

Aus dem
Charité Centrum für Therapieforschung
Institut für Pharmakologie / Center for Cardiovascular Research
Direktor: Professor Dr. Thomas Unger

Habilitationsschrift

Der Angiotensin AT2-Rezeptor: Untersuchungen zu Expression, physiologischen Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Pharmakologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Ulrike Steckelings
geboren am 21. Dezember 1961 in Issum-Sevelen

Eingereicht: April 2011

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Wenzel / Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2. Gutachter: Prof. Dr. Lutz Hein / Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Das Renin-Angiotensin-System	5
1.2	Der AT2-Rezeptor	7
1.2.1	Die Struktur des AT2-Rezeptors	7
1.2.2	Die Expression des AT2-Rezeptors	7
1.2.3	Die Signaltransduktion des AT2-Rezeptors	8
1.2.4	Die physiologischen und patho-physiologischen Wirkungen des AT2-Rezeptors	9
1.2.5	Der AT2-Rezeptor Agonist Compound 21	11
2.	Zielsetzung	13
3.	Eigene Arbeiten	14
3.1	Die Expression des AT2-Rezeptors unter physiologischen und patho-physiologischen Bedingungen	14
3.1.1	Publikation 1: Die Expression des AT2-Rezeptors in humaner Haut	14
3.1.2	Publikation 2: Die Expression des AT2-Rezeptors im Bereich kutaner Wunden	15
3.2	Physiologische Funktionen des AT2-Rezeptors	16
3.2.1	Publikation 3: Der AT2-Rezeptor wirkt anti-proliferativ auf Endothelzellen	16
3.2.2	Publikation 4: Der AT2-Rezeptor hemmt die Proliferation und fördert die Differenzierung von Zellen neuronalen Ursprungs	17
3.3	AT2-Rezeptor-Stimulation als neues therapeutisches Prinzip	18
3.3.1	Publikation 5: Die direkte, pharmakologische Stimulation des AT2-Rezeptors verbessert die kardiale Funktion nach Herzinfarkt	18
3.3.2	Publikation 6: Direkte AT2-Rezeptor Stimulation wirkt anti-inflammatorisch über die Synthese von Epoxyeicosatriensäure und Hemmung von NF- κ B	19
4.	Diskussion	20
4.1	Die Expression des AT2-Rezeptors unter physiologischen und patho-physiologischen Bedingungen	21
4.2	Physiologische Funktionen des AT2-Rezeptors	22
4.3	AT2-Rezeptor-Stimulation als neues therapeutisches Prinzip	25

5. Zusammenfassung	30
6. Literaturangaben aus freiem Text	32
7. Danksagung	40
8. Erklärung	43

Abkürzungen

A:	A-Welle (entspricht der spätdiastolischen aktiven LV-Füllung)
ACE:	Angiotensin Konversionsenzym (<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>)
ACE2:	Angiotensin Konversionsenzym 2 (<i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i>)
Ang II:	Angiotensin II
Ang 1-7:	Angiotensin 1-7
ARDS:	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
AT1R:	AT1-Rezeptor
AT2R:	AT2-Rezeptor
ATBP:	<i>AT2-receptor binding protein</i>
ATIP:	<i>AT2-receptor interacting protein</i>
BDNF:	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
CGP42112A:	Peptidischer AT2-Rezeptor Agonist
C21:	Compound 21 – nicht-peptidischer AT2-Rezeptor Agonist
CYP:	Cytochrom P450
dP/dt _{max} :	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt _{min} :	minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit
E:	E-Welle (entspricht der frühdiaastolischen, passiven LV-Füllung)
EF:	Ejektionsfraktion
bFGF:	<i>Basic fibroblasts growth factor</i>
EDT:	E-Wellen-Abfallsgeschwindigkeit
EGF:	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
I κ B α :	Inhibitorisches κ B-Protein α
I κ B β :	Inhibitorisches κ B-Protein β
IL-6:	Interleukin 6
Jak:	Januskinase
kDa:	kiloDalton
KME:	Koronare mikrovaskuläre Endothelzellen
LV:	linker Ventrikel
LVIDd:	diastolischer, linksventrikulärer, innerer Durchmesser
LVIDs:	systolischer, linksventrikulärer, innerer Durchmesser
M24:	ursprüngliche Bezeichnung für Compound 21

MasR:	Mas-Rezeptor (Rezeptor für Ang 1-7)
MCP-1:	<i>Macrophage chemoattractant protein 1</i>
MKP-1:	<i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1</i>
MRT:	Magnetresonanztomographie
Mtus 1:	Mitochondriales Tumor-Suppressor-Gen 1
NF- κ B:	<i>Nuclear factor-κB</i>
NGF:	<i>Nerve Growth Factor</i>
PD123319:	AT2-Rezeptor Antagonist
PD123177:	AT2-Rezeptor Antagonist
PLZF:	<i>Proteolytic leukemia zinc finger</i>
PP2A:	Protein Phosphatase 2A
RAS:	Renin-Angiotensin System
mRNA:	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
RT-PCR:	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SHP-1:	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1</i>
STAT:	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Th8:	8. Brustwirbel
TNF α :	Tumor-Nekrosefaktor alpha
TrkA:	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>
TrkB:	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2</i>
VSMC:	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
VSP:	Ventrikulärer systolischer Druck (<i>ventricular systolic pressure</i>)

1. Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) gehört zu den phylogenetisch ältesten hormonellen Systemen. Auch die Geschichte seiner wissenschaftlichen Entdeckung und Beschreibung reicht weit zurück. Bereits im Jahre 1896 beobachteten Robert Tigerstedt und Per Bergman, dass man durch Injektion von Homogenaten einer Kaninchenniere in ein anderes Kaninchen eine Blutdrucksteigerung auslösen kann. Tigerstedt und Bergman vermuteten eine blutdrucksteigernde Substanz in der Niere und nannten diese Substanz nach ihrem Ursprung „Renin“ (1).

