Organen nachzuweisen und vermittelt die meisten der bekannten Wirkungen der Kinine. In Zellkulturen ist der B₂R durch eine rasche Desensibilisierung, eine Affinitätsreduktion, eine schnelle Dissoziation des Liganden und durch Sequestration des Rezeptors charakterisiert (Pradde *et al.*, 1995; Pizard *et al.*, 1998).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der B₂R auch unter basalen Bedingungen im rechten und linken Ventrikel des Herzens exprimiert wurde. Zu jedem

untersuchten Zeitpunkt der Scheinoperation konnten sowohl die mRNA (Abb. 4.45, 4.46, 4.52 und 4.77) und das Protein (Abb. 4.38, 4.41, 4.48) des B₂R nachgewiesen werden. Die Daten korrelieren hier auf mRNA- und Proteinebene. Schon 6 Stunden nach Myokardinfarkt war die B₂R-mRNA im linken Ventrikel hochreguliert (Abb. 4.77), die Proteinexpression jedoch noch nicht signifikant (Abb. 4.38). Aber 6 Tagen nach Myokardinfarkt konnte demonstriert werden, dass sowohl die mRNA (Abb. 4.54) als auch das Protein (Abb. 4.41) im linken Ventrikel signifikant hochreguliert waren. Auch 3 Wochen nach Myokardinfarkt verblieb die mRNA und im linken (Abb. 4.45, 4.46) und rechten Ventrikel (Abb. 4.52) noch immer hoch reguliert, die Proteinexpression (Abb. 4.48) dagegen nicht mehr signifikant. In den Infarktgebieten der linken Ventrikel zeigte sich 3 Wochen nach Induktion eines Myokardinfarktes eine stärkere mRNA- (Abb. 4.46) und Protein-Expression (Abb. 4.48) des B₂R als in den Nicht-Infarktgebieten.

Es ist nur wenig über die Hochregulation des B₂R nach Induktion des Myokardinfarktes bekannt und seine Rolle dabei ist weitgehend unklar. Die mRNA- und Protein-Expression des B₂R nach Myokardinfarkt dieser Arbeit sind übereinstimmend mit den Daten unserer Arbeitsgruppe und wurden bisher nur von dieser untersucht (Tschöpe *et al.*, 1999c, 2000a, 2000b, 2000c). Sie zeigte eine Hochregulation der B₂R-mRNA im rechten und linken Ventrikel, sowie im Septum nach Induktion des Myokardinfarktes. Ebenfalls wurde mit einem spezifischen Western-Blot gezeigt, dass 24 Stunden und 6 Tage nach Myokardinfarkt das Protein des B₂R hochreguliert ist (Tschöpe *et al.*, 1999 & 2000b).

Passend zur Hochregulation des B₂R nach Myokardinfarkt, zeigte die Behandlung mit einem B₂R-Antagonisten eine Verschlechterung des post-ischämischen linksventrikulären ‚Remodelings‘ (Hu *et al.*, 1998), was die Wichtigkeit des B₂R nach dem Myokardinfarkt zeigt. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Yang *et al.* (2001). Sie zeigten, dass das kardiale ‚Remodeling‘ bei B₂R-defizienten Mäusen, die mit ACE-Inhibitor behandelt wurden, nach dem Myokardinfarkt reduziert ist (Yang *et al.*, 2001). Den Einfluß des B₂R beim ‚Remodeling‘ bestärken auch die Untersuchungen von Ito *et al.* (2003). Hier erhöhte die Gabe eines B₂R-Antagonisten im Vergleich zu den unbehandelten Speague-Dawley-Ratten die Infarktgröße (Ito *et al.*, 2003). Somit könnte die Hochregulation des B₂R in der frühen exsudativen Phase (6 Stunden) nach dem Myokardinfarkt die Kinin-abhängige Vasodilatation und vaskuläre Hyperpermeabilität verstärken, die wichtig für die Initiation der nachfolgenden Reparaturphase ist. Die inflammatorische Phase (24 Stunden bis 6 Tage nach Myokardinfarkt) ist gekennzeichnet durch die Abwanderung der Makrophagen und die Formation der Fibroblasten und Myofibroblasten. Da diese Zellarten den B₂R exprimieren (Nolly *et al.*, 1994), könnten diese auch die Expression von Zytokinen fördern (Tiffany *et al.*, 1989; Pan *et al.*, 1996). Die Hochregulation des B₂R war auch in dieser Arbeit durch eine Hochregulation von IL1 β begleitet (5.3.3.6.). Weiterhin könnte die Induktion zusätzlicher Zytokine die pro-inflammatorische Wirkung des BK ausweiten und zur Inflammation und Wundheilung beitragen. Fibroblasten/Myofibroblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Synthetisierung von Komponenten der extrazellulären Matrix, speziell in der inflammatorischen und fibrinogenen Phase der Gewebeheilung (6

Tage bis 3 Wochen nach Myokardinfarkt). Das BK gilt als Gegenregulator des Fibroblasten/ Myofibroblasten-induzierten Wachstums (Sun *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1995). Mit Hilfe von ACE-Inhibitoren und B₂R-Antagonisten wurden in verschiedenen Studien die antiproliferativen Effekte von BK demonstriert (Martorana *et al.*, 1990; McDonald *et al.*, 1990; Stauss *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1999). Daher könnte der Anstieg der B₂R-Expression 6 Tage und 3 Wochen nach Myokardinfarkt eine Rolle des BK bei der Synthese der extrazellulären Matrix während der Gewebereparatur andeuten. Die zu verschiedenen Zeitpunkten der Gewebeheilung hochregulierten mRNA- und Proteinlevel des B₂R deuten auf eine Beteiligung dieser Achse an diesen Prozessen.

Tschöpe *et al.* (2000a, b) konnten im rechten Ventrikel und im Septum nach dem Myokardinfarkt eine Expression des B₂R feststellen (Tschöpe *et al.*, 2000a, b). Der rechte Ventrikel und das Septum zählen zu den Teilen des Herzens, die nicht vom Infarkt betroffen sind. Auch die Teile des Herzens, die nicht vom Infarkt betroffen sind, durchlaufen nach der Induktion des Myokardinfarktes ein ‚Remodeling‘. Dies kann durch die Behandlung mit dem B₂R-Antagonisten Icatibant verschlechtert werden, was darauf hindeutet, dass Kinine ebenfalls das ‚Remodeling‘ in den nicht infarzierten Herzarealen über den B₂R kontrollieren (Sun *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1998). Die mRNA- und Protein-Hochregulation des B₂R im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels und im rechten Ventrikel, die in dieser Arbeit detektiert wurde, passt in dieses Bild. Allerdings könnte dies auch durch andere Mechanismen, als direkte inflammatorische Prozesse, wie im linken Ventrikel, hervorgerufen werden. Die etwas stärkere Hochregulation des B₂R in den Infarktgebieten der linken Ventrikel deutet darauf, dass der B₂R sowohl im Infarkt- und Nicht-Infarktgebiet beim ‚remodeling‘ eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu scheint der B₁R mehr am ‚remodeling‘ der infarzierten Areale beteiligt zu sein, da sein Anstieg im Infarktareal deutlich höher war als im Nicht-Infarktgebiet.

Ein Einfluss des B₂R auf die Regulation des Kollagenhaushaltes wurde durch *in vitro*-Versuche offenbart. Es wurde gezeigt, dass BK, Prostazyklin und NO das myokardiale Fibroblastenwachstum und die Kollagensynthese reduzieren und den Kollagenabbau aktivieren können (Wollert *et al.*, 1995). Weiterhin zeigten *ex vivo*-Versuche einen Einfluss auf die Angiogenese. Miura *et al.* (2003) demonstrierten, dass der B₂R den ‚Kinase insert domain-containing-rezeptor/fetal liver kinase-1‘-Rezeptor (KDR/flk-1), einer der drei Rezeptoren für den ‚Vascular endothelial growth‘-Faktor, stimuliert (Miura *et al.*, 2003). Dabei kommt es zur Freisetzung von eNOS und anschließend von NO. NO ist bekannt dafür eine wichtige Rolle bei der Angiogenese zu spielen (Murohara *et al.*, 1998) und bei der Myozytenhypertrophie (Ishigai *et al.*, 1997).

