

## 6. Zusammenfassung

Kinine sind Peptidmediatoren mit vielfältigen physiologischen und pathologischen Funktionen im kardiovaskulären System (Tschöpe et al., 2002). Sie üben ihre Effekte über die selektive Stimulierung der G-Protein gekoppelten Bradykinin-Rezeptoren (BKR),  $B_1$  ( $B_{1R}$ ) und  $B_2$  ( $B_{2R}$ ), aus. Unter basalen Bedingungen vermittelt der konstitutiv exprimierte  $B_{2R}$  die meisten der bekannten Kinin-bedingten Effekte. Die  $B_{1R}$ -vermittelten Effekte sind im Wesentlichen unbekannt und Studien über kardioprotektive Effekte sind widersprüchlich (Marceau et al., 1998). Einige Studien deuten auf sowohl kurzfristige als auch langfristige kardioprotektive Effekte der Kinine (Tschöpe et al., 1997c, 2000). Die Regulation der BKR-Subtypen ist im Wesentlichen unbekannt. Da die BKR-Expression kann durch Zytokine und oxidativen Stress hochreguliert werden kann (Phagoo et al., 1999; Sabourin et al., 2002), könnten sie auch mit anderen Peptidsysteme, wie dem Renin-Angiotensin-System (RAS), verbunden sein (Dekan et al., 1997; Marin-Castano et al., 2002; Tschöpe et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde die BKR-Gene auf alternative Transkripte und weitere Promotoren untersucht. Ebenso wurde die kardiale BKR-Regulation in verschiedenen Herzinsuffizienz-Modellen geprüft, die durch eine aktivierte Zytokinkaskade und ein hochreguliertes RAS charakterisiert sind. So wurde der Einfluss von ischämischem Stress nach Induktion eines Myokardinfarktes (MI), Stoffwechselstress nach Induktion von Diabetes mellitus (DM) und mechanischem Stress nach LVH auf die kardialen BKR-mRNA- und Proteinspiegel bestimmt. Weiterhin wurde der Einfluss von metabolischem Stress bei Tieren mit aktiviertem Kallikrein-Kinin-System (KKS) untersucht. Zusätzlich wurde die Rolle der BKR auf die  $AT_1R$ - und  $AT_2R$ -Blockade-vermittelten Effekte mit Hilfe pharmakologischer Interventionen und transgenen Tieren untersucht. Die  $IL1\beta$ -mRNA-Spiegel unter pathophysiologischen Bedingungen wurden verfolgt, sowie der Einfluss des Interleukin-Converting-Enzym-Inhibitors (ICEI) auf die kardiale BKR-mRNA-Expression. Weiterhin die BKR-mRNA-Spiegel wurden bei  $B_{1R}$ - und  $B_{2R}$ -'knockout'-Mäusen verfolgt. Im Herzen wurden jeweils zwei verschiedene BKR-mRNA-Transkripte identifiziert, die vermutlich durch alternatives Spleißen entstehen. Beide BKR wurden unter physiologischen Bedingungen in vielen Geweben detektiert, wobei der  $B_{1R}$  nur schwer mit sehr sensitiven Methoden nachgewiesen werden kann. Sechs Wochen nach Induktion der LVH war der Herzindex (HI) erhöht, während die linksventrikuläre Funktion (LVP,  $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ ) nicht schlechter war, bis auf eine erwartete Zunahme des LVEDP. Die scheinoperierten Tiere exprimierten nur schwach  $B_{1R}$ -mRNA und die kardiale Überlastung führte zur Zunahme der  $B_{1R}$ - und  $B_{2R}$ -mRNA-Expression.