Bis zur weiteren Aufklärung der Synthesekaskade von Angiotensin II vergingen mehr als 50 Jahre. Essentiell hierfür war die Erkenntnis, dass nicht Renin selbst ein blutdrucksteigerndes Peptidhormon ist, sondern ein Enzym, durch das das eigentliche blutdruckaktive Hormon (damals Hypertensin oder Angiotonin genannt) von seinem Vorläufermolekül abgespalten wird. Diese wichtige Beobachtung wurde zeitgleich und unabhängig voneinander von der Gruppe um Eduardo Braun-Menedez in Buenos Aires und von der Gruppe um Irvine H. Page in Indianapolis gemacht (2-4). Allerdings war das Produkt aus der Spaltung von Angiotensinogen durch Renin noch nicht das eigentlich wirksame Hypertensin/Angiotonin. Den letzten, fehlenden Puzzlestein zur Identifizierung der kompletten Synthesekaskade lieferte erst 1956 die Gruppe um Leonard T. Skeggs, die erstmals das „Angiotensin-Konversionsenzym“ (*angiotensin converting enzyme*: ACE) beschrieb, das durch Abspaltung von zwei Aminosäuren das inaktive, heute Angiotensin I genannte Zwischenprodukt in das aktive Hypertensin/Angiotonin konvertiert (5). In einer 1958 einberufenen Konsensus-Konferenz einigte man sich schließlich auf einen einheitlichen, noch heute verwendeten Terminus für Hypertensin/Angiotonin und bezeichnet seither das Effektorhormon des RAS als „Angiotensin II“ (6).

Bereits zu dieser Zeit wurde über eine pharmakologische Intervention mit dem RAS zur Behandlung der Hypertonie nachgedacht. Leonard Skeggs schrieb 1957 in visionärer Weise: *„Since hypertensin has been found in the blood of many human beings with hypertensive cardiovascular disease as well as in animals with experimental renal hypertension it is of great interest to discover a method of preventing its action in vivo. (...) Three separate methods appear feasible. First, it might be possible to prepare structural analogs of hypertensin II capable of interfering with the vasoconstrictor reaction. Second, the conversion of hypertensin I to*

hypertensin II might be prevented by compounds inhibiting the hypertension converting enzyme. Finally, the production of hypertensin I from renin substrate might be prevented by the inhibition of renin." (7). Er prophezeite damit die Entwicklung der heute vielseitig in der kardiovaskulären Medizin verwendeten Angiotensin AT1-Rezeptor Blocker ("*structural analogs for interfering with the vasoconstrictor action*"), von ACE-Hemmern ("*prevention of conversion from hypertensin I to hypertensin II*") und von Renin-Inhibitoren ("*inhibition of renin*").

Das Renin-Angiotensin-System wurde zunächst als zirkulierendes, endokrines System beschrieben, wobei Angiotensinogen im Wesentlichen aus der Leber freigesetzt wird. Renin wird aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere sezerniert und spaltet Angiotensinogen im Plasma zu Angiotensin I. Angiotensin I wird schließlich durch endothelständiges ACE hauptsächlich in der Lunge zu Angiotensin II (Ang II) konvertiert (8). Anfang der 1970er Jahre stellte man jedoch fest, dass auch viele Organe und Gewebe ein komplettes Renin-Angiotensin-System, d.h. alle zur Ang II Synthese notwendigen Faktoren, exprimieren und so zu einer lokalen, von der Zirkulation unabhängigen Ang II Synthese fähig sind (9,10). Der initiale Schritt für die Entdeckung der lokalen Renin-Angiotensin-Systeme war der unerwartete Nachweis des „Nieren-Enzyms“ Renin im Gehirn (9). Inzwischen wurden lokale Renin-Angiotensin-Systeme für fast alle Gewebetypen beschrieben (10). Unsere eigene Gruppe konnte ein lokales Renin-Angiotensin-System erstmals in humaner Haut nachweisen (11: Publikation 1).

Das Jahr 1989 brachte mit dem Beweis der Existenz von mehr als einem Rezeptor-Subtypen für Ang II einen weiteren Durchbruch im Verständnis des RAS (12-14). Für die zwei zuerst identifizierten und bis heute am besten charakterisierten Rezeptor-Subtypen einigte man sich auf die Nomenklatur Angiotensin AT1-Rezeptor (AT1R) bzw. Angiotensin AT2-Rezeptor (AT2R) (15,16).

Bis zu diesem Zeitpunkt war die Sicht auf das RAS geprägt durch seine ursprüngliche Beschreibung als blutdrucksteigerndes System. Man hatte aber inzwischen festgestellt, dass Ang II darüber hinaus eine Reihe von Wirkungen hat, die unabhängig von seinen Effekten auf den Blutdruck sind und z.B. in einer Steigerung der Zellproliferation oder -hypertrophie, in Fibrose oder inflammatorischen Reaktionen bestehen und damit zusätzlich zu der rein blutdrucksteigernden Wirkung

zu hypertensivem und diabetischem Endorganschaden beitragen (15,16). Bis heute werden mit dem RAS primär diese Wirkungen assoziiert, die alle über den AT1-Rezeptor vermittelt werden (15,16).