Im Einklang mit den vorliegenden Daten ist auch, dass seit den 70iger Jahren die Aktivierung des KKS beim Myokardinfarkt bekannt ist. Dabei kommt es zum Anstieg des Plasma-BK und des Kininogens (Kimura *et al.*, 1973; Hashimoto *et al.*, 1978). Hashimoto *et al.* (1978) fanden eine positive Korrelation zwischen der ansteigenden BK-Konzentration im Plasma und der Mortalität bei Patienten einen Tag nach Myokardinfarkt (Hashimoto *et al.*, 1978). Da in den 70iger Jahren das BK noch nicht

direkt im Serum nachweisbar war, erfolgte dies mit einem relativ unspezifischen Bioassay. Das zu untersuchende Serum wurde mit Darm inkubiert und die Stärke der Darmkontraktion verschiedenen BK-Konzentrationen zugeordnet. Neuere Nachweismethoden bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass der BK-Anstieg auf die Aktivierung des KKS zurückzuführen ist. (Baumgarten *et al.*, 1993; Lamontagne *et al.*, 1995; Koch *et al.*, 2003). Koch *et al.* (2003) zeigten, dass in der ‚working-heart‘-Anlage bei isolierten perfundierten Rattenherzen nach einer globalen Ischämie die BK-Konzentration im Koronarsinus anstieg. Diese BK-Konzentration war vom Nettoeffekt der Kinin-bildenden und Kinin-abbauenden Enzyme abhängig (Koch *et al.*, 2003). Dies erklärt auch die kardioprotektive Wirkung von ACE-Inhibitoren, die neben der ACE-Inhibition auch einen geringeren BK-Abbau bewirken. Diese Ergebnisse verstärken die allgemein gültige Meinung, dass die Effekte des KKS unter basalen Bedingungen hauptsächlich über den B₂R vermittelt werden. Beispielsweise wurde die B₂R-vermittelte endothelabhängige Gefäßdilatation in der Arbeit von Groves *et al.* (1995) gezeigt. Hier reduzierte die intrakoronare Applikation des B₂R-Antagonisten Hoe140 die epikardiale Gefäßlumenfläche, erhöhte den koronaren Gefäßwiderstand, was mit der Abnahme des Blutflusses korrelierte (Groves *et al.*, 1995). Dass dies auch für den systemischen Blutdruck eine Rolle spielt, konnten Emanuelli *et al.* (1999) dokumentieren. Sie demonstrierten, dass B₂R-defiziente Mäuse einen höheren Blutdruck aufwiesen als der entsprechende Kontrollstamm. Gleichzeitig zeigten die B₂R-defizienten Mäuse, abhängig vom Alter, eine dilatative Kardiomyopathie (Emanuelli *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnten Milian *et al.* (2001) keinen Einfluss des B₂R auf den Blutdruck der B₂R-defizienten Mäuse feststellen (Maestri *et al.*, 2003).

Zusammengenommen wird der B₂R schon unter basalen Bedingungen exprimiert und vermittelt die hauptsächlichsten Effekte des KKS. Schon früh nach dem Myokardinfarkt wird er hochreguliert. Er scheint an der Initiation der Gewebereparatur beteiligt zu sein und könnte die Expression von Zytokinen fördern, die für die Inflammation und Gewebereparatur wichtig sind. In der späten Phase des ‚Remodelings‘ scheint er an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt zu sein und dabei einen Einfluß auf den Kollagenhaushalt und die Angiogenese zu haben. Damit scheint der B₂R beim kardialen ‚Remodeling‘ eine wichtige Rolle zu spielen.

Die hier vorliegenden Daten zeigen die wichtige Funktion des KKS und der BKR bei den komplexen Prozessen des Remodelings nach der Gewebeschädigung hin. An diesen Prozessen könnten Zytokine beteiligt sein, was durch die parallele Hochregulation von IL1 β bekräftigt wird. Die Unterscheidung des Regulationsprofils der Kininrezeptor-Subtypen, deutet auf einen dualen Aktivierungsweg des KKS bei den komplexen Prozessen des Remodelings nach der Gewebeschädigung.

5.3.3.3. Der Einfluß des AT₁-Rezeptors auf die Bradykinin-Rezeptoren beim Myokardinfarkt

Eine Zunahme des Kallikreins, Kininogens und Kinins zeigt, dass das kardiale KKS unter ischämischen Bedingungen aktiviert wird (Tschöpe *et al.*, 2000a). Im Gegensatz zum B₂R, ist der B₁R unter basalen Bedingungen nur sehr schwer mit sehr sensitiven Methoden detektierbar (Faussner *et al.*, 1999; Marceau *et al.*, 1999). Nach Induktion eines Myokardinfarkts werden beide rasch hochreguliert (Tschöpe *et al.*, 2000a, b, c). Neben dem RAS könnten auch andere humorale Faktoren, einschließlich Zytokine und mechanischer Stress in diese Aktivierung verwickelt sein (McLean *et al.*, 2000; Kintsurashvili *et al.*, 2001).

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die mRNA des B₁R (Abb. 4.53, 4.58, 4.59) und B₂R (Abb. 4.54, 4.60, 4.61) zu allen untersuchten Zeitpunkten durch die Gabe des ACE-Inhibitors Quinapril bzw. durch die Gabe des AT₁R-Antagonisten Irbesartan sowohl im Infarkt- als auch im Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels erhöht wurde. Die Gabe des AT₁R-Antagonisten bewirkte eine stärkere Erhöhung des B₁R als die Gabe des ACE-Inhibitors. Auch die Zellkulturversuche mit Kardiomyozyten zeigten eine erhöhte B₁R- und B₂R-mRNA-Expression bei Exposition mit ANG II und Irbesartan im Vergleich zur Exposition nur mit ANG II (Abb. 4.102, 4.103). Dies konnte auch auf der Proteinebene für den B₁R (Abb. 4.55, 4.62, 4.63) und den B₂R (Abb. 4.56, 4.64, 4.65) bestätigt werden. Bei den TGR α MHCAT1-Ratten war die Expression des B₁R (Abb. 4.82, 4.84), 6 Tage und 3 Wochen nach Myokardinfarkt, geringer im Vergleich zu den transgenen scheinoperierten Ratten. Im Gegensatz dazu wurde der B₂R (Abb. 4.81, 4.85) höher exprimiert. Die humane AT₁R-mRNA-Expression zeigte eine schnelle Abnahme. Sie war 6 Tage nach Myokardinfarkt noch nachweisbar (Abb. 4.83), aber nach drei Wochen (Abb. 4.88) schon unter der Nachweisgrenze. Die Ratten-AT₁R-mRNA-Expression (Abb. 4.83, 4.88) war bei den transgenen infarzierten Tieren nach dem Myokardinfarkt höher als beim infarzierten Wildtyp. Die nicht infarzierten Tiere zeigten keinen Unterschied in der Ratten-AT₁R-mRNA-Expression. Die Gabe von Irbesartan beeinflusst die ACE-Expression nicht, während die Gabe von Quinapril erwartungsgemäß die ACE-Expression auf Basalniveau verringerte (Abb. 4.68 – 4.71). Die Expression von Kollagen I im Infarktgebiet des linken Ventrikels wurde durch die Gabe des AT₁R-Antagonisten verringert (Abb. 4.65). Im Nicht-Infarktgebiet (Abb. 4.66) zeigte sich kein Unterschied zu den infarzierten Herzen. Die Gabe des ACE-Inhibitors hatte keinen Einfluss auf die Kollagen I-Expression (Abb. 4.65, 4.66). Die mRNA-Expression von IL1 β , war bei Gabe von Quinapril nach dem Myokardinfarkt verringert, aber durch Irbesartan-Gabe nicht beeinflusst (Abb. 4.57). Die transgenen Tiere zeigen weder basal noch nach Induktion des Myokardinfarkt eine veränderte IL1 β -mRNA-Expression im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abb. 4.82, 4.87). Die AT₁R-defizienten Mäuse offenbarten keine Expression des B₁R (Abb. 4.91). Durch die Induktion des Myokardinfarktes verschlechterte sich die kardiale Funktion bei den wildtypischen und bei den transgenen Ratten, es gab keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und den AT₁-transgenen Tieren. Allerdings wiesen die transgenen Ratten einen höheren Herzindex auf als der Wildtyp, der durch die Induktion des Myokardinfarkt noch stärkerer stieg als beim Wildtyp (Tab. 4.13, 4.14). Die Gabe des ACE-Inhibitors bzw. des

AT₁R-Antagonisten verbesserte bei den wildtypischen Tieren die linksventrikuläre Funktion, die von Irbesartan auch den Herzindex (Tab. 4.11, 4.12).

Die Daten deuten auf eine Interaktion des KKS mit dem AT₁R, bei welcher der B₁R zu den kardioprotektiven Effekten von AT₁R-Inhibitoren beim Myokardinfarkt beiträgt. Da diese Daten bei 3 Monate alten Ratten erhoben wurden, deutet die nicht signifikante Zunahme der B₁R-mRNA bei den 6 Wochen alten infarzierten Wildtyptieren auf eine Altersabhängigkeit der B₁R-Stimulierung unter ischämischen Bedingungen. Die AT₁-transgenen Ratten und deren Kontrollen mussten so früh untersucht werden, da die transgene Expression nach 2 Monaten rasch abnimmt (Hoffmann *et al.*, 2001). Der Nachweis der humanen AT₁R-mRNA-Expression dieser Arbeit bestätigte die rasche Abnahme.