Die STZ-behandelten Wildtyp- und TGR(hKLK1)-Ratten entwickelten eine schwerwiegende Hyperglykämie. Dies beeinträchtigte sowohl beim Wildtyp als auch bei den transgenen Tieren LVP,  $dP/dt_{max}$  und  $dP/dt_{min}$  und erhöhte den HI. Wie erwartet exprimierten die TGR(hKLK1)-Tieren humanes KLK-mRNA. Die  $B_{1R}$ -,  $B_{2R}$ - und  $IL1\beta$ -mRNA-Expression im linken (LV) und rechten Ventrikel (RV) war im Vergleich zu normoglykämischen Wildtyp und TGR(hKLK1)-Ratten gesteigert. Die Tiere mit chronisch aktiviertem KKS zeigten im LV und RV höhere  $B_{1R}$ - und  $B_{2R}$ -mRNA-Spiegel als Wildtypiere. Die  $IL1\beta$ -mRNA-Spiegel unterschieden sich nicht. Die Behandlung der

diabetischen TGR(hKLLK1) mit Icatibant führte zur weiteren Zunahme des HI und zur Reduktion der transgen-verbundenen Verbesserung der LV Funktion. Die B<sub>2</sub>R- und IL1β-mRNA-Expression im LV und RV wurde durch Behandlung mit Icatibant reduziert.

6 Stunden und 6 Tage nach Induktion des MI war der HI erhöht und die LV Funktion schlechter. 6 Stunden nach MI war die B<sub>1</sub>R-mRNA Expression unterhalb des Detektionslevels und die B<sub>2</sub>R- und IL1β-mRNA Expression erhöht. 6 Tage nach MI wurden erhöhte B<sub>1</sub>R- und B<sub>2</sub>R-mRNA und Proteinspiegel, wie auch IL1β-mRNA-Spiegel nachgewiesen. Auch 3 Wochen nach MI war die LV Funktion schlechter. Bei infarzierten Ratten wurden im LV und RV erhöhte B<sub>1</sub>R-, B<sub>2</sub>R-mRNA- und Protein-expression, ebenso IL1β-mRNA-Expression detektiert. Der infarzierte Bereich des LV zeigte höhere B<sub>1</sub>R-, B<sub>2</sub>R-mRNA und Proteinlevel, ebenso IL1β- und Kollagen I-mRNA-Spiegel, wie der nicht-infarzierte.

Quinapril- und Irbesartan-behandelte Ratten zeigten sechs Tage und drei Wochen nach MI eine verbesserte LV Funktion und einen reduzierten HI. Die Quinapril-behandelte Ratten wiesen eine höhere B<sub>1</sub>R- und B<sub>2</sub>R-mRNA-Expression nach MI (6 Tage und 3 Wochen) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ratten auf. Die AT<sub>1</sub>R-Blockade führte an beiden Zeitpunkten zur weiteren Zunahme von B<sub>1</sub>R-mRNA und Protein. Die IL1β-mRNA-Expression wurde nicht durch die Quinaprilbehandlung verändert, jedoch durch Irbesartan erhöht. Die Expression der Kollagen I-mRNA war im nicht-infarzierten Bereich des LV durch Quinapril und Irbesartan unbeeinflusst, aber im infarzierten Bereich durch Irbesartan reduziert. Um festzustellen, ob eine AT<sub>1</sub>R-Überstimulierung zu Veränderungen führt, wurden Ratten, die den AT<sub>1</sub>R, angetrieben mit dem MHC (myosin heavy chain) Promotor, überexprimieren analysiert. Da dieses Promotorkonstrukt bei Tieren, die älter als drei Monate sind, inaktiv ist (Hoffman et al., 2001), wurde der MI bei sechs Wochen alten AT<sub>1</sub>R-transgen und Kontrollratten induziert. Jedoch führte die AT<sub>1</sub>R-Überexpression zu beiden Zeitpunkten weder zur Beeinträchtigung der LV Funktion noch des HI. Scheinoperierte Tiere, die den AT<sub>1</sub>R überexprimieren zeigten gleiche Konzentrationen der B<sub>1</sub>R-mRNA, aber nach Induktion des MI eine signifikante Runterregulation dieser. Während sich die Gesamt-AT<sub>1</sub>R-mRNA bei den scheinoperierten TGR-MHCAT1 und Kontrollratten nicht unterschied, waren die Spiegel nach MI im Vergleich zu altersangepassten Wildtypenratten erhöht. Die AT<sub>2</sub>R-Blockade führte an beiden Zeitpunkten zur Verbesserung von HI und LV Funktion im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Ratten. Die B<sub>2</sub>R-mRNA-Expression wurde durch die PD123319-Behandlung gesteigert.