1.2 Der AT2-Rezeptor

1.2.1 Die Struktur des AT2-Rezeptors

Der Angiotensin AT2-Rezeptor gehört zwar wie der AT1R zur Familie der Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, unterscheidet sich aber in vielerlei Hinsicht – strukturell, bezüglich des Expressionsmusters und funktionell - vom AT1R. So binden zwar beide Rezeptoren den natürlichen Liganden Ang II mit annähernd gleicher Affinität, die Sequenzhomologie zwischen den Rezeptoren beträgt aber nur etwa 34 Prozent, wobei sich die Rezeptoren vor allem im hydrophoben, transmembranären Bereich ähneln (16). Das AT2R Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und besteht aus drei Exons, wovon das dritte Exon die gesamten kodierenden Sequenzen enthält (16,17), welche ein Protein von 363 Aminosäuren kodieren. Lokalisation des Gens und Molekülgröße des Proteins sind bei Mensch, Maus und Ratte identisch. Die Aminosäure-Sequenzen von Maus und Ratte zeigen jeweils eine ca. 92prozentige Übereinstimmung mit der des humanen AT2-Rezeptors. Die große Diversität im Molekulargewicht des AT2R (60-140 kDa) ist vermutlich auf unterschiedliche Grade der Glykosylierung zurückzuführen (18).

1.2.2 Die Expression des AT2-Rezeptors

Im adulten Organismus ist – unabhängig von der Spezies – der AT2R weit geringer exprimiert als der AT1R (16). In den frühen Jahren der AT2R-Forschung wurde sogar angenommen, dass die meisten Gewebe ausschließlich AT1R besitzen. Dank der Entwicklung von Detektionsmethoden mit größerer Sensitivität wurde diese Ansicht allerdings inzwischen revidiert und der AT2R in der überwiegenden Anzahl an Geweben nachgewiesen – wenn auch in der Regel in sehr geringer Expressionsdichte.

Während der embryonalen Entwicklung stellt sich das Verhältnis von AT1R zu AT2R völlig anders dar: der AT2R ist im gesamten, embryonalen Organismus in hoher Dichte zu finden und stärker exprimiert als der AT1R (16,19). Aus diesem Expressionsmuster schloss man, dass der AT2R eine wichtige Rolle während der

Embryonalentwicklung spielen müsste. Bis heute ist die Rolle des AT2R bei der Embryogenese aber rein hypothetisch geblieben; man weiß nicht wirklich, welche Funktion dem AT2R bei der embryonalen Entwicklung zukommt bzw. ob es eine solche Funktion wirklich gibt. Zweifel an der Hypothese resultieren z.B. aus der Beobachtung, dass Mäuse mit genetischer Deletion des AT2R sich weitgehend normal entwickeln, so dass eine essentielle Rolle für die Organogenese ausgeschlossen werden kann (20,21).

Interessanterweise kommt es im adulten Organismus bei einer Schädigung von Gewebe zu einer Re-Expression des AT2Rs. Dies wurde für zahlreiche Formen der Gewebeschädigung gezeigt wie z.B. nach kardialer (22,23) oder zerebraler (24) Ischämie, bei Herzhypertrophie (25), –fibrose (26) oder –insuffizienz (27), bei chronischen Nierenerkrankungen (28), bei Verletzung peripherer Nerven (29), bei Gefäßschädigung (30) oder, wie von unserer Gruppe beschrieben, bei Verletzungen der Haut (31: Publikation 2).

1.2.3 Die Signaltransduktion des AT2-Rezeptors

Bezüglich der Signaltransduktionsmechanismen unterscheiden sich die Angiotensin-Rezeptor-Subtypen grundlegend. Während der AT1-Rezeptor ein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist, scheint der AT2-Rezeptor seine Effekte primär über andere Bindungsproteine zu vermitteln. Eine G-Protein-Kopplung des AT2-Rezeptors an inhibierende G-Proteine wurde zwar ebenfalls beschrieben (32,33), es wurde aber nie gezeigt, dass diese G-Protein-Kopplung für irgendeine Wirkung des AT2Rs essentiell ist (34).

Bindungsproteine, die bisher als wichtig für die Signaltransduktion des AT2-Rezeptors erkannt wurden, sind das AT2-Rezeptor Bindungsprotein (ATBP; auch als ATIP [AT2-receptor interacting protein] oder Mtus 1 [mitochondrial tumor suppressor gene 1] beschrieben) (35-37), die Tyrosinphosphatase SHP-1 (38) sowie der Transkriptionsfaktor PLZF (proteolytic leukemia zinc finger) (39).

ATBP, das unabhängig von seiner Rolle als AT2R-Bindungsprotein auch als Tumor-Suppressor-Gen beschrieben wurde, scheint wichtig zu sein für den anti-proliferativen Effekt des AT2-Rezeptors (35-37), darüber hinaus aber auch für den Transport des AT2Rs zur Zellmembran (35).

Die Aktivierung der Tyrosinphosphatase SHP-1 durch Stimulation des AT2Rs bewirkt die Dephosphorylierung verschiedenster Zielstrukturen, wodurch der AT2R mit

unterschiedlichen, Kinase-getriebenen Signaltransduktionskaskaden wie z.B. mit der Signaltransduktion des Angiotensin AT1Rs, aber auch von Wachstumsfaktoren oder von Zytokinen interagiert (38,40,41).

So hemmt die AT2R-Stimulation beispielsweise den pro-proliferativen Effekt des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF: epidermal growth factor) (38) oder von Insulin (42) über eine Hemmung der EGF- bzw. der Insulin-Rezeptor-Autophosphorylierung und – weiter „downstream“ – durch Hemmung der Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 (43,44). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen hemmt der AT2R über eine Dephosphorylierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor-κB* (NF-κB) (45, 46: Publikation 6) und *signal transducers and activators of transcription* (STAT) (47) die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine und wirkt somit anti-inflammatorisch. Offensichtlich sind auch noch weitere Phosphatasen wie die *mitogen-activated protein kinase phosphatase 1* (MKP-1), eine weitere Tyrosinphosphatase (48), sowie die *protein phosphatase 2A* (PP2A), eine Serin-Threonin-Phosphatase (49), an dieser Form der „Zwiesprache“ beteiligt; für sie wurde aber bisher keine direkte Bindung an den AT2R nachgewiesen.