Zu den schon zuvor beschriebenen, komplexen Interaktionen zwischen dem RAS und dem KKS (Tschöpe *et al.*, 2002) zählen die Degradierung der Kinine durch ACE (Lamontagne *et al.*, 1995; Gainer *et al.*, 1998), die Kinin-ähnlichen Wirkungen der Angiotensinderivate ANG(1-7) und ANG(1-9) (Feireira *et al.*, 2001) und das Pro-Renin wahrscheinlich durch KLK aktiviert wird (Kim *et al.*, 1991). An den AT₂R-abhängigen Effekten könnte eine autokrine Kaskade, einschließlich BK, NO, Prostaglandin und cGMP beteiligt sein, was in Studien mit AT₁R-Antagonisten und AT₂R-transgenen Mäusen angedeutet wurde (Gohlke *et al.*, 1998). Walther *et al.* beschrieben einen AT₁R-kontrollierten Mechanismus der Kininbildung, der einen neutralen Endopeptidase-abhängigen Stoffwechselweg einschließt (Walther *et al.*, 2002). Ferner werden die protektiven Effekte der ACE-Inhibitoren, zumindestens teilweise, über eine direkte Potenzierung der B₂R- (Erdös & Marcic, 2001) und B₁R- (Ignjatovic *et al.*, 2002) Effekte nach der Kininstimulierung vermittelt. Dies spiegelt sich auch in den Daten der ACE-Inhibitorbehandlung dieser Arbeit wieder. Auch die ACE-Expression der infarzierten Tiere passt in dieses Bild. Die Gabe von Irbesartan beeinflusst die ACE-Expression nicht. Trotzdem experimentelle und klinische Studien der letzten Jahre gezeigt haben, dass die kardioprotektiven Effekte der ACE-Inhibition über das KKS durch den B₂R vermittelt werden (Hornig *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 1997; Silvestre *et al.*, 2001), deuten jedoch neue Daten dabei auch auf eine wichtige Rolle des B₁R (Witherow *et al.*, 2001; Ignjatovic *et al.*, 2002; Marin-Castano *et al.*, 2002). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Gabe von Irbesartan in Kombination mit dem B₁R-Antagonisten B9958 die nützlichen Effekte der AT₁R-Blockade abschwächte (Tschöpe *et al.*, 2004). Dies deutet ebenfalls darauf, dass der B₁R zu den kardioprotektiven Effekten beitragen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen direkten nützlichen Effekt des B₁R, obwohl schon abträgliche Effekte des B₁R bei einem *ex vivo*-Modell mit B₁R-defizienten Mäusen beobachtet wurden (Lagneux *et al.*, 2002). Die Gabe des ACE-Inhibitors bzw. des AT₁R-Antagonisten verbesserte die linksventrikuläre Funktion, die von Irbesartan auch den Herzindex. Dieses passt auch zur Expression von Kollagen I im Infarktgebiet des linken Ventrikels, die durch die Gabe des AT₁R-Antagonisten verringert wurde. Im Nicht-Infarktgebiet zeigte sich kein Unterschied zu den infarzierten Herzen. Die Gabe des ACE-Inhibitors hatte keinen Einfluss auf die Kollagen I-Expression. Da unsere Arbeitsgruppe eine Beeinträchtigung der kardialen Funktion durch die Behandlung mit dem B₁R-Antagonist B9958 nicht nachgewiesen konnte (Tschöpe *et al.*, 2004), scheint

die B₁R-Achse des KKS die linksventrikuläre Funktion unter ischämischen Bedingungen ohne einen AT₁R-Antagonisten nur geringfügig zu beeinflussen. Dies deutet darauf, dass die Blockade des AT₁R notwendig ist, um die kardioprotektiven Effekte des B₁R hervorzurufen. Die Inhibition des B₂R im ischämischen Herzen bei ACE-Inhibition führte zu ähnlichen Befunden (Silvestre *et al.*, 2001). Eine dramatische Hochregulation beider Angiotensin-Rezeptorunterarten nach dem Myokardinfarkt wurde nicht durch die Ko-Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Losartan beeinflusst. Somit scheinen die kardioprotektiven Effekte der Interaktion von AT₁R und B₁R bei der Behandlung mit AT₁R-Antagonisten, nicht über eine Änderung der AT₁R-Expression vermittelt zu werden. (Ni *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2002).

Die immunohistochemische Analyse dieser Arbeit zeigt, dass die Zunahme der B₁R-mRNA im gesamten linken Ventrikel der infarzierten, Irbesartan-behandelten Tiere, durch eine weitere Hochregulation des B₁R im nicht-infarzierten Bereich, besonders im vaskulären Gewebe, verursacht wurde. Der B₁R-Spiegel im Infarktbereich änderte sich nicht. Damit zeigt sich das kardioprotektive Potential der B₁R, was auch mit anderen Untersuchungen zur Ischämie-induzierten kardialen B₁R-Expression übereinstimmt. Beispielsweise konnten B₁R-Agonisten die Noradrenalin-Ausschüttung modulieren (Foucart *et al.*, 1997), Reperfusionarrhythmien reduzieren (Chahine *et al.*, 1993) und die endothelium-abhängige Vasodilatation unter ischämischen Bedingungen aufrechterhalten (Bouchard *et al.*, 1998)). Die Aktivierung der B₁R-Achse könnte auch zu den bekannten Kinin-abhängigen kardioprotektiven Effekten zählen, die über eine Zunahme von Prostaglandin und NO vermittelt werden. Dies führt zu Vasodilatation (Su *et al.*, 2000) und antiproliferativen Effekten, die durch Unterdrückung des Fibroblastenwachstums und der Kollagensynthese hervorgerufen werden (Kim *et al.*, 1999). Damit wird die Existenz einer Interaktion zwischen dem AT₁R und dem B₁R bekräftigt. Dies wird auch durch eine weitere Hochregulation der B₁R-mRNA bei Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten, am Ende der inflammatorischen und in der späten fibrinogenen Phase der kardialen Wundheilung nach Induktion des Myokardinfarktes, bestätigt. Die Runterregulation der B₁R-mRNA-Expression bei den TGR- α MHCAT1-Ratten zeigt die hemmende Wirkung der AT₁R-Stimulierung auf die B₁R-Expression im ischämischen Herzen. Dazu passt auch die mRNA-Expression von IL1 β , der ein Einfluß auf B₁R-mRNA-Expression nachgesagt wird (siehe 5.3.3.5.). Nach dem Myokardinfarkt verringerte die Gabe von Quinapril die Expression, die von Irbesartan nicht. Die AT₁R-Stimulierung beeinflusste weder basal noch nach Induktion des Myokardinfarktes die IL1 β -mRNA-Expression.

Unter basalen Bedingungen konnte die hemmende Wirkung der AT₁R-Stimulierung auf die B₁R-Expression nicht demonstriert werden. Ebenso war die Expression des B₁R unter physiologischen Bedingungen bei AT₁R-defizienten Mäuse nicht beeinflusst. Dies steht im Einklang mit vorherigen Studien, bei denen der B₁R im gesunden Gewebe nur schwach exprimiert wird (Marceau *et al.*, 1999). So scheinen die ischämischen oder inflammatorischen Stimuli, im hier verwendeten Modell, zur AT₁R-kontrollierten B₁R-Hochregulation zu führen. Bedeutsam ist, dass sich die hämodynamischen Parameter der infarzierten TGR α MHCAT1-Ratten und ihrer Kontrollen nicht unterschieden. Somit wird die AT₁R-Kontrolle anscheinend nicht durch Veränderungen der linksventrikulären

Funktion beeinflusst. Damit offenbart sich eine zusätzliche direkte Interaktion zwischen dem RAS und dem KKS, neben der indirekten Interaktion bei AT₁R-Antagonistengabe, über die AT₂R-abhängige Zunahme der BK-Level (Tsutsumi *et al.*, 1999). Bei dieser ist die Regulation des B₁R nach Einleitung des Myokardinfarktes AT₁R-abhängig. So stimuliert eine AT₁R-Blockade das KKS auf den Ligand- und Rezeptor-Leveln. BK und desArg⁹-BK tragen bei der Abwesenheit von AT₁R-Antagonisten geringfügig zur Erhaltung der basalen linksventrikulären Funktion im gesunden und ischämischen Herzen bei. Sie tragen aber zu den kardioprotektiven Effekten einer chronischen AT₁R-Blockade beim experimentellen Myokardinfarkt sowohl über den B₂R (Yang *et al.*, 2001) als auch über den B₁R bei.

Obwohl das Modell des Myokardinfarktes ein bewährtes Tiermodell ist, muss beachtet werden, dass kein Tiermodell die komplexe klinische Situation des Hersversagens vollständig darstellt. Die AT₁R-transgenen Ratten, die wegen der schnell abnehmenden transgene Expression nach 2 Monaten, so früh untersucht werden mussten, limitieren den Vergleich mit älteren unbehandelten und behandelten infarzierten SD Ratten. Dies zeigt die geringfügige Zunahme der B₁R-mRNA bei den 6 Wochen alten Kontrollen. So könnte die unbeeinträchtigte linksventrikuläre Funktion der AT₁R-transgenen Ratten auch mit der verringerten B₁R-Expression erklärt werden. Ebenso kann nicht automatisch aus der beeinträchtigten kardialen Funktion nach Reduktion der B₁R-Level bei AT₁R-überexprimierenden Herzen auf die kardioprotektive Erhöhung der B₁R-Konzentration bei der AT₁R-Blockade geschlossen werden. Dies zeigen die unveränderten kardiologischen Parameter bei den mit einem B₁R-Antagonist behandelten Ratten (Tschöpe *et al.*, 2004).

