

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Die Rolle des Angiotensin AT2-Rezeptors bei der Inflammation:
in vitro und *in vivo* Studien unter Verwendung des neuartigen
AT2-Rezeptor Agonisten Compound 21“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum
(Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Hartge
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Unger

2. Prof. Dr. med. K. Amann

3. Prof. Dr. med. U. Wenzel

Datum der Promotion: 09. September 2011

Inhaltsverzeichnis

Glossar	4
Abstract	5
1 Einleitung und Zielstellung	5
2 Methoden	
2.1 Zellkultur	6
2.2 Protokolle zur pharmakologischen Stimulation <i>in vitro</i>	6
2.3 <i>Real-time</i> RT-PCR und ELISA	8
2.4 Immunfluoreszenzfärbung	8
2.5 Transfektion und Luziferase-Reporter-Assay	8
2.6 Untersuchung direkter AT2R-Stimulation mit Compound 21 <i>in vivo</i>	9
3 Ergebnisse	
3.1 AT2R vermittelte Hemmung einer TNF α induzierten Zytokinexpression <i>in vitro</i>	9
3.2 Nachweis der Selektivität und Spezifität der Wirkung von Compound 21	9
3.3 AT2R vermittelte Aktivierung von Protein-Phosphatasen	10
3.4 Arachidonsäuremetabolite als <i>Second Messenger</i> von Ang II in der Inflammation	10
3.5 Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch direkte AT2R-Stimulation mit Compound 21	10
3.6 PARP-1 als <i>upstream</i> Regulation des AT2Rs	11
3.7 Anti-inflammatorische Wirkung direkter AT2R-Stimulation mit Compound 21 <i>in vivo</i>	11
4 Diskussion	12
Literaturverzeichnis	15
Anteilerklärung und ausgewählte Publikationen	17
Publikation 1: Rompe F. <i>et al.</i> , Hypertension, 2010	P1
Publikation 2: Reinemund J. <i>et al.</i> , Biochemical Pharmacol, 2009	P2
Publikation 3: Kaschina E. <i>et al.</i> , Circulation, 2008	P3
Lebenslauf	A1
Komplette Publikationsliste	A2
Selbständigkeitserklärung	A5
Danksagung	A6

Glossar

3-AB	3-Aminobenzamid
Ang II	Angiotensin II
ARB	Angiotensin Rezeptor Blocker
AT1R	Angiotensin AT1-Rezeptor
AT2R	Angiotensin AT2-Rezeptor
BLM	Bleomycin
bzw.	beziehungsweise
C21	Compound 21
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EET	11,12-Epoxyeicosatriensäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
I κ B	<i>Inhibitory kappa B</i>
IKK	<i>Inhibitory kappa B</i> Kinase-Komplex
IL	Interleukin
Irb	Irbesartan
h	Stunden
HC	Hydrocortison
20-HETE	20-Hydroxyepoxyeicosatriensäuren
HPDF	humane primäre dermale Fibroblasten
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
min	Minuten
Los	Losartan
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MPDF	murine primäre dermale Fibroblasten
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
OA	Okadasäure
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
PPOH	<i>2-(2-propynyloxy)-benzenhexanoic acid</i>
RAS	Renin-Angiotensin-System
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Tel	Telmisartan
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Val	Valsartan
z.B.	zum Beispiel

Abstract

Angiotensin II (Ang II) vermittelt seine Effekte im Wesentlichen über zwei Rezeptor-Subtypen – den AT1- und den AT2-Rezeptor (AT1R bzw. AT2R). Für den AT1R konnte bereits eindeutig gezeigt werden, dass dieser beispielsweise durch die Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine entzündungsfördernde Effekte von Ang II vermittelt. Im Gegensatz dazu geht man beim AT2R, unter anderem durch die Induktion anti-inflammatorischer Effekte, von einer gewebeprotectiven Wirkung aus.

Dank der Synthese des ersten selektiven, nicht-peptidischen und oral aktiven AT2R-Agonisten Compound 21 (C21) konnte in dieser Arbeit erstmals durch direkte AT2R-Stimulation die anti-inflammatorische Wirkung des AT2Rs *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. So führte die Stimulation mit C21 zur Repression einer durch Tumornekrosefaktor (TNF) α induzierten Interleukin (IL) 6, *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 und TNF α mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten sowie Nabelschnurendothelzellen [P1]. Der Zytokin inhibierende Effekt von C21 konnte darüber hinaus *in vivo* in einem kutanen Entzündungsmodell in Mäusen nach einer durch Bleomycin induzierten toxischen Inflammation verifiziert werden [P1]. In normotensiven Wistar Ratten führte C21 nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt zu einem signifikanten Rückgang der IL1 β , IL2 und IL6 mRNA-Expression im Perinfarktgewebe sowie der MCP-1- und Myeloperoxidase-Level im Plasma [P3]. Der anti-inflammatorische Effekt von C21 konnte unter Verwendung des spezifischen AT2R-Antagonisten PD123319 vollständig aufgehoben werden und war in AT2R defizienten Zellen nicht detektierbar [P1; P3].

Im Rahmen der Charakterisierung der an der AT2R vermittelten Reduktion pro-inflammatorischer Mediatoren wie z.B. von IL6 konnten folgende Signaltransduktionsmechanismen identifiziert werden a) die Aktivierung von Protein-Phosphatasen, b) die Inhibition des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) sowie c) die Cytochrom P450-abhängige Epoxidation von Arachidonsäure zu 11,12-Epoxyeicosatriensäure (EET). Im Zuge der Untersuchungen konnte ebenfalls eine mit Hydrocortison vergleichbar effektive Blockade der IL6-Promoteraktivität durch C21 beobachtet werden [P1].

Der Arachidonsäuremetabolit 20-Hydroxyepoxyeicosatriensäure (20-HETE) wurde als *Second Messenger* in der AT1R gekoppelten pro-inflammatorischen Signalkaskade von Ang II identifiziert [P1]. Ferner konnte Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) eine Rolle als *upstream* Regulator des AT2Rs nachgewiesen werden [P2]. Die in dieser Arbeit erstmals beobachtete anti-inflammatorische Wirkung des AT2Rs *in vitro* und *in vivo* mittels pharmakologischer Stimulation mit dem ersten oral aktiven, nicht-peptidischen AT2R-Agonisten C21 lässt an eine zukünftige therapeutische Anwendung bei pathologischen Ereignissen, welche die Reduktion inflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise von IL6 oder die Inhibition von NF- κ B erfordern, denken.

1 Einleitung und Zielstellung

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein Hormonsystem, das traditionell der kardiovaskulären Medizin zugeschrieben wird. Das hauptsächlich wirksame Hormon des RAS, Angiotensin II (Ang II), ist über eine Vielzahl von Mechanismen an der Regulation des Blutdrucks sowie der Wasser- und Elektrolyt-Homöostase beteiligt. In den letzten Jahren wurden jedoch auch eine Reihe von Ang II Wirkungen beschrieben, die nicht mehr allein dem kardiovaskulären System zuzuordnen sind.

Für die Wirkung von Ang II werden hauptsächlich zwei Rezeptoren, der AT1- und der AT2-Rezeptor (AT1R bzw. AT2R), verantwortlich gemacht. In der Regel scheinen die über den jeweiligen Rezeptor-Subtyp vermittelten Effekte gegensätzlich zu sein. Klassische Effekte von Ang II wie Vasokonstriktion, Zellproliferation, Fibrose oder Inflammation [1] werden mit dem AT1R in Verbindung gebracht [2]. Hingegen löst Ang II über den AT2R vasodilatatorische [3], anti-fibrotische [4], anti-proliferative [5] oder anti-inflammatorische Effekte aus [6-8]. Ferner konnte *in vivo* unter Verwendung von AT2R-Antagonisten

(PD123319, PD123177), aber auch in AT2R defizienten Mäusen eine gewebeprotective Wirkung des AT2Rs, beispielsweise nach Schlaganfall, Myokardinfarkt, Atherosklerose oder neuronalen Schäden, beobachtet werden [9-12].