Der Transkriptionsfaktor PLZF (*proteolytic leukemia zinc finger*) schließlich wurde im Zusammenhang mit pro-hypertrophen Effekten des AT2R am Myokard beschrieben, die insgesamt aber sehr kontrovers diskutiert werden, wie auch PLZF selber als ein Transkriptionsfaktor beschrieben wird, der multi-funktional ist und sowohl pro- als auch anti-hypertrophe Wirkungen vermittelt (39,41,50).

Obwohl also inzwischen einige Signaltransduktionsmechanismen für den AT2R bekannt sind, ist das Wissen hierüber sicherlich noch lückenhaft; insbesondere besteht oftmals keine klare Zuordnung von Signaltransduktionswegen zu physiologischen Effekten des AT2Rs.

1.2.4 Die physiologischen und patho-physiologischen Wirkungen des AT2-Rezeptors

Von der Entdeckung des AT2-Rezeptors bis zur ersten Beschreibung AT2R-vermittelter Wirkungen vergingen bemerkenswerte 5 Jahre. Die allgemeine Erwartung, dass der AT2R für einige der bereits bekannten Ang II Wirkungen verantwortlich sein würde – also für Hypertonie, Vasokonstriktion, Aldosteron- oder Vasopressin-Freisetzung, Zellproliferation oder –hypertrophie, Inflammation, Fibrose etc. – stand der Entdeckung der wirklichen AT2R Wirkungen lange Zeit im Wege.

Wie man heute weiß, unterscheiden sich AT2R-gekoppelte Effekte nämlich – mit wenigen Ausnahmen - grundsätzlich von den AT1R-vermittelten Wirkungen. Sie wirken den AT1R-vermittelten Effekten oftmals sogar direkt entgegen. Daher waren viele experimentelle Hypothesen und Ansätze zu Beginn der AT2R Forschung grundsätzlich ungeeignet, um AT2R Wirkungen zu detektieren.

Der erste für den AT2R beschriebene physiologische Effekt, eine Publikation unserer Gruppe, bestand in einer anti-proliferativen Wirkung in koronaren Endothelzellen (51: Publikation 3). Hierbei zeigte sich, dass der AT2R nicht nur den pro-proliferativen Effekt von Angiotensin II über den AT1R zu „antagonisieren“ vermag, sondern auch den pro-proliferativen Effekt des Wachstumsfaktors bFGF und von Serum. Der anti-proliferative Effekt des AT2Rs wurde seither in unterschiedlichen Zellen *in vitro* und auch in *in vivo* vielfach bestätigt (27,30,52). In diesem Zusammenhang sei nochmals erwähnt, dass eines der Bindungsproteine des AT2Rs, nämlich ATBP, ein Tumor-Suppressoren ist, welches in der Tat maßgeblich an der anti-proliferativen Wirkung beteiligt ist (35,37).

Kurze Zeit später wurde als weiterer physiologischer Effekt eine stimulierende Wirkung auf das Aussprossen von Neuriten an Zellen neuronalen Ursprungs gezeigt (53, 54: Publikation 4, Abbildung 1).

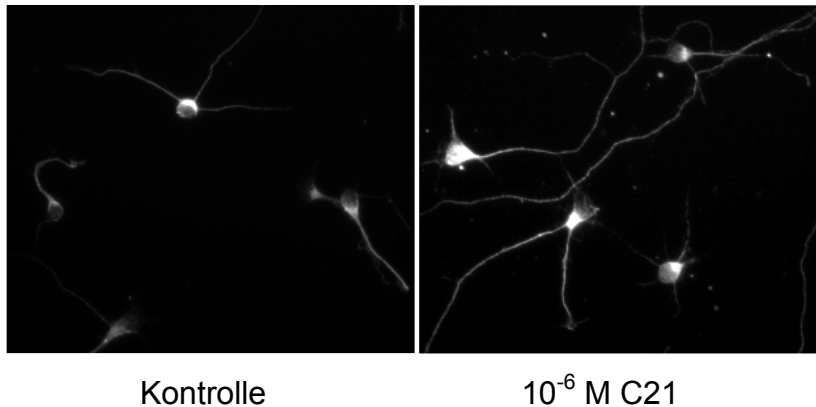


Abb.1: Die Stimulation des AT2-Rezeptors auf Zellen neuronalen Ursprungs (hier: NG108-15 Zellen) führt zur Aussprossung von Neuriten

Dies war ein erster Hinweis auf das neuroprotektive Potential des AT2Rs, welches in Folge in Modellen der peripheren und zentralen Schädigung neuronalen Gewebes (Kompressionsverletzungen von N. ischiadicus und N. opticus; Schlaganfallmodelle) untermauert werden konnte (24,55-57).

Ein gewebeprotectiver Effekt des AT2Rs wurde nicht nur für neuronales Gewebe beschrieben, sondern auch für andere Organe wie Herz (25,41), Niere (58-60) Gefäße (30,61) oder Leber (62). Maßgeblich verantwortlich für diese protektiven Effekte sind offensichtlich eine AT2R-vermittelte Entzündungshemmung und ein anti-fibrotischer Wirkaspekt (26,41,63).