Somit trägt der B₁R zu den kardioprotektiven Effekten eines AT₁R-Blockers im Rattenmodell des Myokardinfarktes bei. Obwohl im Gegensatz zum ACE-Inhibitor, die AT₁R-Antagonisten nicht direkt die Kinindegradierung beeinflussen, zeigt sich unter diesen Bedingungen ein molekularer Stoffwechselweg mit einer AT₁R-KKS-Interaktion. Um den intrazellulären Stoffwechselweg zu identifizieren, der zur Hochregulation des B₁R nach der AT₁R-Blockade führt, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Ebenso um die klinische Bedeutung dieses ‚cross-talk‘ zu zeigen.

5.3.3.4. Der Einfluß des AT₂-Rezeptor auf die Bradykinin-Rezeptoren beim Myokardinfarkt

Das RAS und das KKS sind vielschichtig miteinander verbunden. Zu den Verbindungen zählen, dass ACE Kinine katabolisiert (Lamontagne *et al.*, 1995; Gainer *et al.*, 1998), ANG(1-7) mit Kininen interagiert (Feireira *et al.*, 2001) und das KLK wahrscheinlich als Pro-Renin-aktivierendes Enzym dient (Kim *et al.*, 1991). Viele klinische und experimentelle Studien zeigten, dass die Potenzierung der Kinine und die Reduktion von ANG II durch ACE-Inhibitoren eine wichtige Rolle spielen (Dankwardt *et al.*, 1990; Bao *et al.*, 1992; Gohlke 1994). Kürzlich deuteten einige Studien auf eine weitere Verbindung zwischen den beiden Systemen. Dabei scheint eine autokrine Kaskade, einschließlich Kinine, NO, Prostaglandine und zyklisches

GMP, in einige Effekte des AT₂R verwickelt zu sein (Siragy & Carey, 1996, 1997; Siragy *et al.*, 1999a, 1999b, 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die durch Untersuchungen von Sprague-Dawley-Ratten erhalten wurden, zeigten, dass die B₁R-mRNA-Expression zwar durch die Gabe des AT₂R-Antagonisten PD123319 ansteigt, jedoch tendenziell weniger als durch die AT₁R-Antagonistengabe (Irbesartan) (Abb. 4.72). Die Expression des B₂R ist sowohl 6 Tage (Abb. 4.73) als auch 3 Wochen nach Myokardinfarkt (Abb. 4.75) bei Behandlung mit einem AT₂R-Antagonisten deutlich höher, als bei Behandlung mit einem AT₁R-Antagonisten. Die Verbesserung der linksventrikulären Funktion und des Herzindex bei der Verabreichung von Irbesartan bzw. PD123319 war gleichwertig (Tab. 4.11, 4.12). Die Kollagen I-mRNA-Expression erhöhte sich nur durch die Gabe des AT₂R-Antagonisten (Abb. 4.74). Die Expression der B₁R-mRNA war 6 Tage nach Myokardinfarkt im linken Ventrikel mit Behandlung des AT₂R-Antagonisten signifikant höher wie die ohne Behandlung. Bei der Behandlung mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan war diese tendenziell, aber nicht signifikant geringer als bei der Behandlung mit PD123319 (Abb. 4.72). Die Expression der B₂R-mRNA ist sowohl 6 Tage als auch 3 Wochen nach Myokardinfarkt im linken Ventrikel durch die Behandlung mit dem AT₂R-Antagonisten PD123319 signifikant höher als ohne diese Behandlung. Des Weiteren ist diese signifikant höher als bei Gabe eines AT₁R-Antagonisten (Abb. 4.73, 4.75). Dies konnte ebenfalls bei den Experimenten mit Kardiomyozyten bestätigt werden. Diese wurden 3 Stunden mit ANG II bzw. in Kombination mit dem AT₁R-Antagonisten Irbesartan oder dem AT₂R-Antagonisten PD123319 inkubiert. Die durch ANG II und Irbesartan- bzw. PD123319-stimulierte B₂R-mRNA-Expression war signifikant höher, als die nur durch ANG II-induzierte. Die Kombination von ANG II mit PD123319 bewirkte eine B₂R-mRNA-Expression, die signifikant höher war als die durch ANG II mit Irbesartan (Abb. 4.103).

Die Ergebnisse der *in-* und *ex vivo*-Versuchen stimmen somit überein und deuten zunächst einmal auf eine Verbindung des B₂R mit dem AT₂R. Die verbesserten hämodynamischen Parameter durch die Gabe eines AT₂R-Antagonisten in dieser Arbeit, stehen auch im Einklang mit den molekularbiologischen Ergebnissen, die sowohl eine starke Hochregulation des B₂R und eine geringere Hochregulation des B₁R durch die Behandlung mit dem AT₂R-Antagonisten zeigen. Den Einfluß des B₂R auf die kardialen Parameter demonstrierten Cheng *et al.* (1998). Sie zeigten, dass die Behandlung mit dem B₂R-Antagonisten HOE140 eine Verschlechterung der dP/dt_{min} bei Hunden bewirkte (Cheng *et al.*, 1998). Bei B₂R-defizienten Mäusen zeigte sich eine Verschlechterung der kardialen Parameter, bei Behandlung mit einem ACE-Inhibitor nach der Induktion eines Myokardinfarktes (Yang *et al.*, 2001). Somit scheinen außer der B₂R-Expression auch noch andere ACE-abhängige Mediatoren mit der Verbesserung der kardialen Parameter in Verbindung zu stehen. Neue Ergebnisse deuten auch auf eine Beteiligung des AT₂R an der basalen Blutdruckerhaltung (Barber *et al.*, 1999; Israel *et al.*, 2000; Dimitropoulou *et al.*, 2001). Jedoch hatte die Behandlung mit dem AT₂R-Antagonisten PD123319 unter akuten Bedingungen keinen Einfluß auf den Blutdruck von WKY-Ratten (Pees *et al.*, 2003).

Bei infarzierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die kardioprotektiven Effekte der AT₁R-Antagonisten, mit denen einer ACE-Inhibitorbehandlung vergleichbar sind. Diese Effekte waren bei B₂R-defizienten Mäusen verringert (Yang *et al.*, 2001). Ebenso zeigte sich bei einer Blockierung des AT₁R, dass es über ANG II zu einer Stimulierung des AT₂R kommt. Dies führt zu einer intrazellulären Senkung des pH-Wertes, die wiederum zur erhöhten BK-Synthese und zur Stimulierung des B₂R führt. Dies konnte auch in dieser Arbeit, sowohl auf der mRNA- (siehe auch 5.3.3.3.; Abb. 4.70, 4.76, 4.77) als auch auf der Proteinebene (Abb. 4.72, 4.80, 4.81) gezeigt werden. Jedoch zeigte sich eine höhere B₂R-mRNA-Expression bei der Behandlung mit PD123319. In dieser Arbeit wird der B₂R unter Behandlung mit einem AT₂R-Antagonisten stärker stimuliert, als mit der AT₁R-Antagonistenbehandlung. Dies deutet darauf, dass der B₁R mehr über den AT₁R und der B₂R mehr über den AT₂R stimuliert wird und verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel der ANG II-Rezeptoren mit dem KKS und deutet weitere vielschichtige Verbindungen zwischen dem RAS und dem KKS.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, spekulierten Gohlke *et al.* (1998), dass ANG II über die Aktivierung des AT₂R einen stimulierenden Effekt auf den cGMP-Gehalt in Aorten von Schlaganfall-gefährdeten spontan hypertensiven Ratten (SHRSP) ausübte. Sie vermuteten einen B₂R und NO-abhängigen Mechanismus (Gohlke *et al.*, 1998). Dieselbe Gruppe fand später bei Wistar Kyoto-Ratten (WKY) jedoch keine Beweise für eine ANG II-induzierte Stimulierung der NO-Produktion, die einer Aktivierung des AT₂R folgt. Der Anstieg der ANG II-Plasmalevel beeinflusste auch den cGMP-Gehalt nicht (Pees *et al.*, 2003). Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten durch die unterschiedliche Expressionsmuster des AT₂R in verschiedenen Rattenstämmen erklärt werden, die zusätzlich noch zeitabhängig sind. Beispielsweise konnte bei spontan hypertensive (SHR) Ratten eine verbesserte Expression des AT₁R und AT₂R im Vergleich zu WKY-Ratten, in 20 Wochen alten Tieren, festgestellt werden (Otsuka *et al.*, 1998, Touyz *et al.*, 1999). Bei älteren Tieren wurde AT₂R nur noch schwach exprimiert (Touyz *et al.*, 1999). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Blockade des AT₂R die ANG II-induzierte Konstriktion bei WKY-Ratten verbesserte, jedoch nicht bei SHR-Ratten (Endo *et al.*, 1998). Bei vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC), die den AT₂R überexprimieren konnte gezeigt werden, dass die Exposition mit ANG II die cGMP-Spiegel erhöhte (Stoll *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998; Tsutsumi *et al.* 1999). Zu den widersprüchlichen Ergebnissen könnten auch die unterschiedlichen Auswirkungen des ANG II auf die vaskuläre NO-Produktion beitragen. Bei WKY-Ratten konnten sowohl unveränderte, gesteigerte oder gesenkte cGMP-Level demonstriert werden (Boulanger *et al.*, 1995; Guan *et al.*, 1996).