Bei der Herzinsuffizienz haben die beiden BKR eine wichtige Bedeutung und werden unter diesen Bedingungen hochreguliert. Die Mechanismen der B<sub>1</sub>R-Regulation werden durch den AT<sub>1</sub>R beeinflusst und der B<sub>1</sub>R trägt zu den kardioprotektiven Effekten der AT<sub>1</sub>R-Blockade bei. Auch die IL1β-Hochregulation ist ein wichtiger Mechanismus zur Hochregulation des B<sub>1</sub>R, bei der auch andere Zytokine beteiligt sein könnten. Das kardiale ‚Remodeling‘ wird durch Kinine über den B<sub>2</sub>R beeinflusst und so auch die Kollagensynthese. Auch hierbei spielt die Interaktion mit IL1β und anderen Zytokinen eine wichtige Rolle. Die Hochregulation beider BKR-Typen während des kardialen Remodelings, herbeigeführt durch LVH-induziertem Stress, durch Hyperglykämie-induziertem oxidativen Stress, wie auch nach Ischämie-induziertem Stress deutet auf eine größere Rolle der Kinine bei den komplexen Prozessen der kardialen Gewebeheilung und Reparatur.

## Abstract

Kinins are peptide mediators of a diverse range of physiological and pathological functions of the cardiovascular system (Tschöpe *et al.*, 2002). They exert their biological effects by the selective stimulation of two distinct G-protein coupled receptors termed bradykinin (BK) B<sub>1</sub>-receptor (B<sub>1</sub>R) and B<sub>2</sub>-receptor (B<sub>2</sub>R). Under basal conditions the constitutive expressed B<sub>2</sub>R mediate most of the effects usually attributed to kinins. The effects mediated by the B<sub>1</sub>R are largely unknown, and the results of studies concerning their cardioprotective effects are inconsistent (Marceau *et al.*, 1998). Several works suggests that kinins have both short-term and long-term cardioprotective effects (Tschöpe *et al.*, 1997c, 2000). However, the regulation of the BK receptor (BKR) subtypes involved is largely unknown. Since mRNA expression of both BKR can be up-regulated by cytokines and oxidative stress (Phagoo *et al.*, 1999; Sabourin *et al.*, 2002), it may also dependent on the status of other peptide systems like the renin-angiotensin system (RAS) (Dean *et al.*, 1997; Marin-Castano *et al.*, 2002; Tschöpe *et al.*, 2002).

In the present study has proofed the BKR genes for alternate transcripts and further promoters. Also this concept was verified by investigating cardiac BKR regulation in different rat models with cardiac failure, known also to be characterized by an activated cytokine cascade and up-regulated RAS. Thus, the influence of ischemic stress after the induction of myocardial infarction (MI), metabolic stress after induction of diabetes mellitus (DM) and of mechanic stress after pressure-overload induced LVH on cardiac BKR mRNA and protein levels have been determined. More over the influence of metabolic stress after induction of DM in animals with an activated kallikrein kinin system (KKS) was observed. In addition the role of the BKR on the AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R blockade-dependent effects was investigated using pharmacological interventions and transgenic animals. The IL1 $\beta$ -mRNA levels under pathophysiological conditions and the influence of interleukin converting enzyme inhibitor (ICEI) on the cardiac BKR mRNA levels were followed. Moreover the BKR mRNA levels in B<sub>1</sub>R- and B<sub>2</sub>R-deficient mice were studied. For each gene were identified two different BK mRNA transcripts wich formed by alternate splicing. Both BKR subtypes could be detected in different tissues, whereas the B<sub>1</sub>R could be hard detected only with very sensitive methods.

Six weeks after induction of LVH the heart weight-to-body weight ratio (HI) was increased, whereas left ventricular function (LVP, dP/dt<sub>max</sub>, dP/dt<sub>min</sub>) was not exacerbated. Only an expected increase in LVEDP was found. In sham-operated animals, B<sub>1</sub>R mRNA was only weakly expressed. Thus, the cardiac overload led to an increase of B<sub>1</sub>R mRNA. The STZ-induced diabetic and TGR(hKLK1) rats developed severe hyperglycemia. Thereby, LVP, dP/dt<sub>max</sub> and dP/dt<sub>min</sub> were impaired and HI were increased. As anticipated the human hKLK mRNA was expressed in TGR(hKLK1). The B<sub>1</sub>R, B<sub>2</sub>R and IL1 $\beta$  mRNA expression in the left (LV) and right ventricle (RV) was increased compared to normoglycemic rats in both, wildtyp and TGR(hKLK1) rats respectively. The animals with chronically activated tissue KKS system revealed higher B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R mRNA level than wildtyp animals in LV and RV. The IL1 $\beta$  mRNA level did not differ. Treatment of diabetic TGR(hKLK1) with icatibant led to a further increase of the heart weight-to-body weight ratio and, except for LVP, to an attenuation of the