In den meisten Gefäßbetten wirkt der AT2R vasodilatativ (64-66). Trotzdem führt eine Stimulation des AT2Rs anscheinend nur unter gleichzeitiger AT1R-Blockade zu einer Blutdrucksenkung (66,67).

Die größte Kontroverse bezüglich AT2R-vermittelter Wirkungen besteht z.Zt. wohl bei der Frage, ob der AT2R die Herzhypertrophie fördert oder hemmt (39,41). Hierzu gibt es vor allem in genetisch veränderten Tieren und Zellen widersprüchliche Ergebnisse (39,41,68,69), was unter anderem darauf zurückgeführt wird, dass in diesen Tieren unterschiedliche genetische Hintergründe einen Einfluss auf das *Outcome* haben können oder auch Epiphänomene eine Rolle spielen wie Mechanismen, die bereits vorgeburtlich die Rezeptor-Deletion zu kompensieren versuchen, oder Veränderungen der relativen Rezeptor-Expression (z.B. AT1R relativ zu AT2R) im Vergleich zum genetisch unveränderten Organismus (70).

Die Liste der zurzeit bekannten AT2R-Wirkungen ließe sich noch fortsetzen (16,71). Die wichtigsten und für diese Arbeit relevantesten sind jedoch im obigen beschrieben.

1.2.5 Der AT2-Rezeptor Agonist Compound 21

Die AT2R-Forschung war jahrelang erschwert durch das Fehlen eines metabolisch stabilen, spezifischen und selektiven AT2R-Agonisten. Viele der heutigen Erkenntnisse über den AT2R wurden über indirekte Versuchsansätze, d.h. über den Einsatz von AT2R-Antagonisten bzw. von AT2R-defizienten Zellen oder Tieren gewonnen; einige auch mit Hilfe des Peptid-Agonisten CGP42112A (72).

Im Jahr 2004 wurde die Synthese des ersten nicht-peptidischen AT2R-Agonisten, Compound 21 (auch als M24 bezeichnet) publiziert (73). Compound 21 (C21) ist ein „*small molecule*“ mit einer *in vivo* Halbwertszeit in Ratten von ca. 4 Stunden und einer oralen Bioverfügbarkeit von 20-30%. Dieses Molekül ist ein Durchbruch in der AT2R-Forschung, da mit seiner Hilfe erstmals die Funktion des AT2Rs *in vitro* und auch *in vivo* durch direkte Stimulation und ohne pharmakokinetische Probleme (wie bei dem Peptid-Agonisten CBP 42112A) untersucht werden kann. Außerdem hat C21

pharmakokinetische Eigenschaften, die einen Einsatz als Medikament denkbar erscheinen lassen, wodurch der AT2R erstmals als potentiell *„Drug Target“* betrachtet werden kann (74).

Seit der Erstpublikation von C21 wurden sechs experimentelle Studien unter Verwendung von C21 publiziert, zwei davon von unserer Arbeitsgruppe. In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine direkte Stimulation des AT2Rs (i) die kardiale Funktion nach Herzinfarkt in Ratten über anti-inflammatorische und anti-apoptotische Mechanismen verbessert (75: Publikation 5), (ii) die Hypertonie-bedingten Endorganschäden an Niere und Gehirn von Ratten reduziert (58), (iii) in einem Modell der renovaskulären Hypertonie die frühe inflammatorische Reaktion in der Niere hemmt (60), (iv) in Gefäßringen aus Aorta und Mesenterialgefäßen zu einer Vasodilatation führt und in Kombination mit einem niedrig dosierten AT1R-Blocker den Blutdruck senkt (66), (v) nach zentraler Applikation die Dopamin-Synthese im Striatum inhibiert (76) und (vi) in verschiedenen kardiovaskulären und nicht-kardiovaskulären Zellen die Synthese von Zytokinen über die Aktivierung von Phosphatasen und eine Hemmung der Aktivität von NF- κ B hemmt und zwar mit ähnlicher Wirkstärke wie Hydrokortison (46: Publikation 6).

Das therapeutische Potential einer AT2R-Stimulation mit C21 wird zurzeit in unserer und einer Reihe weiterer Arbeitsgruppen weltweit untersucht so z.B. in Modellen der Herz-, Gefäß- oder Nierenschädigung, bei diabetischen Endorganschäden und metabolischem Syndrom, aber auch bei neurologischen (Schlaganfall, Rückenmarksverletzung, Multiple Sklerose) und chronisch entzündlichen (Sklerodermie, rheumatoide Arthritis) Erkrankungen.

2. Zielsetzung

Seit 1989 ist bekannt, dass das Peptidhormon Angiotensin II seine Wirkungen durch Bindung an mehr als einen Rezeptor-Subtypen entfaltet. Während man schnell feststellte, dass alle bekannten, vor allem kardiovaskulären Effekte von Angiotensin II über den AT1R vermittelt werden, blieb der AT2R in Bezug auf seine Wirkungen und seine Signaltransduktionswege lange Zeit ein Rätsel und ist es zum Teil immer noch. Die hier zusammengestellten Arbeiten dienen dazu, verschiedene Facetten der Physiologie und Pathophysiologie des AT2-Rezeptors zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen wurden hierbei bearbeitet:

- Existiert ein lokales Renin-Angiotensin-System in der Haut und ist der AT2-Rezeptor ein Teil davon?
- Wie ändert sich die Expression des AT1- und des AT2-Rezeptors in der Haut während der Wundheilung?
- Was sind die physiologischen Wirkungen des AT2Rs in mikrovaskulären Endothelzellen und in Zellen neuronalen Ursprungs?