Zusammengenommen verdeutlichen diese Beispiele, dass die Expression des AT₂R im Wesentlichen von den experimentellen Bedingungen, dem Rattenstamm, dem Alter der Tiere und von den Zellkulturbedingungen abhängen kann. Die Daten dieser Arbeit weisen, unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen, auf eine Verbindung des AT₂R mit dem B₂R, da dieser bei Blockade des AT₂R stark hochreguliert wird. Dies scheint aber wesentlich komplexer zu sein als es die

vorliegenden Daten widerspiegeln. Wahrscheinlich sind daran auch noch andere Komponenten des RAS und KKS beteiligt. Somit bedarf es weiterer Untersuchungen um die komplexen Vorgänge genauer zu klären.

5.3.3.5. Der Einfluß von IL1 β auf die Expression des B₁-Rezeptors beim Myokardinfarkt

IL1 β wird zunächst in der Zelle als Vorstufe exprimiert und durch Proteasen, wie Kaspase 1, die auch als Interleukin 1-Converting-Enzym (ICE) bezeichnet wird, enzymatisch aktiviert. An den verschiedenen Prozessen der Wundheilung sind unter anderem auch Zytokine beteiligt. Diese wurden besonders in der inflammatorischen und pro-fibrinogenen Phase der Gewebeheilung nachgewiesen (Weber et al., 2000; Cleutjens et al., 2002; Topol et al., 2002). *In vivo*- und *in vitro*-Experimente demonstrierten, dass der B₁R durch Zytokine, wie IL1 β , TNF α und IL6, *de novo* exprimiert wird (Marceau et al., 1995).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 6 Stunden nach Myokardinfarkt die Expression von IL1 β im linken und rechten Ventrikel dramatisch hochreguliert wird. Auch noch 6 Tage und 3 Wochen nach der Einleitung des Myokardinfarktes ist dort die Expression der mRNA hochreguliert, jedoch wesentlich geringer (Abb. 4.39, 4.42, 4.49, 4.50). Im Infarktgebiet wurde eine höhere IL1 β -mRNA-Expression als im Nicht-Infarktgebiet detektiert. Auch im rechten Ventrikel war die Expression von IL1 β nicht so stark erhöht wie im linken Ventrikel (Abb. 4.41; 4.42). Parallele dazu war auch die B₁R-Expression erhöht (5.3.3.1.).

In Übereinstimmung mit vorherigen Arbeiten verursachte die Einleitung des Myokardinfarktes eine Hochregulation von IL1 β . Unsere Arbeitsgruppe detektierte schon zuvor im infarzierten Myokardium 6 Stunden nach der Induktion des Myokardinfarktes IL1 β . 24 Stunden nach der Induktion erreichte die Expression ihr Maximum und fiel nach 6 Tagen wieder auf ein niedrigeres Level. Auch andere klinische Studien zeigten, dass nach dem Myokardinfarkt die Expression von Zytokinen hochreguliert wird (Yue et al., 1998; Rehbock et al., 1999; Seta et al., 2000). Erhöhte Plasmalevel und lokale myokardiale Produktion von IL1 β und verschiedenen anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL6, IL8 und TNF α , konnten nach dem Myokardinfarkt im Serum von Patienten beobachtet werden (Blum et al., 1994; Guillen et al., 1995; Neumann et al., 1995; Tashiro et al., 1995). Zuerst wird IL1 β exprimiert, mit einer maximalen Expression 3 bis 4 Stunden nach Myokardinfarkt. Danach folgt die IL-6-Expression mit einem Maximum nach 5 bis 8 Stunden (Guillen et al., 1995). Die Ursachen für die erhöhte Zytokin-expression sind nicht sicher, könnten jedoch komplexe Effekte ausüben. Beweise deuten darauf, dass pro-inflammatorischen Zytokine dazu fähig sind, die Herzmuskelfunktion durch eine Vielzahl von Mechanismen zu modulieren. Hierzu zählen Förderung des links-ventrikulären ‚Remodelings‘, Induktion der kontraktile Funktionsstörung und Abkopplung der myokardialen β -adrenalinbedingten Rezeptoren (McCormick *et al.*, 1994).

Auch Ono *et al.* (1998) wiesen in ihren Studien eine erhöhte Ausschüttung von TNF α , IL1 β und IL6 in der infarzierten Region des Herzens nach. In der nicht-

infranzierten Region war die Ausschüttung von IL1 β am höchsten und blieb bis zu 20 Wochen nach Myokardinfarkt auf diesem Level. Sie vermuteten, dass die IL1 β -Hochregulation im nicht-infranzierten Bereich eine Beteiligung am ‚Remodeling‘ andeutet (Ono *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu zeigte sich in dieser Arbeit eher die Tendenz, dass die Expression von IL1 β mit der Entfernung vom Infarktgebiet sinkt. Weiterhin zeigten Untersuchungen, dass bei Kardiomyozyten die Inkubation mit IL1 β einen Anstieg der B₁R- und B₂R-mRNA verursachte (Tschöpe *et al.*, nicht veröffentlichte Daten). Auch konnte ein negativer Einfluß von ICE-Inhibitoren auf die B₁R- und B₂R-Expression in Kardiomyozyten festgestellt, die aus mit ICE-Inhibitor behandelten, infranzierten Rattenherzen kultiviert wurden (Tschöpe *et al.*, nicht veröffentlichte Daten). Ebenso zeigten anti-inflammatorische Substanzen diese inhibierende Wirkung auf die Expression des B₁R (Nie *et al.*, 1998b; Karin *et al.*, 2000). Dies deutet darauf, dass der B₁R nach Induktion des Myokardinfarktes durch IL1 β hochreguliert wird. Auch in dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der B₁R- und der IL1 β -Expression, gezeigt werden, da zu jedem untersuchten Zeitpunkt sowohl die Expression von IL1 β als auch die des B₁R erhöht war.

Ein weiterer Aspekt für den starken Anstieg des B₁R in der exsudativen und inflammatorischen Phase (6 Stunden nach Myokardinfarkt) ist die gegenseitige Beeinflussung der Zytokine. In humanen Lungenfibroblasten und in HUVEC (‚human umbilical vein endothelial cells‘) konnte die Synthese von IL6 durch IL1 β stimuliert werden, was auf die gegenseitige Stimulierung beider deutet (Guillén *et al.*, 1995). Die Aufrechterhaltung der Expression des B₁R in der pro-fibrinogenen und fibrinogenen Phase der Wundheilung (6 Tage und 3 Wochen nach Myokardinfarkt) kann auch in Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Zytokinexpression stehen. In diesen Phasen der Wundheilung wird auch TNF α exprimiert, was auch dafür bekannt ist die mRNA-Expression des B₁R hoch zu regulieren (Jacobs *et al.*, 1999). Gleichzeitig kommt es in diesen Phasen zu einer Abnahme von IL1 β und IL6 im Serum von Patienten nach dem Myokardinfarkt (Guillén *et al.*, 1995). Damit scheint die IL1 β -mRNA-Expression mit der B₁R-Expression verbunden zu sein.

Zusammengenommen sind Zytokine, wie IL1 β , post-Myokardinfarkt beteiligt. Die verstärkte Expression von IL1 β in den infranzierten Arealen, aber auch die Expression in den nicht vom Infarkt betroffenen Arealen, deutet auf seine wichtige Rolle beim kardialen ‚Remodeling‘ nach dem Myokardinfarkt. Es wird parallel zum B₁R hochreguliert und scheint seine Expression zu modulieren. Somit scheinen Zytokine, wie IL1 β , neben dem Auslösen einer Entzündungs- und Fibrosereaktion auch an der Regulation der Kininrezeptoren beteiligt zu sein, was auf ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Kininen und dem B₁R deutet.

5.3.3.6. Der Einfluß von IL1 β auf die Expression des B₂-Rezeptors beim Myokardinfarkt

In den letzten Jahren zeigte sich die zunehmende Bedeutung der Zytokine bei Herzkrankungen. An den verschiedenen Prozessen der Wundheilung, besonders in

der inflammatorischen und profibrinogenen Phase, sind unter anderem Zytokine beteiligt (Cleutjens *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2000; Topol *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit konnte zu den Untersuchungszeitpunkten sowohl eine erhöhte IL1 β -mRNA- (5.3.3.5.) als auch eine erhöhte B₂R-Expression (5.3.3.2.) im rechten und linken Ventrikel nachgewiesen werden.

Passend zu der Erhöhung der IL1 β -mRNA-Expression dieser Arbeit, konnte unsere Arbeitsgruppe schon zuvor, zu den Zeitpunkten der maximalen Expression der Zytokine auch eine maximale Expression des B₂R nach Induktion des Myokardinfarktes nachgewiesen (Tschöpe *et al.*, 2000b). Weiterhin demonstrierten Guillen *et al.* (1995) 3 bis 4 Stunden nach dem Myokardinfarkt im Plasma von Patienten eine maximale IL1 β -Expression. Dem IL1 β folgte dann IL6, mit maximaler Expression 5 bis 8 Stunden nach Myokardinfarkt (Guillen *et al.*, 1995). Auch die Hochregulation weiterer Zytokine, wie TNF α , konnte nach dem Myokardinfarkt festgestellt werden. Dies wurde erst 4 Tage nach Induktion des Myokardinfarktes, in der profibrinogenen Phase der Wundheilung, nachgewiesen (Maury & Teppo, 1989; Jacobs *et al.*, 1999). Jacobs *et al.* (1999) zeigten, dass TNF α die Proliferation von Fibroblasten im infarzierten Areal des linken Ventrikels stimuliert. Im scheinoperierten linken Ventrikel konnte dies nicht demonstriert werden (Jacobs *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu konnten in dieser Arbeit auch in den linken Ventrikeln der scheinoperierten Tiere die Expression von IL1 β gezeigt werden, was wahrscheinlich mit dem operativen Eingriff in Verbindung gebracht werden kann.