Die Charakterisierung AT2R vermittelter Funktionen und Mechanismen gestaltet sich von jeher schwierig. Das geringe Expressionsniveau oder gar die Abwesenheit des Rezeptors unter physiologischen Bedingungen in adulten Zellen oder Geweben, aber auch die dominierende Präsenz des AT1Rs tragen maßgeblich dazu bei, dass eine Stimulation mit dem natürlichen Liganden Ang II überwiegend AT1R vermittelte Effekte sichtbar (messbar) werden lässt. Direkte, selektive und spezifische AT2R-Stimulation – ohne Aktivierung des AT1Rs – wäre folglich der optimale experimentelle Ansatz zur Erforschung AT2R induzierter Effekte. Der Einsatz des bis *dato* vornehmlich verwendeten AT2R-Agonisten, des Peptids CGP42112A, ist jedoch nicht allein wegen seiner mangelnden *in vivo* Stabilität, sondern auch durch seine zum Teil antagonistischen Eigenschaften oft problematisch [13]. Im Jahr 2004 wurde die Synthese des ersten nicht-peptidischen und spezifischen AT2R-Agonisten, Compound 21 (C21), publiziert [14]. C21 ermöglicht zum ersten Mal die selektive Stimulation des AT2Rs *in vitro* als auch *in vivo* und eröffnet neue und vielversprechende Möglichkeiten zur Aufklärung AT2R gekoppelter Effekte und Mechanismen. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass C21 wegen seiner oralen Bioverfügbarkeit und *in vivo* Stabilität, auch aus klinischer Sicht von Interesse sein könnte.

Das primäre Ziel dieser Arbeit bestand im Nachweis, dass es sich bei dem neuartigen, nicht-peptidischen AT2R-Agonisten C21 tatsächlich um ein Molekül mit AT2R spezifischer und agonistischer Wirkungsweise handelt. Zunächst sollte *in vitro* mittels Expressionsanalysen pro-inflammatorischer Zytokine überprüft werden, ob der AT2R anti-inflammatorisch wirkt. Nach Validierung dieser Hypothese wurde die Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege bei der anti-inflammatorischen Wirkung des AT2R untersucht (Aktivierung von Protein-Phosphatasen; Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B; Aktivierung von CYP2C/2J resultierend in einer vermehrten Synthese des Arachidonsäuremetaboliten EET). Weiterhin sollte durch Inhibition der Effekte von C21 mit dem etablierten AT2R-Antagonisten PD123319 bzw. durch Nachweis des Fehlens der Effekte von C21 in AT2R defizienten Zellen, die Spezifität sowie selektive Wirkungsweise von C21 demonstriert werden. Die *in vivo* Relevanz sollte abschließend anhand zweier experimenteller Tiermodelle validiert und erste Erkenntnisse über das therapeutische Potential einer AT2R-Stimulation gewonnen werden.

2 Methoden

2.1 Zellkultur [P1, P2 und P3]

In dieser Arbeit wurden humane und murine primäre dermale Fibroblasten (HPDF, MPDF), humane primäre Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) [P1], die humane Neuroblastomzelllinie Kelly, murine embryonale Fibroblasten (MEF) [P2] sowie neonatale Kardiomyozyten der Zelllinie H9C2 verwendet [P3]. Für den jeweiligen Stimulationsversuch wurden Zellen in 6-*well* Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert und 24h vor Stimulationsbeginn in serumfreiem Medium inkubiert, wenn nicht anders angegeben.

2.2 Protokolle zur pharmakologischen Stimulation *in vitro* [P1 und P3]

Die anti-inflammatorische Wirkung des AT2-Rezeptors (AT2R) wurde in HPDF untersucht [P1]. Um einen möglichen Zytokin inhibierenden Effekt des AT2R-Agonisten Compound 21 (C21) detektieren zu können, wurden die Zellen zunächst mit Tumornekrosefaktor (TNF) α (10ng/ml) zur Induktion der Interleukin (IL) 6, *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 oder TNF α Expression inkubiert. Zur Untersuchung der AT2R agonistischen Wirkungsweise von C21 wurde der Effekt der direkten AT2R-Stimulation mit C21 (1 μ M) *in vitro* mit dem „klassischen Versuchsmodell der AT2R-Stimulation“, sprich der Stimulation mit dem natürlichen Liganden Angiotensin II (Ang II; 100nM) unter gleichzeitiger AT1-Rezeptor (AT1R) Blockade, in diesem Versuch mit Hilfe des AT1R-Antagonisten Irbesartan (Irb; 10 μ M), verglichen. Zur Bestätigung, dass der Effekt

von C21 auf die Zytokinexpression nicht auf Fibroblasten beschränkt, sondern auch in anderen Zell- bzw. Gewebetypen nachweisbar ist, wurde das gleiche Assay in primären Nabelschnurendothelzellen (HUVEC; Stimulation für 24h) [P1] sowie in neonatalen Kardiomyozyten der Zelllinie H9C2 (Stimulation für 10h) durchgeführt [P3].

Zur Beurteilung, ob AT1R-Antagonisten (ARBs) ebenso wie der AT2R-Agonist einen anti-inflammatorischen Einfluss auf eine TNF α induzierte Zytokinexpression ausüben, wurden HPDF mit TNF α und zusätzlich mit Irb, Telmisartan (Tel), Losartan (Los) oder Valsartan (Val) stimuliert (ARBs jeweils 10 μ M) [P1].

Für den Nachweis der selektiven Wirkung des AT2R-Agonisten C21 wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt: 1.) die Blockade des AT2Rs mit dem spezifischen AT2R-Antagonisten PD123319 (10 μ M) und 2.) Versuche in aus der Haut von AT2R *knockout* bzw. -Wildtyp Mäusen isolierten dermalen Fibroblasten. In beiden Versuchsmodellen wurde das oben beschriebene Assay (Stimulation mit TNF α und C21) durchgeführt [P1].

Zur Charakterisierung möglicher AT2R gekoppelter anti-inflammatorischer Signaltransduktionswege wurde zunächst der Einfluss von Protein-Phosphatasen untersucht, mit dem Hintergrund, dass eine AT2R vermittelte Aktivierung von Phosphatasen bereits beschrieben wurde [6]. Dazu wurden in diesem Versuch HPDF mit TNF α und C21 sowie mit dem Serin/Threonin-Phosphatase-Inhibitor Okadasäure (OA; 10nM) bzw. mit dem Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Natriumorthovanadat (Na₃VO₄; 10nM) inkubiert und anschließend analysiert, ob der hemmende Effekt von C21 auf die TNF α induzierte IL6-Expression durch Phosphatase-Inhibition aufgehoben werden kann [P1].

Darüber hinaus sollte die Rolle des Arachidonsäuremetaboliten 11,12-Epoxyeicosatriensäuren (EET) als *Second Messenger* in der AT2R vermittelten Signalkaskade anhand zweier Versuchsansätze überprüft werden. Im ersten Ansatz erfolgte die Stimulation von HPDF mit TNF α und EET (100nM) zur Überprüfung, ob EET in gleicher Weise wie eine AT2R-Stimulation, die TNF α induzierte IL6-Expression hemmt. Im Folgeexperiment wurden die Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor der CYP2C/2J-abhängigen EET-Synthese, PPOH (10 μ M), mit TNF α und C21 stimuliert, um zu ermitteln, ob sich der anti-inflammatorische Einfluss von C21 auf die mittels TNF α erhöhten IL6-Level durch Blockade der EET-Produktion unterdrücken lässt [P1].

Die über den AT1R vermittelten pro-inflammatorischen Effekte von Ang II wurden in HPDF durch Stimulation mit Ang II (100nM) mit oder ohne Vorinkubation mit dem AT1R-Antagonisten Irb oder dem AT2R-Antagonisten PD123319 untersucht. Ferner sollte der Einfluss des Arachidonsäuremetaboliten 20-Hydroxyepoxyeicosatriensäuren (20-HETE) in der AT1R gekoppelten Inflammation aufgeklärt werden. Zunächst sollte in HPDF untersucht werden, inwieweit 20-HETE (100nM) den gleichen stimulierenden Effekt auf die IL6-Expression ausübt wie Ang II über den AT1R. Zur Beantwortung der Frage, ob eine Ang II induzierte IL6-Expression durch die Inhibition der Synthese von 20-HETE unterdrückt werden kann, wurden die Zellen mit HET0016 (10 μ M), dem Inhibitor der CYP4A/4F-abhängigen 20-HETE-Synthese, preinkubiert und anschließend mit Ang II stimuliert [P1].