In den jüngsten Arbeiten ging es vor allem um die Frage, ob der AT2R als pharmakologische Zielstruktur geeignet ist und wenn ja, für welche Indikationen.

Konkret wurden folgenden Fragestellungen bearbeitet:

- Verbessert die pharmakologische Stimulation des AT2Rs die Herzfunktion nach Myokardinfarkt und wenn ja, über welche Mechanismen?
- Wirkt der AT2R anti-inflammatorisch und was sind die verantwortlichen Signaltransduktionsmechanismen.

3. Eigene Arbeiten

3.1 Die Expression des AT2-Rezeptors unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

3.1.1 Publikation 1: Die Expression des AT2-Rezeptors in humaner Haut

Etwa zeitgleich mit der Entdeckung der verschiedenen Rezeptor-Subtypen für Angiotensin II setzte sich die Erkenntnis durch, dass das RAS nicht nur ein – wie ursprünglich beschrieben - zirkulierendes Hormonsystem ist, sondern in vielen Geweben auch lokal vorliegt und eine lokale, gewebsspezifische Synthese von Ang II erlaubt. Man stellt sich vor, dass das zirkulierende RAS eher für akute Effekte des RAS z.B. im Falle eines plötzlichen Volumenverlustes, zuständig ist, während die Gewebe-Renin-Angiotensin-Systeme eher langfristige Wirkungen wie z.B. Umbauprozesse (*Remodelling*) vermitteln. Die Existenz eines lokalen oder Gewebe-RAS konnte für viele Organe nachgewiesen werden wie z.B. für das Herz, die Gefäßwand, das zentrale und periphere Nervensystem, die Leber, die Niere, die Retina oder lymphatisches Gewebe (10).

Die Expression eines lokalen RAS in der Haut, insbesondere in humaner Haut, wurde lange Zeit nicht systematisch untersucht. Die nachfolgende Studie war daher die erste, die alle Komponenten des „klassischen“ RAS, also Angiotensinogen, Renin, ACE sowie die AT1- und AT2-Rezeptoren in humaner Haut auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen hat. Der Nachweis erfolgte mittels RT-PCR in verschiedenen, aus humaner Haut isolierten Primärzellen (Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten, mikrovaskuläre Endothelzellen) *in vitro*, sowie mittels Immunhistochemie in histologischen Schnitten von gesunder, humaner Haut *ex vivo*. Weiterhin wurde gezeigt, dass primäre Keratinozyten in der Tat in der Lage sind, in Kultur ohne Zugabe von RAS Komponenten Angiotensin II zu synthetisieren.

Humane Haut ist also ein Synthesort und gleichzeitig auch ein Zielorgan von Angiotensin II.

(11) **U.M.Steckelings**, T.Wollschläger, J.Peters, B.M.Henz, B.Hermes, M.Artuc
Human skin: source of and target organ for angiotensin II.
Exp Dermatol 2004; 13:148-54.

3.1.2 Publikation 2: Die Expression des AT2-Rezeptors im Bereich kutaner Wunden

Während im gesunden Organismus postpartal die Expression des AT1Rs die des AT2Rs in der Regel bei weitem übersteigt, ändert sich das Verhältnis AT1R/AT2R deutlich im Falle einer Gewebsverletzung oder anderer pathologischer Veränderungen des Gewebes. Dies wurde für verschiedene Organe und verschiedene Arten der Gewebeschädigung beschrieben wie beispielweise für das Herz nach Myokardinfarkt oder bei Herzinsuffizienz (22,23,25), für das Gehirn nach fokaler Ischämie (24), für die Niere bei Niereninsuffizienz (28), für Gefäße nach Defekten der Gefäßwand (30) und für periphere Nerven nach traumatischer Verletzung (29). Bezüglich der Haut gab es zum Zeitpunkt der Durchführung der nachfolgenden Studie drei Publikationen, die das Expressionsmuster von AT1- und AT2-Rezeptoren in kutanen Wunden beschrieben (77-79). Diese Daten waren aber widersprüchlich und wurden ausschließlich in Hautproben von Ratten erhoben, nicht von Menschen.

Die nachfolgende Arbeit untersuchte daher erstmals, ob und in welcher Weise sich das Expressionsmuster der Angiotensin Rezeptoren nach Schnittverletzungen in humaner Haut verändert. Hierzu wurden drei experimentelle Ansätze gewählt: (i) Messung der AT1R/AT2R-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in primären, humanen Keratinozyten 1 bis 12 Stunden nach Verletzung mit einer Rasierklinge (*razor blade scraping*), (ii) Messung der AT1R/AT2R-Expression auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbung von Gewebeschnitten aus Stanzbiopsien, die *ex vivo* (in Kulturmedium) mit einer kontrollierten Inzision versehen wurden und (iii) Messung der AT1R/AT2R-Expression auf Protein-Ebene mittels immunhistochemischer Färbung in Gewebeschnitten aus 1 bis 88 Tage alten Wunden humaner Haut. Die Messungen ergaben, dass beide Rezeptor-Subtypen, AT1 und AT2, *in vitro* bereits nach 1 Stunde, *ex vivo* und *in vivo* nach (24-)48 Stunden vermehrt exprimiert waren. Zumindest in 14 Tage alten Wunden war die Intensität der immunhistochemischen Färbung für den AT2R deutlich stärker als für den AT1R.