Weiterhin entdeckten Schmidlin *et al.* (1998), dass durch die Synthese von Prostaglandinen und der daraus folgenden intrazellulären cAMP-Erhöhung, IL1 β die Transkription des B₂R erhöhen kann (Schmidlin *et al.*, 1998). Da diese Ergebnisse je nach Zellart variieren, scheinen diese Effekte der Zytokine zelltypspezifisch zu sein. In humanen adulten Lungenfibroblasten, in denen beide BKR auch basal exprimiert werden (Webb *et al.*, 1994), konnten diese durch Zytokine, wie TNF α und IL1 β hochreguliert werden (Phagoo *et al.*, 2000). In humanen Deziduazellen wurde durch die Inkubation mit IL1 β eine deutliche Hochregulation des B₂R nachgewiesen. Der B₁R wurde dort nicht hochreguliert (Rehbock *et al.*, 1999). Auch wurde die mRNA-Expression der beiden BKR in Ratten-Kardiomyozyten durch IL1 β beeinflusst. In glatten Muskelzellen der Aorta konnte IL1 β die Expression der BKR nicht beeinflussen (Tschöpe *et al.*, 2003, unveröffentlichte Daten).

In der profibrinogenen Phase der Gewebereparatur sind die Fibroblasten und Myofibroblasten besonderer wichtig, da sie die Bestandteile der extrazellulären Matrix des Herzens synthetisieren. Sie sind in der Lage die BKR zu exprimieren (Blaukat *et al.*, 1996; Faussner *et al.*, 1999). Da TNF α in der profibrinogenen Phase der Gewebereparatur freigesetzt wird, könnte es für die beibehaltene Hochregulation des B₂R 6 Tage nach Myokardinfarkt verantwortlich sein (Jacobs *et al.*, 1999). Die Stimulation mit BK und die daraus folgende Aktivierung von NF κ B bewirkte in Lungenfibroblasten eine Hochregulation von IL1 β . Da dieser Effekt durch die Behandlung mit HOE140 inhibiert werden konnte, könnte die Hochregulation von IL1 β auch über den B₂R vermittelt sein (Pan *et al.*, 1996). Bei Ratten konnte auch noch bis zu 20 Wochen nach Myokardinfarkt ein erhöhter Zytokinspiegel

nachgewiesen werden, der jedoch im Verlauf der Zeit geringer wurde (Ono *et al.*, 1998). Auch hier konnte 3 Wochen nach Myokardinfarkt noch eine erhöhte Expression von IL1 β festgestellt werden und korrelierte mit der Expression des B₂R.

Zusammengefasst zeigt sich, dass Zytokine, wie IL1 β , post-Myokardinfarkt stark hochreguliert werden. Dies geht in der inflammatorischen Phase der Wundheilung, mit der Hochregulation des B₂R einher, was die wichtige Rolle von IL1 β beim kardialen ‚Remodeling‘ bekräftigt. Weiterhin ist IL1 β in der Lage die Regulation des B₂R zu beeinflussen. Ebenso könnte die Expression von Zytokinen auch durch Kinine über den Kininrezeptor vermittelt werden. Dies deutet auf eine Interaktion von IL1 β , weiteren Zytokinen und dem B₂R und zeigt das komplexe Zusammenspiel von Zytokinen, Kininen und den BKR.

5.3.3.7. Der Einfluss des ICE-Inhibitors auf die Expression der Bradykinin-Rezeptoren beim Myokardinfarkt

Zunächst wird IL1 β als ein zytosolischer inaktiver ‚Precursor‘ mit einem Molekulargewicht von 33 kD synthetisiert und erst durch enzymatische Spaltung die reife Form (17,5 kD) freigegeben. Die intrazelluläre Protease die aus dem ‚Precursor‘ das IL1 β spaltet ist die Kaspase-1, die auch als Interleukin-1-Converting-Enzym (ICE) bezeichnet wird. Das IL1 β wird hauptsächlich von aktivierten Myozyten freigesetzt. Während des Myokardinfarktes ist die Erzeugung und Ausschüttung von Zytokinen, wie IL1 β , stark erhöht.

In dieser Arbeit zeigte die hämodynamische Untersuchung 6 Stunden nach dem Myokardinfarkt eine signifikante Verschlechterung der Parameter LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min}, welche durch die Gabe des ICE-Inhibitors nicht beeinflusst wurden (Tab. 4.10). Die infarzierten Ratten wurden sofort für 6 Stunden bzw. 3 Wochen mit einem ICE-Inhibitor behandelt, um die Ausschüttung von IL1 β schon früh nach dem Myokardinfarkt zu unterdrücken. Die ICE-Inhibitorbehandlung zeigte zunächst keinen Einfluss auf die Expression des B₁R, da dieser 6 Stunden nach dem Myokardinfarkt noch nicht nachweisbar war (Abb. 4.76). Jedoch wurde die B₁R-Expression 3 Wochen nach Myokardinfarkt (fibrinogenen Phase) dadurch reduziert (Abb. 4.78). Auch die Expression des B₂R konnte durch die Gabe des ICE-Inhibitors im linken Ventrikel gesenkt werden, sowohl am Ende der exsudativen Phase (Abb. 4.77), wie auch in der fibrinogenen Phase (Abb. 4.79) nach dem Myokardinfarkt.

Vergleichbare Studien mit ICE-Inhibitoren wurden bisher nicht durchgeführt. Jedoch zeigten Untersuchungen mit Kardiomyozyten aus mit ICE-Inhibitor behandelten infarzierten Rattenherzen, dass diese weniger B₁R-mRNA exprimieren als die Kontroll-Kardiomyozyten (Tschöpe *et al.*, unveröffentlichte Daten). Ebenso inhibierte die Applikation einer anti-inflammatorischen Substanz (Dexamethasan) die Expression des B₁R, was den Einfluss der Inflammation verdeutlicht (Ni *et al.*, 1998). Dieser Mechanismus scheint über NF- κ B vermittelt zu werden. Dieser tritt in den Zellkern und aktiviert die Transkription des B₁R nach Bindung an den Promotor des Gens. NF- κ B ist unter basalen Bedingungen im Plasma lokalisiert. Er wird durch inhibitorische Proteine (I- κ B) reguliert, die eine Verbindung mit ihm eingehen und so

das nukleäre Lokalisationssignal blockieren. Dieses führt zur Inhibition der nukleären Aufnahme von NF- κ B (Karin *et al.*, 2000).

Das IL1 β scheint die Hochregulation des B₁R über transkriptionale und posttranskriptionale mRNA-Stabilisierung herbeizuführen, die des B₂R über einen prostanoiden cAMP-abhängigen Stoffwechselweg. So ist es möglich, dass durch die Inhibition der IL1 β -Produktion die Effekte auf die Bradykinin-Rezeptoren stark abgeschwächt sind. Die reduzierte Expression des B₁R und B₂R bei den ICE-behandelten infarzierten Ratten liefert einen weiteren starken Beweis, dass IL1 β ein wichtiger Mechanismus für die Hochregulation der beiden Bradykinin-Rezeptoren post-Myokardinfarkt ist.

5.3.3.8. Das kardiale ‚Remodeling‘ beim Myokardinfarkt

Im Laufe der Zeit kommt es nach dem Myokardinfarkt zur Stabilisierung des Herzens. Dazu wird das nicht-infarzierte Gewebe der Ventrikel umgestaltet, auch im infarzierten linken Ventrikel kommt es zum ‚Remodeling‘ mit Ausbildung und Stabilisierung der Infarkt Narbe (Cleutjens *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000). Letztendlich führt dies zur Hypertrophie des nicht vom Infarkt betroffenen Myokards. Ebenso bewirkt die Ausweitung der Infarktnekrose und die Dilatation der sich entwickelnden Infarkt Narbe eine Vergrößerung des Kammerdurchmessers (Pfeffer *et al.*, 1995). Nach dem initialen Wundheilungsprozess im Infarktgebiet nehmen die ‚Remodeling‘-Prozesse zu und führen zur Verschlechterung der kardialen Hämodynamik.