Die Inkubation mit den Antagonisten Irb, Tel, Los, Val, PD123319, HET0016, PPOH, OA oder Na₃VO₄ erfolgte 30min vor Zugabe der jeweiligen Stimuli für weiter 12h, falls nicht anders angegeben.

Die Regulation der AT2R-Expression durch Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP)-1 sollte in Kelly-Zellen sowie in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) untersucht werden. Hierfür wurden Kelly-Zellen mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB; 30mM; 8h) inkubiert und die AT2R mRNA-Expression analysiert. Weitere Hinweise für eine PARP-1 gekoppelte AT2R-Regulation sollten AT2R-Expressionsanalysen in PARP-1 defizienten MEF liefern [P3].

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels quantitativer *Real-time* PCR.

2.3 Real-time RT-PCR und ELISA [P1, P2 und P3]

Für die Expressionsanalysen der Zielgene wurde zunächst die RNA aus den Zellen oder Geweben isoliert, mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben und das Expressionsniveau mittels quantitativer *Real-time* PCR verifiziert. Die Amplifikation des *housekeeping*-Gens 18S rRNA diente zur Standardisierung. Die Quantifizierung der Proteinlevel erfolgte durch *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA). Die Methoden wurden nach Standardprotokollen der Hersteller durchgeführt.

2.4 Immunfluoreszenzfärbung [P1 und P2]

Für die Immunhistochemie wurden die Zellen (HPDF, Kelly-Zellen oder MEF) auf Coverslips ausgesät, nach einem optimierten Protokoll stimuliert, mit Methanol auf den Coverslips fixiert und mit einer Serumlösung blockiert. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte nach der Markierung der Zellen mit einem Primär- und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt.

A.) Untersuchung der nukleären Translokation der NF- κ B p50-Untereinheit [P1]

Die Transkription von IL6 wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) reguliert. Zunächst sollte qualitativ, durch Untersuchung der nukleären Translokation der NF- κ B p50-Untereinheit mittels Immunfluoreszenzfärbung, ermittelt werden, inwieweit die durch Stimulation des AT1- bzw. AT2Rs hervorgerufene Expressionsänderung von IL6 mit der Induktion bzw. der Inhibition der NF- κ B-Aktivität einhergeht. Im Zuge dessen sollte ebenso der Einfluss der AT1R/20-HETE- bzw. AT2R/EET gekoppelten Signalkaskade auf die Aktivitätsänderung von NF- κ B untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HPDF mit Ang II, TNF α , C21, 20-HETE oder EET zur Aktivierung bzw. Blockade von NF- κ B für 15min inkubiert (detaillierte Angaben zu den Stimulationsprotokollen siehe Abschnitt 2.2), anschließend mit einem anti-NF- κ B p50 IgG-Antikörper markiert und die nukleäre Translokation der p50-Untereinheit als Hinweis auf die NF- κ B-Aktivität fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Inkubation mit den jeweiligen Antagonisten Irb, PD, HET0016 oder PPOH erfolgte 30min vor Zugabe der oben genannten Stimuli.

B.) Untersuchung einer PARP-1 assoziierten AT2R-Regulation [P2]

Die PARP-1 vermittelte Regulation des AT2R sollte ebenso auf Proteinebene verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Kelly-Zellen, die mit oder ohne den PARP-Inhibitor 3-AB behandelt waren (10h) als auch PARP-1 *knockout* MEF mit einem anti-AT2R IgG-Antikörper markiert und die Veränderung der Rezeptorexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

2.5 Transfektion und Luziferase-Reporter-Assay [P1]

Der quantitative Nachweis einer AT1- bzw. AT2R vermittelten Modifikation der NF- κ B-Aktivität und somit auch Veränderung der IL6-Transkription/-Expression sollte mittels Luziferase-Reporter-Assay auf Promoterebene erbracht werden. Zunächst wurde ein dem Luziferase-Gen vorgeschalteter humaner IL6-Promotor mit nativer sowie mutierter NF- κ B-Bindungssequenz in einen *firefly*-Luziferase-Vektor kloniert (wtIL6- und mutIL6-pGL3). HPDF wurden mit einem wtIL6- oder mutIL6-pGL3 sowie zur Standardisierung mit einem Renilla-Luziferase-Vektor transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Ang II, TNF α , C21, 20-HETE oder EET zur Induktion bzw. Inhibition der IL6-Promotoraktivität für 4h stimuliert (detaillierte Angaben zu den Stimulationsprotokollen siehe Abschnitt 2.2). Die Analyse der IL6-Promoteraktivität erfolgte mittels Dual-Luziferase-Assays. Die Inkubation der Zellen mit den Antagonisten Irb, PD, HET0016 oder PPOH erfolgte wiederum 30min vor Zugabe der Stimuli. Ferner sollte der inhibierende Effekt von C21 auf die IL6-Promoteraktivität mit dem Effekt von Hydrocortison (HC) verglichen werden. Hierzu wurden die Zellen mit TNF α zur Induktion von NF- κ B und somit des IL6-Promoters sowie mit C21 oder HC (1 μ M) für 6h stimuliert. Die Inkubation mit HC erfolgte bereits 1h vor Zugabe von TNF α zum Kulturmedium.

2.6 Untersuchung direkter AT2R-Stimulation mit Compound 21 *in vivo* [P1 und P3]

Alle Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen unter Standardkonditionen (Temperatur und Luftfeuchtigkeit in einem 12h Tag/Nacht-Zyklus) gehalten. Die Tierhaltung und Tierversuche erfolgten nach Genehmigung und unter Einhaltung der gesetzlichen Bestimmungen des Landes Berlin.

A.) *Bleomycin induzierte kutane Inflammation in weiblichen C3H/He Mäusen [P1]*

Der Einfluss direkter AT2R-Stimulation mit C21 auf die Zytokinexpression *in vivo* sollte in C3H/He Mäusen (5 Wochen alt, ca. 18g) mit ausgeprägter kutaner, toxischer Inflammation (induziert durch Bleomycin, BLM) untersucht werden. Die Mäuse wurden in drei Gruppen zu je 8 Tieren aufgeteilt: I.) Vehikel, II.) BLM und III.) BLM+C21. Die subkutane Injektion von BLM in die Rückenhaut erfolgte alle zwei Tage. Vehikel und C21 wurden täglich an derselben Lokalisation appliziert. Zur Quantifizierung der IL6, MCP-1 und TNF α mRNA-Expression wurde die Rückenhaut im Bereich des Injektionsareals nach 8 Tagen entnommen.

B.) *Experimentell induzierter Myokardinfarkt in männlichen normotensiven Wistar Ratten [P3]*

In dieser Studie wurde der Effekt von C21 nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt (MI), hervorgerufen durch permanente Ligatur der linken Koronararterie, in normotensiven Wistar Ratten untersucht. Die MI-Tiere wurden in fünf Gruppen zu je 12 Tieren aufgeteilt: I.) Vehikel, II.) C21, III.) C21+PD123319, VI.) Candesartan, V.) C21+Candesartan. Zusätzlich wurde eine sham-operierte Kontrollgruppe mitgeführt. Die tägliche intraperitoneale Applikation der Substanzen erfolgte erstmals 24h nach MI und nachfolgend für 7 Tage. Nach Versuchsende wurden Blutproben zur Bestimmung der Plasma MCP-1- und Myeloperoxidase (MPO)-Level sowie Proben vom Herzgewebe zur Quantifizierung der IL1 β , IL2 und IL6 mRNA-Expression gewonnen.