(31) **Steckelings UM**, Henz BM, Wiehstutz S, Unger Th, Artuc M
Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing.
Br J Dermatol 2005; 153: 887-893

3.2 Physiologische Funktionen des AT2-Rezeptors

3.2.1 Publikation 3: Der AT2-Rezeptor wirkt anti-proliferativ auf Endothelzellen

Nach der Identifizierung und erstmaligen Beschreibung der Angiotensin Rezeptor-Subtypen AT1 und AT2 vergingen 5 Jahre, in denen erfolglos nach einer Funktion des AT2Rs gesucht wurde. Alle bis dahin bekannten Wirkungen von Angiotensin II (Ang II) erwiesen sich als AT1R-vermittelt. Zwischenzeitlich wurde sogar erwogen, dass der AT2R ein funktionsloses Bindungsprotein für Ang II ist, oder dass es sich nur um ein Artefakt handelte.

Zu dieser Zeit war bereits bekannt, dass Ang II über den AT1R proliferationsfördernd wirkt. In unserer Arbeitsgruppe fiel damals auf, dass Zellen, die überwiegend den AT2R exprimieren, nach Stimulation mit Ang II keine gesteigerte Proliferationsrate zeigten bzw. sogar mit einer Proliferationshemmung reagierten (80). Dieser Beobachtung wurde in der nachfolgende Arbeit genauer nachgegangen. Hierzu wurden vaskuläre, glatte Muskelzellen (VSMC) bzw. koronare, mikrovaskuläre Endothelzellen (KME) mit Ang II stimuliert und der Effekt auf die Proliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau, MTT-Test und Zellzählung quantifiziert. Es zeigte sich, dass Ang II in VSMC, die nur den AT1R exprimieren, die Proliferation fördert, während dies in KME, welche beide Rezeptor-Subtypen exprimieren, nicht der Fall war bzw. nur nach Blockade des AT2R zu beobachten war. In KME, die mit *basic fibroblast growth factor* (bFGF) vorbehandelt waren, führte die Behandlung mit Ang II sogar zu einer Hemmung der bFGF-induzierten Proliferation. Dieser Effekt war hemmbar durch Blockade des AT2Rs mit dem spezifischen Antagonisten PD123177 und konnte auch mit dem spezifischen AT2R-Agonsiten CGP42112A ausgelöst werden. Diese Arbeit zeigte also einen anti-proliferativen Effekt von Ang II über den AT2R und damit den ersten physiologischen Effekt des AT2R überhaupt.

(51) M.Stoll, **U.M.Steckelings**, M.Paul, S.P.Bottari, R.Metzger, Th.Unger
The angiotensin II AT2 receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells.
J Clin Invest 1995; 95: 651-657

3.2.2 Publikation 4: Der AT₂-Rezeptor hemmt die Proliferation und fördert die Differenzierung von Zellen neuronalen Ursprungs

In der AT₂R-Forschung war vor allem in den ersten Jahren die Zelllinie PC12W sehr beliebt, da diese Zellen nur den AT₂R und nicht den AT₁R exprimieren. Die PC12W Zelllinie wurde ursprünglich aus einem adrenalen Phäochromozytom einer Ratte isoliert (81). Diese Zellen besitzen die Morphologie von Neuronen und reagieren *in vitro* auf Inkubation mit *nerve growth factor* (NGF) mit einer deutlich reduzierten Proliferationsrate und der Ausbildung neuronaler Fortsätze, wobei letzteres als ein Zeichen der Differenzierung angesehen werden kann.

Wir stellten in unserem Labor fest, dass auch die Inkubation mit Ang II bei PC12W-Zellen zur Neuritenaussprossung führte.

In einer Studie, die dieses Phänomen näher untersuchte, wurden PC12W Zellen mit Ang II inkubiert. In diesen AT₁R-defizienten Zellen sind die Angiotensin-induzierten Effekte – zumindest ganz überwiegend – AT₂R-vermittelt. Mittels [³H]Thymidin-Einbau und Zellzählung konnte festgestellt werden, dass Ang II in PC12W Zellen proliferationshemmend wirkt. Dieser Effekt von Ang II konnte durch den spezifischen AT₂R-Antagonisten PD123177 aufgehoben werden. Morphologisch reagierten die Zellen auf die Inkubation mit Ang II mit Neuritenwachstum und zwar in ähnlicher Weise wie nach Inkubation mit NGF. Der Effekt von Ang II und NGF war additiv, und auch hier konnte der Effekt von Ang II mit dem AT₂R-Antagonisten PD123177 blockiert werden.

Somit konnte also in dieser Publikation erstmal beschrieben werden, dass die Stimulation des AT₂R die Differenzierung von Zellen neuronalen Ursprungs fördert, was mit einer Proliferationshemmung einhergeht.

Da die photographische Darstellung der Neuritenaussprossung in PC12W Zellen in der Originalpublikation aus technischen Gründen nicht erkennbar ist, sei an dieser Stelle auf Abb. 1 verwiesen, die ein vergleichbares Experiment zeigt.

(54) S.Meffert, M Stoll, **U.M.Steckelings**, S.P.Bottari, Th.Unger
The angiotensin AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells
Mol Cell Endocrinol 1996; 121: 59-69

3.3 AT2-Rezeptor-Stimulation als neues therapeutisches Prinzip

3.3.1 Publikation 5: Die direkte, pharmakologische Stimulation des AT2-Rezeptors verbessert die kardiale Funktion nach Herzinfarkt

In vivo Untersuchungen zur Funktion des AT2Rs waren von je her schwierig, da in den ersten 15 Jahren nach Entdeckung des AT2Rs kein metabolisch stabiler Agonist zur Verfügung stand. Im Jahr 2004 publizierte die Gruppe um Anders Hallberg die Synthese des ersten nicht-peptidischen, oral bioverfügbaren AT2R-Agonisten, Compound 21 (C21; auch als M24 bezeichnet) (73).