Die vorliegenden Daten zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Verschlechterung der kardiologischen Parameter LVP, dP/dt_{max} und dP/dt_{min} . Ebenso war der Herzindex ab dem Übergang der inflammatorischen zur fibrinogenen (6 Tage nach MI) bis hin in die fibrinogene Phase (3 Wochen nach MI) signifikant erhöht (Tab. 4.11 - 4.12). 6 Tage nach Myokardinfarkt war die Kollagen I-mRNA-Expression noch nicht erhöht (Abb. 4.74). Jedoch war sie nach 3 Wochen sowohl im Infarktgebiet (Abb. 4.67) als auch im Nicht-Infarktgebiet (Abb. 4.66) des linken Ventrikels und auch im gesamten linken Ventrikel (Abb. 4.89) erhöht. Im infarzierten Gebiet des linken Ventrikels war die Expression deutlich stärker. Parallele dazu waren mRNA- und Proteingehalt des B₂R im linken und rechten (5.3.3.2.) Ventrikel hochreguliert und ebenso die des B₁R (5.3.3.1.). Die Inhibition des ACE hatte keinen Einfluß auf die Kollagen I-mRNA-Expression nach Myokardinfarkt (Abb. 4.66, 4.67). Im Gegensatz dazu, führte die Gabe des AT₂R-Antagonisten PD 123319 zur Erhöhung der Kollagen I-mRNA-Expression (Abb. 4.74), trotz einer Verbesserung von Herzfunktion und Herzindex. Bei den TGR(hKLLK1)-Tieren, mit aktiviertem KKS, war nach dem Myokardinfarkt die Kollagen I-mRNA-Expression nicht beeinflusst (Abb. 4.89).

Insgesamt stehen diese Daten, als Maß für das ‚Remodeling‘, im Einklang mit den Vorgängen die nach dem Myokardinfarkt eingeleitet werden. Mit der Hilfe des Herzindexes kann eine Aussage über den Einfluß der BKR beim ‚Remodeling‘ gemacht werden. Dieser deutet auf eine kompensatorische Hypertrophie im nicht vom Infarkt betroffenen Teil des Herzens. Während des ‚Remodelings‘ kommt es im

infarzierten und nicht infarzierten Areal des Myokards zur vermehrten Synthese von Kollagen. Sowohl die Hypertrophie als auch die vermehrte Synthese von Kollagen führen zum Anstieg des Herzindex (Ju *et al.*, 1997; Nahrendorf *et al.*, 2002). Bei der Kollagensynthese machen Kollagen I und III den Hauptteil des kardialen Kollagens aus. Passend dazu war in dieser Arbeit war die Kollagen I-mRNA-Expression im Infarktgebiet und Nicht-Infarktgebiet des linken Ventrikels erhöht und im infarzierten Gebiet des linken Ventrikels wesentlich deutlicher.

Auch das KKS ist an den Umbauvorgängen im Myokard nach dem Infarkt beteiligt. Dazu zählen die Hypertrophie der nicht infarzierten Myozyten, die Dilatation und Ausdünnung der Ventrikelwand und die Bildung der Narbe zur Eingrenzung des Infarktareals (Cleutjens *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2000). Die Bildung der Narbe wird durch kardiale Fibroblasten erreicht, die das Kollagenetzwerk bilden. Das BK gilt als ein wichtiger Faktor bei der Regulation des Kollagenhaushaltes, da es bei Fibroblasten und Myofibroblasten das induzierte Wachstum im Herzen unterdrückt (Sun *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1997, Kim *et al.*, 1999). In dieses Bild passt auch, dass in dieser Arbeit die mRNA und der Proteingehalt des B₂R auch noch 3 Wochen nach Myokardinfarkt im linken und rechten Ventrikel hochreguliert war. Gleichzeitig waren die Kollagen I-mRNA und B₁R-Spiegel erhöht.

Andere Arbeitsgruppen zeigten unter basalen Bedingungen einen Einfluss des B₂R auf die Regulation des Kollagenhaushaltes. Die Blockierung des B₂R mit HOE 140 führte bei infarzierten Ratten zu einem höheren Kollagengehalt in den nicht vom Infarkt betroffenen Teilen des Herzens (Wollert *et al.*, 1997). Weiterhin führte die Stimulation des B₁R mit desArg¹⁰-KL in humanen embryonalen Lungenfibroblasten, Zeit- und Dosis-abhängig, zur Stabilisierung der ‚connective tissue growth factor (CTGF)-mRNA und stimulierte so die Kollagen I-Produktion. Bei B₂R-aktivierten Fibroblasten konnte dies nicht beobachtet werden (Ricupero *et al.*, 2000). Weitere *in vitro*-Befunde demonstrierten, dass BK, Prostazyklin und NO das myokardiale Fibroblastenwachstum und die Kollagensynthese reduzieren, sowie den Kollagenabbau aktivieren können (Zhou *et al.*, 1993; Weber 1994a; Weber 1994b; Weber *et al.*, 1995). An den Prozessen des ‚Remodeling‘ scheint das RAS stark beteiligt zu sein (Falkenhahn *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1997). Studien mit ACE-Inhibitoren und/oder B₂R-Antagonisten zeigten anti-proliferative Effekte des B₂R (Martorana *et al.*, 1990; McDonald *et al.*, 1990). Die Behandlung mit einem B₂R-Antagonisten bewirkte, ermittelt über den höheren Kollagengehalt, eine Verschlechterung des ‚Remodelings‘ im infarzierten Herzen (Hu *et al.*, 1998).

Des Weiteren durchlaufen die nicht vom Infarkt betroffenen Herzareale, wie das Nicht-Infarktgebiet und der rechte Ventrikel, ein ‚Remodeling‘. Dieses wird wahrscheinlich durch Kinine über den B₂R beeinflusst und hier durch die Hochregulation des B₂R im Nicht-Infarktgebiet des linken und im rechten Ventrikel verdeutlicht.

Auch ein Anstieg von NFκB, dass an der Hochregulation des B₁R beteiligt sein könnte, wurde nach dem Myokardinfarkt bei Behandlung mit ACE-Inhibitor detektiert (Frantz *et al.*, 2003). In dieses Konzept passen auch die Daten der Tiere die nach dem Myokardinfarkt mit einem ACE-Inhibitor, AT₁R- und AT₂R-Antagonisten behandelt wurden. Trotz einer Verbesserung der Herzfunktion durch eine Inhibition

des ACE, konnte kein Einfluß auf die Kollagen I-mRNA-Expression festgestellt werden. Die TGR(hKLK1)-Tiere, mit einem aktivierten KKS, zeigten keine bessere Herzfunktion nach Myokardinfarkt als die entsprechenden Kontrolltiere, auch die Kollagen I-mRNA-Expression war unverändert.

Die Inhibition des AT₁R, mit dem Antagonisten Irbesartan führte 3 Wochen nach Myokardinfarkt zur Verbesserung von Herzfunktion und Herzindex. Dies war von einer signifikanten Verringerung der Kollagen I-mRNA-Expression im Infarktgebiet des linken Ventrikels begleitet. Im Nicht-Infarktgebiet konnte keine Veränderung durch die AT₁R-Antagonistengabe festgestellt werden. Ju *et al.* (1997) konnten dort ebenfalls eine geringere Kollagensynthese beobachten (Ju *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu, führte die Gabe des AT₂R-Antagonisten PD 123319 zur Erhöhung der Kollagen I-mRNA-Expression, trotz Verbesserung von Herzfunktion und Herzindex. Zusammengefasst kommt es nach dem Myokardinfarkt zum kardialen ‚Remodelling‘, bei dem komplexe Vorgänge zur Stabilisierung des Herzens eingeleitet werden. An diesen Prozessen ist auch das KKS beteiligt. Die Hochregulation der beiden BKR könnte eine Kompensation des KKS darstellen, die Hypertrophie des Herzens zu begrenzen. Weiterhin gehen diese Prozesse mit einer vermehrten Kollagensynthese einher. Die BKR scheinen wichtige Faktoren bei der Kollagensynthese zu sein, wobei die anti-proliferativen, kardioprotektiven Wirkungen über den B₂R vermittelt werden. Auch die nicht vom Infarkt betroffenen Herzareale durchlaufen ein ‚Remodeling‘, was durch Kinine über den B₂R beeinflusst wird. Hierbei scheinen auch Zytokine und das RAAS beteiligt sein.

5.4. Die Genetische Defizienz der Bradykinin-Rezeptoren

Rezeptorantagonisten sind unverzichtbare Werkzeuge, um bestimmte Einflüsse des KKS und RAS auf die Expression der Bradykinin-Rezeptoren und die Interaktion der Systeme unter pathophysiologischen Bedingungen zu untersuchen. Sie blockieren aber den Rezeptor nur und schalten ihn nicht komplett aus. So wurden beispielsweise Tiere gezüchtet, die bestimmte Gendefekte aufweisen und als ‚knockout‘-Tiere bezeichnet werden. Mit diesen Tieren kann der Ausfall des Genproduktes isoliert betrachtet und diese Auswirkungen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Des Weiteren kann so eine kontinuierliche Inhibition eines Proteins erreicht werden, was bei einer pharmakologischen Behandlung besonders beim Tiermodell nicht immer 100%ig gewährleistet ist.

5.4.1. Die B₁-Rezeptor-Defizienz

In der vorliegenden Arbeit wiesen die 15 Monate alten B₁R-defizienten Tiere einen höheren Herzindex als der Kontrollstamm auf (Tab. 4.16). Weiterhin war die BNP-mRNA-Expression bei diesen Tiere signifikant erhöht (Abb. 4.95). Bei den 5 und den 15 Monate alten Mäusen wurde eine tendentiell bzw. signifikant geringere B₂R-Expression nachgewiesen (Abb. 4.93, 4.94).