3. Ergebnisse

3.1 AT2R vermittelte Hemmung einer TNF α induzierten Zytokinexpression *in vitro*

In ersten Vorversuchen konnte in humanen primären dermalen Fibroblasten (HPDF) ein signifikanter Anstieg der Interleukin (IL) 6 mRNA-Expression nach Stimulation mit Angiotensin II (Ang II) verzeichnet werden. Dieser Effekt ließ sich durch vorherige AT1-Rezeptor (AT1R) Blockade mit Irbesartan (Irb), jedoch nicht durch AT2-Rezeptor (AT2R) Inhibition mit PD123319 (PD), aufheben [P1:Fig.S3B], was auf eine AT1R vermittelte Stimulation der IL6-Expression schließen lässt. Die Inkubation mit Tumornekrosefaktor (TNF) α diente zur Induktion der Zytokinexpression und somit zur besseren Detektion möglicher hemmender Effekte einer AT2R-Stimulation. Nach Stimulation des AT2Rs nach dem „klassischen Versuchsmodell“, sprich der Stimulation mit Ang II unter gleichzeitiger AT1R-Blockade mit dem AT1R-Antagonisten (ARB) Irb, konnte ein signifikanter Rückgang der IL6 mRNA-Synthese beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach direkter AT2R-Stimulation mit Compound 21 (C21) auf mRNA- als auch auf Proteinebene [P1:Fig.1A,S1A]. Ferner führte C21 zur Inhibition einer TNF α induzierten *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 und TNF α mRNA-Expression in HPDF und humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) [P1:Fig.S1B,C,S2A-C]. Auch nach AT1R-Blockade mit Irb und Telmisartan (Tel), beides Angiotensin-Rezeptor-Blocker (ARBs) mit *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) γ -agonistischen Eigenschaften, konnte eine Suppression der TNF α induzierte IL6-Expression in HPDF detektiert werden. Jedoch zeigten ARBs ohne diese zusätzliche Eigenschaft keine Wirkung [P1:Fig.S2D].

3.2 Nachweis der Selektivität und Spezifität der Wirkung von Compound 21

Zum Nachweis der Selektivität und Spezifität der Wirkung von C21 wurde der Effekt des AT2R-Agonisten auf eine TNF α induzierte IL6-Expression in HPDF unter vorheriger AT2R-Blockade mit PD sowie die Wirkung in AT2R Wildtyp und AT2R defizienten murinen primären dermalen Fibroblasten (MPDF) untersucht. Die Stimulation muriner AT2R Wildtyp Zellen mit C21 führte zur signifikanten Reduktion der TNF α induzierten

IL6-Expression [P1:Fig.1C]. Hingegen war weder in HPDF nach Blockade des AT2Rs mit PD, noch in den AT2R *knockout* Zellen die inhibierende Wirkung von C21 detektierbar [P1:Fig.1B,D].

3.3 AT2R vermittelte Aktivierung von Protein-Phosphatasen

Die anti-inflammatorische Wirkung von C21 auf eine TNF α induzierte IL6-Expression konnte in HPDF durch Inhibition der Serin/Threonin- sowie der Tyrosin-Proteinphosphatasen mit Okadasäure (OA) bzw. mit Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) vollständig aufgehoben werden [P1:Fig.2].

3.4 Arachidonsäuremetabolite als *Second Messenger* von Ang II in der Inflammation

Zur Charakterisierung weiterer an der Signaltransduktion von Ang II beteiligter Mechanismen sollte in diesem Projektteil die mögliche Beteiligung der Cytochrom P450 (CYP450)-abhängigen Arachidonsäuremetabolite 20-Hydroxyepoxyeicosatriensäuren (20-HETE) in der AT1R gekoppelten pro-inflammatorischen und 11,12-Epoxyeicosatriensäuren (EET) in der AT2R vermittelten anti-inflammatorischen Signalkaskade untersucht werden. Die Stimulation von HPDF mit 20-HETE führte zu einem mit Ang II vergleichbaren signifikanten Anstieg des IL6 mRNA-Levels. Im Einklang mit diesem Ergebnis zeigte die Inhibition der CYP-4A/-4F-abhängigen 20-HETE-Synthese mit HET0016 (HET) eine Suppression der Ang II induzierten IL6-Expression [P1:Fig.3B].

Auf der anderen Seite konnte die TNF α induzierte IL6-Expression nur tendenziell durch EET reduziert werden, ein Resultat welches womöglich auf die geringe Stabilität von EET bei einer relativ langen Inkubationszeit von 12h zurückzuführen ist. Dennoch konnte durch Inhibition der CYP-2C/2J-abhängigen EET-Synthese mit PPOH gezeigt werden, dass sich die hemmende Wirkung von C21 durchaus durch Blockade des EET-Metabolismus unterdrücken lässt [P1:Fig.3A].

3.5 Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch direkte AT2R-Stimulation mit Compound 21

Die IL6-Expression wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) reguliert. In HPDF wurde mittels Immunzytologie und Luziferase-Reporter-Assay analysiert, ob NF- κ B auch bei der AT1R vermittelten, vermehrten bzw. AT2R vermittelten, verminderten IL6-Expression als Teil an der Signaltransduktion beteiligt ist.

A.) Immunfluoreszenzfärbung der NF- κ B p50-Untereinheit

Erste Hinweise auf eine direkte Beteiligung des AT1Rs an der Aktivierung und des AT2Rs an der Inhibition von NF- κ B lieferten Translokationsversuche der NF- κ B p50-Untereinheit mittels Fluoreszenzmikroskopie. In unbehandelten Zellen wurde eine Gleichverteilung der p50-Untereinheit in Zytoplasma und Nukleus beobachtet. Ang II hingegen bewirkte einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Zellkern, ein Effekt der sowohl durch AT1R-Blockade mit Irb als auch durch Inhibition der 20-HETE-Synthese mit HET aufgehoben werden konnte, was darauf hindeutet, dass 20-HETE als *Second Messenger* in der AT1R gekoppelten Aktivierung von NF- κ B involviert ist. Die durch TNF α vermittelte nukleäre Translokation von p50 wurde durch Kostimulation mit C21 oder EET unterdrückt. Auch an dieser Stelle führte AT2R-Blockade mit PD oder die Inhibition der EET-Synthese mit PPOH zur Aufhebung des C21 vermittelten Effekts [P1:Fig.S5]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass erstens eine Aktivierung des AT2Rs zu einer verminderten Aktivität von NF- κ B führt und zweitens EET ebenso Einfluss auf die AT2R gekoppelte Hemmung von NF- κ B nimmt.

B.) Luziferase-Reporter-Assay

Zur Quantifizierung der im Zuge der Immunzytologie beobachteten Effekte wurden HPDF mit einem *firefly*-Luziferase-Vektor mit IL6-Promoter mit nativer (wtIL6-pGL3) oder mutierter (mutIL6-pGL3) NF- κ B-Bindungssequenz transfiziert und anschließend stimuliert. In unbehandelten Zellen wurde lediglich eine basale Promoteraktivität detektiert. Dagegen führte die Stimulation mit Ang II zum signifikanten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität (RLA). Auch hier konnte der Effekt von Ang II durch AT1R-Inhibition mit Irb oder

Blockade der 20-HETE-Synthese mit HET unterdrückt werden. 20-HETE alleine übte eine mit Ang II vergleichbare Wirkung aus [P1:Fig.4D,S6], was die Vermutung untermauert, dass 20-HETE an der AT1R vermittelten Induktion von NF- κ B beteiligt ist.

TNF α erzeugte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der RLA, ein Effekt der wiederum durch C21 oder EET reprimiert werden konnte [P1:Fig.4C]. Preinkubation mit dem AT2R-Antagonisten PD oder mit PPOH, dem Inhibitor der EET-Synthese, bewirkte die Aufhebung des C21 induzierten Effekts [P1:Fig.4A,C]. Neben der NF- κ B inhibierenden Wirkung von C21 deuten die beobachteten Effekte darauf hin, dass EET als *Second Messenger* in der AT2R gekoppelten Signalkaskade fungiert.

Da Glucocorticoide ebenso wie C21 die Aktivität von NF- κ B hemmen und dadurch die Synthese von Zytokinen vermindern, sollte die Wirkung von C21 auf die TNF α induzierte RLA mit der Wirkung von Hydrocortison (HC) verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die hemmende Wirkung von C21 auf die IL6-Promoteraktivität durchaus mit dem Effekt von HC vergleichen lässt [P1:Fig.4B].