transgene-related improvement of the diastolic dysfunction. The B<sub>2</sub>R and IL1 $\beta$  mRNA expression level in LV and RV were reduced by the treatment of Icatibant.

Six hours and six days after induction of MI the HI was increased and the LV function was aggravated. Six hours after MI the B<sub>1</sub>R mRNA expression was below the detection level. The B<sub>2</sub>R and IL1 $\beta$  mRNA expression were increased. Six days after MI B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R mRNA and protein level are increased, as well as the IL1 $\beta$  mRNA level. Three weeks after the induction of MI the LV function is reduced and dP/dt<sub>min</sub> was increased as compared to controls. In infarcted rats in LV and RV, B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R mRNA and protein expression were increased compared to sham-operated rats, also the IL1 $\beta$  mRNA expression. The infarcted area of the LV showed a higher B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R mRNA as well as Protein level than the non-infarcted area, more over the IL1 $\beta$  and collagen I mRNA level. Quinapril and Irbesartan-treated rats showed an improved LV function and reduced HI compared to vehicle-treated rats six days and three weeks after induction of MI. Quinapril-treated SD-rats turned out higher B<sub>1</sub>R and B<sub>2</sub>R mRNA expression after induction of MI (6d and 3w) compared to vehicle-treated rats. AT<sub>1</sub>R blockade led to a further increase of B<sub>1</sub>R mRNA and protein at both time points. The IL1 $\beta$  mRNA expression was not altered by the quinapril-treatment, but was increased by irbesartan. The collagen I mRNA in the non infarcted area of LV was not affected by both, Quinapril and Irbesartan respectively, but in the infarcted area the mRNA level was reduced by irbesartan. To investigate whether an AT<sub>1</sub>R over-stimulation would lead to changes, rats over-expressing AT<sub>1</sub>R driven by an  $\alpha$ MHC (myosin heavy chain) promoter were analysed. Since this promoter construct is inactive in animals older than three months (Hoffman et al., 2001), MI was induced in AT<sub>1</sub>R-transgenic and control rats aged six weeks. However, AT<sub>1</sub>R over-expression led neither to an impairment of the LV function nor to changes HI at both time points. Sham-operated animals over-expressing AT<sub>1</sub>R had equal concentrations of B<sub>1</sub>R mRNA compared to their controls, but a significant down-regulation of B<sub>1</sub>R mRNA after induction of MI. Whereas total AT<sub>1</sub>R mRNA did not differ between sham-operated TGR- $\alpha$ MHCAT1 and control rats, levels were significantly increased compared to age-matched wild type rats after induction of MI. The AT<sub>2</sub>R blockade led to an improvement of the HI and LV function compared to vehicle-treated rats at both time points. The B<sub>2</sub>R mRNA expression was increased by the PD123319-treatment.

The both BKR subtypes have an important role in cardiac failure and were up regulated under these conditions. The mechanisms of the B<sub>1</sub>R regulation are influenced by the AT<sub>1</sub>R and the B<sub>1</sub>R contributes to the cardio-beneficial effects of the AT<sub>1</sub>R blockade. Also IL1 $\beta$  upregulation is an important mechanism for the upregulation of the B<sub>1</sub>R, where also additional cytokines can be involved. The cardiac remodeling is influenced by kinins over the B<sub>2</sub>R and thus also the collagen synthesis. As well here the interaction with IL1 $\beta$  and additional cytokines plays an important role. Up-regulation of both BKR types during the development of cardiac remodeling induced by pressure-overload induced stress, by hyperglycemia-induced oxidative stress as well as after ischemia-induced stress indicates a major role of kinins in the complex processes of cardiac tissue injury and repair.