Statt der erwarteten Hochregulation des B₂R, wiesen sowohl die 5 als auch die 15 Monate alten Mäuse eine geringere Expression auf. Diese Vermutung beruhte auf Befunden bei B₂R-defizienten Mäusen. Bei diesen Tieren wurde gezeigt, dass der B₁R kompensatorisch hochreguliert wird (Duka *et al.*, 2001), was allerdings bei B₁R-,knockout'-Mäuse mit B₂R bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Bader *et al.* (2003) fanden bei B₁R-B₂R-Doppel-,knockout'-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine Unterschiede des Blutdruckes und keine pathologischen Auffälligkeiten (Bader *et al.*, 2003). Pesquero *et al.* (2000) demonstrierten gesunde B₁R-defiziente Mäuse, die fruchtbar und normotensiv sind (Pesquero *et al.*, 2000). Auch nach Ischämie und Reperfusion zeigten die Herzen von B₁R-defizienten Mäusen keine hämodynamischen Unterschiede zu Kontrollmäusen (Lagneux *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigten die 15 Monate alten B₁R-defizienten Tier in dieser Arbeit einen höheren Herzindex als der Kontrollstamm. Auch die BNP-mRNA-Expression war in den 15 Monate alten B₁R-defizienten Tiere sigifikant erhöht. Da eine eingeschränkte Herzleistung in der Regel mit einer Erhöhung der natriuretischen Peptide einhergeht, gelten diese als kardiale Marker. Sie bewirken eine Gegenregulation bei einer Volumenausdehnung und Druckbelastung des Herzens (Holmes *et al.*, 1993).

Die Hypertrophie der Herzen bei den 15 Monate alten Tieren, angezeigt durch den erhöhten Herzindex und die erhöhte BNP-mRNA-Expression, könnte sich erst mit dem Altern der Tiere entwickeln. Die in der Studie von Lagneux *et al.* (2000) benutzten Mäuse, die keine hämodynamischen Unterschiede aufwiesen, waren nur 3-4 Monate alt (Lagneux *et al.*, 2000). Da auch 12 Monate alte B₂R-defiziente Tiere, abhängig vom Alter, eine dilatative Kardiomyopathie zeigten (Emanuelli *et al.*, 1999) könnte dies auch bei den B₁R-defizienten Mäusen der Fall sein.

Ferner nutzten Lagneux *et al.* (2000) weibliche und männliche Tiere (Lagneux *et al.*, 2000), was einen Einfluss auf die statistische Analyse hat und damit zu einer nicht signifikanten Veränderung der hämodynamischen Parameter führt. Im Myokardium und in den kardialen Fibroblasten sind Östrogen-Rezeptoren vorhanden und aktiv (Grohe *et al.*, 1997). Da Östrogen direkt anti-hypertrophische und anti-apoptotische Wirkungen auf die Kardiomyozyten ausübt, die Anti-Wachstumseffekte von ACE-Inhibitoren und die Expression des KKS beeinflusst, haben die weiblichen Geschlechtshormone einen protektiven Einfluß auf die kardiale Funktion (Pelzer *et al.*, 1997, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden nur männliche Tiere genutzt. Außerdem zeigen diese gegensätzlichen Ergebnisse, die Problematik der ,knockout'-Modelle. Mit ihnen ist es zwar grundsätzlich möglich die Proteinaus-schaltung in einen Organismus zu untersuchen, jedoch könnten zur Kompensation bei diesen Tieren andere Systeme aktiviert sein. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass schon während Embryogenese das entsprechende Protein bei den Tieren nicht vorhanden ist, und schon dies zu Veränderungen führen kann.

Die Ergebnisse, die mit den B₁R-defizienten Tieren erhalten wurden, unterstreichen die Notwendigkeit des B₁R für wichtige physiologische Funktionen und das kardioprotektive Potential des B₁R. Außerdem verdeutlichen sie die Interaktion der BKR untereinander und die Interaktion mit anderen Systemen.

5.4.2. Die B₂-Rezeptor-Defizienz

In der vorliegenden Arbeit entwickelten die 15 Monate alten Tiere keinen höheren Herzindex als der Kontrollstamm (Tab. 4.17). Die BNP-mRNA-Expression dieser Tiere war nicht sigifikant erhöht (Abb. 4.99). Bei den 5 und 15 Monate alten B₂R-KO-Mäusen wurde keine B₁R-Expression detektiert (Abb. 4.97, 4.98).

Andere Arbeitsgruppen zeigten zuvor den Einfluß der B₂R-Deletion bei Mäusen. Beispielsweise zeigten Emanuelli *et al.* (1999) bei B₂R-,knockout'-Mäuse einen höheren Blutdruck als beim Kontrollstamm. Ebenso bildete sich bei diesen Tieren, in Abhängigkeit vom Alter, eine dilatative Kardiomyopathie. Dies erklärt sich durch die Kompensation des erhöhten Blutdruckes mit einer linksventrikulären Hypertrophie innerhalb von 6 Monaten und nach 12 Monaten folgt dieser dann eine Dilatation (Emanuelli *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Emanuelli *et al.* (1999) fanden Milia *et al.* (2001) keinen Einfluß der Deletion des B₂R auf den Blutdruck bei Mäusen (Milia *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wiesen die 15 Monate alten Tiere, im Einklang mit Milia *et al.* (2001), keinen höheren Herzindex auf als der Kontrollstamm. Als Marker für die Volumenausdehnung und Druckbelastung des Herzens (Holmes *et al.*, 1993) wurde die mRNA-Expression von BNP verfolgt. Diese war in den Ventrikel der 15 Monate alten Tiere nicht sigifikant erhöht, was zum unveränderten Herzindex passt und zu den Ergebnissen von Milia *et al.* (2001). Der protektive Einfluss von Östrogenen (Grohe *et al.*, 1997; Pelzer *et al.*, 1997, 2002) kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da nur männliche Tiere verwendet wurden. Weder bei den 5 noch bei den 15 Monate alten B₂R-KO-Mäusen war eine Expression des B₁R zu finden. Das steht im Einklang damit, dass der B₁R ein induzierbarer Rezeptor ist, der unter basalen Bedingungen nur sehr schwer mit sehr sensitiven Methoden nachweisbar ist. Jedoch stehen die Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeit von Milia *et al.* (2001, 2003) im Gegensatz zu anderen Ergebnissen mit B₂R-KO-Mäusen. Duka *et al.* (2001) zeigte, dass es bei B₂R-KO-Mäusen zur Hochregulation des B₁R kommt (Emanuelli *et al.*, 1999; Duka *et al.*, 2001). Auch hier zeigt sich wiederum mit den gegensätzlichen Ergebnissen die Problematik der ‚knockout'-Modelle. Es ist zwar grundsätzlich mit ihnen möglich einen Organismus mit Proteinausschaltung zu untersuchen, jedoch können bei diesen Tieren andere Systeme zur Kompensation aktiviert werden. Zugleich muss der Einfluß des fehlenden Proteins auf die Embryogenese bei diesen Tieren berücksichtigt werden.

Auch die genetische Herkunft der Tiere könnte bei den unterschiedlichen Ergebnissen eine Rolle spielen. Zum Beispiel zeigte sich bei AT₂R-defizienten Mäusen mit unterschiedlicher genetischer Herkunft, entweder ein leicht gesteigerter Blutdruck (Ichiki *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 2000) oder keine Veränderung des Blutdruckes (Hein *et al.*, 1995). Milia *et al.* (2001, 2003), Alfie *et al.* (1996, 1997) und Rhaleb *et al.* (1999) nutzten 129Sv/J-, SV129/SvEv- bzw. 129/SvEv-Mäuse, die keine Unterschiede des basalen Blutdruckes zeigten. Jedoch konnten Maestri *et al.* (2003) Unterschiede aufgrund der genetischen Herkunft feststellen (Maestri *et al.*, 2003). Die 129/J-Stämme besitzen von Natur aus 2 Reningene und zeigen im

Vergleich mit C57BL/6-Mäusen, die nur ein Renin aufweisen, eine höhere Plasma-Reninaktivität (Wang *et al.*, 2002), worauf sich ein Unterschied begründen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden C57BL/6-Mäuse genutzt, die unter basalen Bedingungen ebenfalls keine kardialen Veränderungen zeigten. Da Duka *et al.* (2001, 2003) und Emanuelli *et al.* (1999) keine Angaben über die genetische Herkunft machen, kann dieser Aspekt jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefaßt zeigen B₂R-defiziente Tiere, je nach genetischem ‚background‘, veränderte kardiale Parameter und eine erhöhte B₁R-Expression. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, wie auch andere Untersuchungen von Tieren mit diesem genetischen Hintergrund, keine Unterschiede. Da aber die komplette Ausschaltung von Genen grundsätzlich problematisch ist, kann die Kompensation der Deletion des B₂R durch andere Systeme nicht ausgeschlossen werden. Dies schmälert jedoch nicht die Bedeutung des B₂R bei vielen physiologischen Funktionen, sondern verdeutlicht die Interaktion der BKR mit vielen anderen Systemen.