Die Stimulationen von mutIL6-Zellen, die mit dem IL6-Vektor mit mutierter, inaktiver NF- κ B-Bindungssequenz transfiziert waren, mit Ang II, 20-HETE oder TNF α verliefen ohne nennenswerte Aktivierung des IL6-Promoters, ein weiterer Nachweis dafür, dass es sich bei der Regulation der IL6-Transkription um einen NF- κ B gekoppelten Mechanismus handelt.

3.6 PARP-1 als *upstream* Regulator des AT2Rs

Die Rolle von Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) bei der Regulation des AT2Rs wurde in der humanen Neuroblastomzelllinie Kelly untersucht. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte die Inkubation mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) zum signifikanten Anstieg der AT2R mRNA-Expression [P2:Fig.3A]. Der gleiche Effekt wurde in PARP-1 defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF), jedoch nicht in PARP-1 nativen Zellen detektiert. Diese Beobachtungen konnten auf Proteinebene mittels Immunhistologie untermauert werden. In Kelly-Zellen bewirkte die PARP-Inhibition mit 3-AB eine Akkumulation des AT2Rs an der Zytoplasmamembran. Darüber hinaus zeigten PARP-1 *knockout* MEF, im Gegensatz zu den PARP-1 Wildtyp Zellen, einen generellen Anstieg des AT2Rs im Zytoplasma und Nukleus [P2:Fig.3F].

3.7 Anti-inflammatorische Wirkung direkter AT2R-Stimulation mit Compound 21 *in vivo*

A.) AT2R vermittelte Repression einer Bleomycin induzierten kutanen Inflammation

Im Tiermodell einer Bleomycin induzierten toxischen, kutanen Inflammation wurde der Einfluss direkter AT2R-Stimulation mit C21 auf die IL6, MCP-1 und TNF α mRNA-Expression in weiblichen C3H/He Mäusen analysiert. Nach einer Behandlungszeit von 8 Tagen wiesen die mit Bleomycin behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der kutanen IL6, MCP-1 und TNF α mRNA-Expression auf. Hingegen konnte in den mit C21 behandelten Tieren eine signifikante Repression der Zytokinexpression beobachtet werden [P1:Fig.5A-C].

B.) Hemmung der durch Myokardinfarkt induzierten Inflammation mit Compound 21

Das in dieser Studie verwendete *in vivo* Modell diente der Analyse der anti-inflammatorische Wirkung von AT2R-Stimulation mit C21 nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt (MI) durch permanente Ligatur der Koronararterie in normotensiven Wistar Ratten. Die intraperitoneale Behandlung wurde 24h nach MI begonnen und für einen Zeitraum von 7 Tagen fortgeführt. Die C21 behandelten Tiere zeigten am Ende der Behandlung eine verbesserte Herzfunktion und eine kleinere Infarkt Narbe. Hinsichtlich der Infarkt-assoziierten, inflammatorischen Reaktion erbrachte die Quantifizierung der MCP-1 und Myeloperoxidase (MPO)-Plasmalevel in den Vehikel behandelten MI-Tieren eine signifikante Erhöhung der genannten Marker. Im Gegensatz dazu konnte in der mit C21 behandelten Gruppe ein signifikanter Rückgang des MCP-1 und MPO-Levels verzeichnet

werden [P3:Fig.5A,B]. Die Analyse der IL1 β , IL2 und IL6 mRNA-Expression im Periinfarktgewebe ergab bei der MI-Vehikelgruppe im Vergleich zu den sham-operierten Ratten eine signifikant erhöhte Zytokinexpression. In den mit C21 behandelten Tieren konnte dagegen eine Repression der IL1 β , IL2 und IL6 mRNA-Expression detektiert werden. In diesem Zusammenhang erwies sich die Behandlung mit C21 als ebenso wirkungsvoll, wie die Applikation des AT1R-Blockers Candesartan. Einer weiteren Versuchsgruppe wurde C21 und der AT2R-Antagonist PD appliziert. In diesen Ratten konnte keine supprimierende Wirkung von C21 auf die Zytokin mRNA-Expression gemessen werden [P3:Fig.6A-C].

In den in dieser Studie durchgeführten Stimulationsversuchen in neonatalen Kardiomyozyten der Zelllinie H9C2 konnte ebenso die TNF α induzierte IL6-Expression durch C21 signifikant gehemmt werden. Preinkubation mit dem AT2R-Blocker PD führte, wie auch *in vivo*, zur Unterdrückung des C21 induzierten Effekts [P3:Fig.6D].

4. Diskussion

Inzwischen ist allgemein akzeptiert, dass Angiotensin II (Ang II) nicht nur hämodynamisch relevante Wirkungen zeigt, sondern auch pro-inflammatorisch wirken und damit kardiovaskuläre Endorganschäden auslösen und verschlimmern kann. Diese entzündungsfördernden Wirkungen, die über den AT1-Rezeptor (AT1R) vermittelt werden, kommen z.B. dadurch zustande, dass Ang II den Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) aktiviert und dadurch die Expression von Chemokinen (z.B. *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1), Adhäsionsmolekülen (z.B. *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1) und Zytokinen (z.B. Interleukin (IL) 6) erhöht [1,15].

Im Gegensatz dazu spricht die Mehrheit der vorliegenden Daten für eine anti-inflammatorische Wirkung des AT2-Rezeptors (AT2R) [6-8]. Die Wirkungen des AT2Rs werden bis heute aber teilweise kontrovers diskutiert, und so existieren auch Daten, in denen Ang II über den AT2R zur Aktivierung von NF- κ B und somit zum Anstoß einer pro-inflammatorischen Kaskade führt [16].

Diese widersprüchlichen Daten lassen sich möglicherweise unter anderem darauf zurückführen, dass bis vor einigen Jahren die AT2R-Forschung durch das Fehlen eines spezifischen, selektiven und nicht-peptidischen Agonisten zur gezielten AT2R-Stimulation *in vitro* und *in vivo* erschwert war.

Bis 2004 stellte das Peptid CGP42112A den einzig verfügbaren AT2R-Agonisten dar. Jedoch beeinträchtigten dessen unzureichende *in vivo* Stabilität sowie die zum Teil antagonistischen Eigenschaften die Validität der damit gewonnenen Daten [5]. Viele Studien zur Funktion des AT2Rs wurden daher in AT2R defizienten oder überexprimierenden Tieren oder Zellen durchgeführt. Die hier beobachteten Effekte wiesen in der Regel auf eine gewebeprotective Rolle des AT2Rs hin [9-11].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die anti-inflammatorische Wirkung des AT2Rs mit Hilfe des neuartigen, nicht-peptidischen AT2R-Agonisten Compound 21 (C21) *in vitro* und *in vivo* untersucht. So konnte in Zellkulturexperimenten die Tumornekrosefaktor (TNF) α induzierte IL6, MCP-1 und TNF α mRNA- und Proteinexpression durch Stimulation des AT2Rs mit C21 signifikant reprimiert werden. Auch im *in vivo* Mausmodell einer Bleomycin induzierten kutanen Inflammation bzw. im Herzinfarktmodell in der Ratte führte die Behandlung der Tiere mit C21 zur Reduktion genannter Inflammationsmarker [P1,P3]. In der Myokardinfarktstudie konnte ausgeschlossen werden, dass die anti-inflammatorischen Wirkungen von C21 nur sekundär sind und auf etwaigen hämodynamischen, blutdrucksenkenden Effekten von C21 beruhen, da während der Behandlung mit C21 keine Veränderungen des Blutdrucks auftraten und der Zytokin inhibierende Effekt von C21 ebenso in neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* beobachtet werden konnte, ein Versuchsmodell in dem hämodynamische Effekte naturgemäß nicht auftreten und keine Rolle spielen [P3].

Die Spezifität der Wirkung des AT2R-Agonisten C21 wurde in den hier dargestellten Versuchen mehrfach verifiziert, einerseits durch Hemmung des Effekts von C21 mit dem spezifischen AT2R-Antagonisten PD123319

als auch durch Nachweis der fehlenden Wirkung von C21 in murinen AT2R defizienten Fibroblasten (siehe Versuche in HPDF, MPDF, H9C2 und *in vivo* im Myokardinfarktmodell der Ratte) [P1,P3].

In einer weiteren Serie von Versuchen wurden verschiedene Signaltransduktionsmechanismen des AT2Rs für die Vermittlung der anti-inflammatorischen Effekte charakterisiert.

Als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren beeinflusst NF- κ B die Regulation zahlreicher inflammatorischer Gene, so auch die Expression von IL6, MCP-1 und TNF α . Es war daher nahe liegend zu untersuchen, ob die Stimulation des AT2R über eine Hemmung von NF- κ B zu der in dieser Arbeit beobachteten Expressionshemmung von IL6, MCP-1 und TNF α führt.

Die Induktion von NF- κ B geht mit der Aktivierung des *inhibitory kappa* ($\text{I}\kappa$) B Kinase-Komplexes (IKK) und anschließender Phosphorylierung von $\text{I}\kappa$ B einher. NF- κ B Moleküle werden so von den Inhibitoren freigesetzt und translozieren in den Zellkern, um die Transkription entsprechender Zielgene zu induzieren [17]. Mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen der NF- κ B p50-Untereinheit konnte eine AT2R vermittelte Hemmung der nukleären Translokation von p50 und somit die Inhibition von NF- κ B beobachtet werden. Den quantitativen Nachweis für die AT2R gekoppelte NF- κ B-Blockade und die damit einhergehende Repression der IL6-Transkription lieferten Studien zur Aktivität des IL6-Promoters mittels eines NF- κ B abhängigen Luziferase-Reporter-Assays [P1].

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Stimulation des AT2Rs zur Aktivierung von Phosphatasen führt. Durch die hierdurch induzierten Dephosphorylierungen verschiedenster Zielstrukturen kann der AT2R direkt in Kinase-abhängige Phosphorylierungskaskaden eingreifen, ein Mechanismus der bereits für das ERK- und STAT-*Signalling* sowie für die Hemmung von NF- κ B gezeigt werden konnte (letzteres aber nicht unter Einsatz von C21) [6,8,18]. Auch in dieser Arbeit konnte die AT2R vermittelte, NF- κ B abhängige Hemmung der IL6-Expression durch Inaktivierung sowohl von Tyrosin- als auch von Serin-/Threonin-Phosphatasen aufgehoben werden, was die essentielle Rolle der Aktivierung von Phosphatasen für den anti-inflammatorischen Effekt des AT2R bestätigt [P1].

Ein weiterer Signaltransduktionsweg wurde in dieser Arbeit erstmals in Zusammenhang mit der anti-inflammatorischen Wirkung des AT2Rs beschrieben. Hierbei handelt es sich um die Cytochrom P450-abhängige Epoxidation von Arachidonsäure zu 11,12-Epoxyeicosatriensäuren (EET). EET wurde 1999 in einer *Science*-Publikation als anti-inflammatorischer Mediator identifiziert. Im Zusammenhang mit AT2R vermitteltem *Signalling* wurde EET bisher nur als Vermittler von Vasodilatation beschrieben, nicht jedoch im Zusammenhang mit Wirkungen des AT2Rs auf Inflammationsprozesse [21,23]. Da nach den Ergebnissen dieser Arbeit bereits die AT2R induzierte Hemmung der NF- κ B-Aktivität EET abhängig ist, ist die EET-Synthese in der Sequenz der AT2R gekoppelten Signaltransduktion offensichtlich vor der Hemmung der NF- κ B-Aktivität anzusiedeln [P1].

Die Aktivitätshemmung von NF- κ B ist der grundlegende Wirkmechanismus der Glucocorticoide. Da auch die pharmakologische Stimulation des AT2R zu einer NF- κ B-Blockade führt, sollte im Hinblick auf eine zukünftige, therapeutische Verwendung des AT2R-Agonisten C21 geklärt werden, ob die NF- κ B-Hemmung durch C21 vergleichbar ist mit der durch ein Glucocorticoid. In der Tat erwies sich die Stimulation mit C21 hinsichtlich der Hemmung der NF- κ B abhängigen IL6-Promoteraktivität als vergleichbar effektiv wie der Effekt von Hydrocortison [P1].

Glucocorticoide sind klassische Entzündungshemmer, die bei zahlreichen, mit erhöhter NF- κ B-Aktivität assoziierten Erkrankungen, insbesondere bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden. Allerdings ist vor allem die chronische Applikation von Glucocorticoiden mit einer hohen Rate von schweren Nebenwirkungen assoziiert. Daher wird seit Jahren nach neuen Wirkstoffen mit ähnlich guter anti-inflammatorischer bzw. immunsuppressiver Wirkung, aber weniger starken Nebenwirkungen gesucht. Aufgrund der NF- κ B/IL6 inhibierenden Eigenschaften könnte man C21 als solch einen Kandidaten ansehen, jedoch

sicherlich nicht als vollwertigen Ersatz für Glucocorticoide, sondern bestenfalls in Situationen, in denen heutzutage eine niedrigdosierte Glucocorticoidtherapie indiziert wäre.

Auch für AT1R-Blocker (ARB) sind in der Literatur entzündungshemmende Effekte beschrieben, weshalb sich die Frage stellt, ob und wie sich die pharmakologische Interferenz mit dem RAS durch AT2R-Stimulation bzw. durch ARBs unterscheidet, zumal man insbesondere bei den anti-entzündlichen, gewebeprotectiven Effekten von ARBs davon ausgeht, dass diese zumindest teilweise über indirekte Stimulation des nicht-blockierten AT2Rs durch die ARBs induzierten erhöhten Ang II-Spiegel zustande kommen [25,26].

In der Tat unterscheiden sich die anti-entzündlichen Effekte von ARBs und AT2R-Agonisten in vielerlei Hinsicht.

Zum einen ist *in vivo* die Konzentration von Ang II unter AT1R-Blockade etwa 1000- bis 10000-fach geringer als die von C21, welches mit gleicher Affinität an den AT2R bindet wie Ang II (14). Man kann also von einer deutlich stärkeren Stimulation durch C21 als indirekt durch einen ARB ausgehen.

Des Weiteren wirken ARBs in der Regel (und im Gegensatz zu AT2R-Agonisten) nicht direkt anti-entzündlich, sondern nur dann, wenn erhöhte Ang II-Spiegel vorliegen, deren pro-inflammatorische Wirkung dann durch ARBs gehemmt wird. *In vivo* kommt dieser Mechanismus allerdings sehr häufig zum Tragen, da Gewebedefekte und inflammatorische Reaktionen in der Regel zu einer Aktivierung des RAS mit erhöhten Ang II-Spiegeln führen. Man kann daher die Frage, ob ARBs direkt, also Ang II unabhängig, anti-entzündlich wirken zuverlässig nur *in vitro* testen. Entsprechende Versuche wurden sowohl in dieser Arbeit als auch in einer Publikation von Tian *et al.* durchgeführt [27]. Hierbei wurde zwischen *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) γ stimulierenden (Irbesartan, Telmisartan) und -nicht-stimulierenden (Losartan, Valsartan) ARBs unterschieden. Sowohl in dieser Studie als auch in der von Tian *et al.* stellte sich heraus, dass nur die PPAR γ -aktivierenden ARBs eine Repression der TNF α induzierten IL6-Expression bewirken [P1] [27]. Laut den Daten von Tian *et al.* beruht die anti-entzündliche Wirkung von PPAR γ auf einer Interaktion mit NF- κ B, wodurch es zu einer Hemmung von NF- κ B kommt.

Es sei noch herausgestellt, dass im Gegensatz dazu die AT2R-Stimulation mit C21 zu einer direkten, Ang II unabhängigen NF- κ B-Hemmung führt.

Einen Teil der Arbeit umfasste die Identifikation von Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) als einen *upstream* Regulator des AT2Rs [P2]. Da die Expression des AT2Rs perinatal bzw. unter pathophysiologischen Bedingungen starken Schwankungen unterliegt, ist die Kenntnis regulatorischer Mechanismen von großer Wichtigkeit. PARP-1 könnte ein solcher Regulator sein. Für die akute Expressionsminderung des AT2Rs durch Alkoholtoxizität konnte bereits gezeigt werden, dass PARP-1 in der Tat maßgeblich an der Regulation beteiligt ist [29].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit die agonistischen Eigenschaften sowie die Spezifität und Selektivität von C21 für den AT2R bestätigt wurden. Damit stand eine neuartige Substanz, der erste nicht-peptidische AT2R-Agonist, zur Verfügung, um durch direkte Rezeptorstimulation die Rolle des AT2Rs bei inflammatorischen Prozessen zu untersuchen. Die Versuche dieser Arbeit zeigten, dass der AT2R über die Expressionshemmung von Zytokinen anti-inflammatorisch wirkt, wobei diese Zytokinrepression über die Aktivierung von Phosphatasen und die vermehrte Synthese von EET vermittelt wird, die schließlich zu einer Aktivitätshemmung von NF- κ B führen. Der anti-inflammatorische Effekt des AT2R war *in vitro* und *in vivo* zu beobachten, und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei gewebeprotectiven Effekten des AT2Rs wie z.B. bei der Verbesserung der Herzfunktion in Ratten nach Herzinfarkt.

Literaturverzeichnis

- 1 Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O. et al. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:881-900.
- 2 de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T. et al. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:415-472.
- 3 Savoia C, Tabet F., Yao G. et al. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2005;23(5):1037-45.
- 4 Kurisu, S., Ozono, R., Oshima, T. et al. Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension.* 2003;41(1):99-107.
- 5 Stoll M, Steckelings UM, Paul M. et al. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95:651-657.
- 6 Wu L, Iwai M, Li Z. et al. Regulation of inhibitory protein-kappa B and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal vascular smooth muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2004;18:666-678.
- 7 Tani T, Ayuzawa R, Takagi T. et al. Angiotensin II bi-directionally regulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;315:185-193.
- 8 Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M. et al. Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT₁ and AT₂ receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res.* 1999;84:876-882.
- 9 Iwai M, Liu HW, Chen R. et al. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation.* 2004;110:843-848.
- 10 Bove CM, Gilson WD, Scott CD. et al. The angiotensin II type 2 receptor and improved adjacent region function post-MI. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2005;7:459-464.
- 11 Iwai M, Chen R, Li Z, et al. Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2005;112:1636-1643.
- 12 Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P. et al. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med.* 1998;188:661-670.
- 13 Gallinat S, Busche S, Raizada MK, and Summers C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278:357-374.
- 14 Wan Y, Wallinder C, Plouffe B. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J Med Chem.* 2004;47:5995-6008.
- 15 Li J, Doerffel Y, Berthold B, and Unger T. Inflammation in the genesis of hypertension and its complications—the role of angiotensin II. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:3107–3109.
- 16 Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V. et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:16-20.
- 17 Viatour P, Merville M-P, Bours V, and Chariot A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(1):43-52.

- 18 Tsuzuki S, Matoba T, Eguchi S. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatases. *Hypertension*. 1996;28:916-918.
- 19 Nishimoto N, and Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:619-622.
- 20 D'Acquisto F, May MJ, and Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): An emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv*. 2002;2:22-35.
- 21 Node K, Huo Y, Ruan X. et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285:1276-1279.
- 22 Ishizuka T, Cheng J, Singh H, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324:103-10.
- 23 Kroetz DL, and Xu F. Regulation and inhibition of arachidonic acid ω -hydroxylases and 20-HETE formation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:413-438.
- 24 Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. 2002;82:131-85.
- 25 Okada H, Watanabe Y, Inoue T. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates renal fibrogenesis in an immune-mediated nephritic kidney through counter-activation of angiotensin II type 2 receptor. *BBRC*. 2004;314:403-408.
- 26 Okada H, Inoue T, Kikuta T. et al. A Possible Anti-Inflammatory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Immune-Mediated Glomerulonephritis during Type 1 Receptor Blockade. *Am J Pathol*. 2006;169:1577-1589.
- 27 Tian Q, Miyazaki R, Ichiki R. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 expression by telmisartan through cross-talk of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma with nuclear factor kappaB and CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Hypertension*. 2009;53(5):798-804
- 28 Jagtap G, and Szabo C. Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev*. 2005;4:421-40.
- 29 Menk M, von Haefen C, Funke-Kaiser H, Sifringer M, Scheffe JH, Kirsch S, Seidel K, Reinemund J, Steckelings UM, Unger T, Spies CD. Ethanol-induced downregulation of the angiotensin AT2 receptor in murine fibroblasts is mediated by PARP-1. *Alcohol*. 2010 Sep;44(6):495-506

Anteilerklärung und ausgewählte Publikationen

Publikation 1

Journal: Hypertension. 2010 Apr;55 (4):924-31 (IF₂₀₁₀ 6,614)

Titel: Direct Angiotensin AT2-receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxy eicosatrienoic acid and inhibition of NF-κB

Autoren: Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck W-H, Unger T, Steckelings UM

Anteilerklärung: Die Experimente dieser Publikation wurden zu 80% vom Promovenden durchgeführt. Die konzeptionelle Planung dieses Projektes sowie die Anfertigung des Manuskriptes wurden arbeitsteilig mit dem Letztautor durchgeführt. [Gesamt-Arbeitsanteil: 60%]

Publikation 2

Journal: Biochemical Pharmacology. 2009 Jun 15;77(12):1795-805 (IF₂₀₀₉ 4.254)

Titel: Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes

Autoren: Reinemund J, Seidel K, Steckelings UM, Zaade D, Klare S, Rompe F, Katerbaum M, Schacherl J, Li Y, Menk M, Schefe JH, Goldin-Lang P, Szabo C, Olah G, Unger T, Funke-Kaiser H

Anteilerklärung: Der Arbeitsanteil des Promovenden dieser Publikation bestand in der experimentellen Durchführung der Immunhistologie sowie der Anfertigung der für das Manuskript benötigten Zusammenfassung dieses Versuchsabschnitts. [Gesamt-Arbeitsanteil: 8%]

Publikation 3

Journal: Circulation. 2008 Dec 9;118(24):2523-32 (IF₂₀₀₈ 14.595)

Titel: AT2-receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin-system in myocardial infarction?

Autoren: Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf C, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, and Steckelings UM

Anteilerklärung: In dieser Publikation war der Promovend maßgeblich an der Planung sowie Durchführung der *in vitro* Experimente verantwortlich. [Gesamt-Arbeitsanteil: 8%]

PUBLIKATION 1

Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck W-H, Unger T, Steckelings UM

Direct Angiotensin AT₂-receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of NF- κ B

Hypertension. 2010 Apr;55 (4):924-31.

PUBLIKATION 2

Reinemund J, Seidel K, Steckelings UM, Zaade D, Klare S, Rompe E, Katerbaum M, Schacherl J, Li Y,
Menk M, Schefe JH, Goldin-Lang P, Szabo C, Olah G,
Unger T, Funke-Kaiser H

**Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)
transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and
AT2R binding protein (ATBP) genes**

Biochemical Pharmacol. 2009 Jun 15;77(12):1795-805

PUBLIKATION 3

Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf C, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, and Steckelings UM

AT2-receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin-system in myocardial infarction?

Circulation. 2008 Dec 9;118(24):2523-32

Der Lebenslauf wurde für die Veröffentlichung entfernt.

Komplette Publikationsliste*Peer-Reviewed Journals***2010**

Rompe F, Unger T, Steckelings UM. The AT2R in inflammation. Drug News Perspect. 2010 Mar;23(2):104-11. Review.

Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, Reichenbach A, Schacherl J, Dahlöf B, Bader M, Alenina N, Schwaninger M, Zuberbier T, Funke-Kaiser H, Schmidt C, Schunck W-H, Unger T, Steckelings UM. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. Hypertension. 2010 Apr;55 (4):924-31.

Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Namsolleck P, Grzesiak A, Funke-Kaiser H, Bader M, Unger T. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2010 Mar;11(1):67-73. Review.

2009

Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, Unger T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease – moving from macrovascular to microvascular targets. Fundam Clin Pharmacol. 2009;23(6):693-703. Review.

Reinemund J, Seidel K, Steckelings UM, Zaade D, Klare S, Rompe F, Katerbaum M, Schacherl J, Li Y, Menk M, Schefe JH, Goldin-Lang P, Szabo C, Olah G, Unger T, Funke-Kaiser H. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes. Biochemical Pharmacol. 2009 Jun 15;77(12):1795-805.

2008

Kaschina E, Grzesiak A, Li JM, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz R, Curato C, Namsolleck P, Tschöpe C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf C, Dahlöf B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. AT2-receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin-system in myocardial infarction? Circulation. 2008 Dec 9;118(24):2523-32.

2006

Priebsch A, Rompe F, Tonnies H, Kowalski P, Surowiak P, Stege A, Materna V, Lage H. Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. Oligonucleotides. 2006 Fall;16(3):263-74.

Kongressbeiträge**2009**

14th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research, OCT 09-11, 2009 Nice, FRANCE (Vortrag)

Rompe F, Santi F, Stroder K, et al. Angiotensin AT2 receptor stimulation or AT1 receptor blockade act anti-inflammatory and anti-fibrotic in a mouse model of scleroderma. HYPERTENSION Volume:54 Issue:5 Pages:1165-1165 Published:NOV 2009

2008

13th Annual Meeting of the European-Council-for-Cardiovascular-Research, OCT 10-12, 2008 Nice, FRANCE (Poster)

Rompe F, Hallberg A, Altermann M, et al. The first selective non-peptide angiotensin AT2-receptor agonist Compound 21 attenuates TNF alpha-induced IL-6 expression through inhibition of NF-kappa B activity and activation of phosphatases. HYPERTENSION Volume:52 Issue:4 Pages:772-772 Published:OCT 2008

18th Scientific Meeting of the European-Society-of-Hypertension/22nd Scientific Meeting of the International-Society-of-Hypertension, JUN 14-19, 2008 Berlin, GERMANY (Poster)

Rompe F, Hallberg A, Alterman M, et al. Title: The first selective non-peptide angiotensin AT2-receptor agonist Compound 21 attenuates TNF alpha-induced IL-6 expression through inhibition of NF-kappa B activity. JOURNAL OF HYPERTENSION Volume:26 Pages:S365-S365 Supplement: Suppl. 1 Published:JUN 2008

18th Scientific Meeting of the European-Society-of-Hypertension/22nd Scientific Meeting of the International-Society-of-Hypertension, JUN 14-19, 2008 Berlin, GERMANY (Poster)

Stroder K, Rompe F, Reichenbach A, et al. Direct angiotensin AT2 receptor stimulation by the novel non-peptide agonist Compound 21 acts anti-inflammatory and anti-fibrotic in a mouse model of scleroderma. JOURNAL OF HYPERTENSION Volume:26 Pages:S369-S369 Supplement:Suppl.1 Published:JUN 2008

18th Scientific Meeting of the European-Society-of-Hypertension/22nd Scientific Meeting of the International-Society-of-Hypertension, JUN 14-19, 2008 Berlin, GERMANY (Poster)

Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et al. 20-HETE and EET are second messengers of angiotensin II in inflammation: In vitro studies using the novel AT2-receptor agonist Compound 21. JOURNAL OF HYPERTENSION Volume:26 Pages:S526-S526 Supplement:Suppl.1 Published:JUN 2008

2007

Conference Information: 12th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research, OCT 12-14, 2007 Nice, FRANCE (Poster)

Rompe F, Hallberg A, Artuc M, et al. Direct angiotensin AT2R stimulation by the specific non-peptide agonist compound 21 acts anti-inflammatory in vitro by reducing NF-kappa B activity. HYPERTENSION Volume:50 Issue:4 Pages:809-809 Published:OCT 2007

17th European Meeting on Hypertension, JUN 15-19, 2007 Milan, ITALY (Vortrag)

Rompe F, Hallberg A, Fandriks L, et al. Angiotensin II and inflammation: Studies on AT1 and AT2-receptor coupled signalling using the novel non-peptide AT2-receptor agonist compound 21. JOURNAL OF HYPERTENSION Volume: 25 Pages: S12-S12 Supplement: Suppl. 2 Published: JUN 2007

2006

Day of Science, DEC, 2006 Berlin GERMANY (Vortrag)

Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et. al. Arachidonic acid metabolites as second messengers of Angiotensin II in inflammation: studies using the novel AT2-receptor agonist Compound 21

11th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Reseach, SEP 29-OCT 01, 2006 Nice, FRANCE (Poster)

Steckelings UM, Rompe F, Artuc M, et al. Angiotensin II and inflammation: Studies on AT1- and AT2-receptor coupled signalling using the novel non-peptide AT2-receptor agonist compound 21. HYPERTENSION Volume:48 Issue:4 Pages:766-766 Published:OCT 2006

21st Scientific Meeting of the International-Society-of-Hypertension/5th Asian-Pacific Congress of Hypertension/29th Annual Scientific Meeting of the Japanese-Society-of-Hypertension, OCT 15-19, 2006 Fukuoka, JAPAN (Vortrag)

Steckelings UM, Rompe F, Reinemund J, et al. Direct angiotensin AT2 receptor stimulation by the specific agonist compound 21 acts anti-inflammatory by inhibition of TNF-alpha induced IL-6 expression. JOURNAL OF HYPERTENSION Volume:24 Pages:37-37 Supplement:Suppl.6 Published: DEC 2006

Gordon Research Conference on Angiotensin 2006- SEP 10-15, 2006 Aussois, FRANCE (Vortrag)

Rompe F, Steckelings UM, Artuc M, et al. Angiotensin II and inflammation: Studies on AT1- and AT2-receptor coupled signalling using the novel non-peptide AT2-receptor agonist compound 21.

16th European Meeting on Hypertension, JUN 12-15, 2006 Madrid, SPAIN (Vortrag)

Rompe F, Steckelings UM, Reinemund J, et al. Direct angiotensin AT2 receptor stimulation by the specific agonist compound 21 acts anti-inflammatory by inhibition of TNF-alpha induced IL-6 expression. JOURNAL OF HYPERTENSION Volume:24 Pages:S296-S296 Supplement:Suppl.4 Published:JUN 2006

16th European Meeting on Hypertension- Young Investigator`s Meeting, JUN 12-15, 2006 Madrid, SPAIN (Vortrag)

Rompe F, Steckelings UM, Unger T. et al. Are Arachidonic Acid Metabolites Second Messengers of Angiotensin II in Inflammation?

5th Meeting of the Endocrine-Dermatology-Group of the Arbeitsgemeinschaft-Dermatologische-Forschung, MAR 22, 2006 Univ Hop Aachen, Aachen, GERMANY (Poster)

Steckelings UM, Rompe F, Reinemund J, et al. Bidirectional modification of IL-6 expression by angiotensin II in human dermal fibroblasts. EXPERIMENTAL DERMATOLOGY Volume:15 Issue:8 Pages:646-646 Published:AUG 2006

Erklärung

„Ich, Franziska Hartge, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Die Rolle des Angiotensin AT2-Rezeptors bei der Inflammation: in vitro und in vivo Studien unter Verwendung des neuartigen AT2-Rezeptor Agonisten Compound 21“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 3. April 2011 28.07.2011

Franziska Hartge

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei den Menschen ganz herzlich bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und maßgeblich zum Gelingen meines Promotionsvorhabens beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Ulrike Steckelings – Muscha – für die sehr interessante Themenstellung bedanken, für das große Vertrauen, dass Sie mir stets entgegengebracht hat, für Ihren Zuspruch auch größere Hürden in Angriff zu nehmen und Ihre Unterstützung diese zu überwinden. Vielen Dank für eine sehr lehrreiche, aber auch sehr schöne Zeit.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Thomas Unger danke ich für die Möglichkeit, die Forschungsarbeiten am Center for Cardiovascular Research (CCR), Institut für Pharmakologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin durchzuführen, sein beständiges Interesse an der Arbeit und seine Anregungen bei kleineren und größeren Problemen.

Ebenfalls möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Unger und Prof. Kintscher für die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen – im Labor oder nach Feierabend – sowie die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Eine unvergessliche Zeit die ich nicht missen möchte und aus der auch die ein oder andere engere Freundschaft entstanden ist.

Meine letzten Dankesworte richten sich an meine Freunde und Familie. Ganz besonders danke ich meinen Eltern für Ihre uneingeschränkte Unterstützung zu jedem Zeitpunkt. Martin, Dir danke ich für dein Vertrauen in meine Fähigkeiten, deinen Humor und stetige Motivation. Danke, dass Du immer für mich da bist.