Als ersten *in vivo* Versuch weltweit (abgesehen von Einzelmessungen in der Originalpublikation von C21) führten wir eine Untersuchung zur therapeutischen Wirksamkeit einer direkten AT2R-Stimulation mit C21 im Herzinfarktmodell (Infarkt durch permanenten Verschluss der linken Koronararterie) in Ratten durch.

C21 (0,03 oder 0,3 mg/kg Körpergewicht i.p.) wurde beginnend 24 Stunden nach Infarkt über einen Zeitraum von 7 Tagen gegeben. Im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen zeigten die C21-behandelten Tiere eine kleinere Infarktnarbe sowie eine signifikant verbesserte Herzfunktion (gemessen mit Echokardiographie und intrakardialem Millar Katheter). Im Periinfarktgewebe und im Plasma war die Expression pro-inflammatorischer Zytokine sowie von Markern für Apoptose bzw. oxidativen Stress reduziert, was auf anti-inflammatorische, anti-apoptotische und anti-oxidative Mechanismen des AT2Rs schließen lässt, die wahrscheinlich grundlegend waren für die verbesserte Herzfunktion nach Myokardinfarkt.

Eine pharmakologische Stimulation des AT2Rs könnte demnach eine neue Möglichkeit der therapeutischen Intervention mit dem Renin-Angiotensin-System zur Verbesserung der Herzfunktion nach Infarkt darstellen.

(75) E.Kaschina, A.Grzesiak, J.Li, A.Foryst-Ludwig, M.Timm, F.Rompe, M.Sommerfeld, U.R.Kemnitz, C.Curato, P.Namsolleck, C.Tschöpe, A.Hallberg, M.Alterman, B.Dahlöf, U.Kintscher, Th.Unger, **U.M.Steckelings**
AT2-receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin-system in myocardial infarction?
Circulation 2008; 118:2523-2532

3.3.2 Publikation 6: Direkte AT2-Rezeptor Stimulation wirkt anti-inflammatorisch über die Synthese von Epoxyeicosatriensäure und Hemmung von NF- κ B

In der im Vorherigen beschriebenen Studie sowie in weiteren noch nicht publizierten *in vivo* Versuchen konnten wir beobachten, dass ein anti-inflammatorischer Effekt von C21 offensichtlich immer zu einem verbesserten, funktionellen Ergebnis beigetragen hatte.

Die folgende Studie sollte daher dazu dienen, die dem anti-inflammatorischen Effekt zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen genauer aufzuklären und auch noch einmal die AT2R-agonistische Wirkung von C21 zu verifizieren.

Anhand von *in vitro* Studien an humanen, primären, dermalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass C21 in der Tat agonistisch und nicht antagonistisch am AT2R wirkt, da es die gleichen Wirkungen auslöst wie Ang II unter Blockade des AT1Rs. Da die Effekte von C21 durch Blockade des AT2Rs mit dem spezifischen Antagonisten PD123319 aufgehoben wurden bzw. in AT2R-defizienten Zellen nicht vorhanden waren, schlossen wir, dass die Effekte von C21 in der Tat AT2R-spezifisch sind.

Die Hemmung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α , MCP-1) wurde vermittelt durch Aktivierung von Tyrosin- und Serin-/Threonin-Phosphatasen, die zu einer Hemmung der Aktivität von NF- κ B führten, sowie durch eine Aktivierung der Synthese von Epoxyeicosatriensäure. Die NF- κ B-abhängige Hemmung der IL-6 Promoteraktivität durch C21 war in ihrer Effizienz vergleichbar mit dem Effekt von Hydrokortison in der gleichen Dosierung.

Diese Studie bestätigte also die anti-inflammatorischen Effekte einer AT2R-Stimulation, identifizierte zugrunde liegende Signaltransduktionswege und legte nahe, dass eine pharmakologische AT2R-Stimulation eventuell auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen außerhalb des kardiovaskulären Formenkreises von Interesse sein könnte.

(46) F.Rompe, M.Artuc, A.Hallberg, M.Alterman, K.Ströder, C.Thöne-Reineke, A.Reichenbach, J.Schacherl, B.Dahlöf, M.Bader, N.Alenina, M.Schwaninger, T.Zuberbier, H.Funke-Kaiser, C.Schmidt, W-H.Schunck, Th.Unger, **U.M.Steckelings** Direct Angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of NF- κ B. Hypertension 2010; 55: 924-931

4. Diskussion

In der Geschichte der Entdeckung und Charakterisierung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), seiner aktiven Hormone, Enzyme und seiner Wirkungen, stellt die Beschreibung des „protektiven“ Arms dieses Systems eines der jüngsten Kapitel dar. Zu diesem protektiven Arm gehören Angiotensin 1-7 (Ang 1-7), das zur Ang 1-7 Synthese notwendige Enzym ACE2, der Rezeptor für Ang 1-7, Mas-Rezeptor (MasR), sowie der AT2-Rezeptor (75,82). Während das „klassische RAS“ mit Ang II als hauptsächlichem Effektorhormon, das seine Wirkungen über den AT1R vermittelt, eindeutig als pathogenetisch bedeutsam für die Hypertonie sowie die Entwicklung Hypertonie- und Diabetes mellitus-bedingter Endorganschäden identifiziert wurde, ist es heute allgemein akzeptiert, dass die Hauptkomponenten des protektiven Arms des RAS, nämlich Ang 1-7 über den MasR und Ang II über den AT2R, zumindest ganz überwiegend gewebeprotective Wirkungen vermitteln (82). Der protektive Arm des RAS wirkt hierbei den pathologisch bedeutsamen Effekten des klassischen RAS zum Teil direkt entgegen, kann aber auch die Wirkungen von Wachstumsfaktoren oder pro-inflammatorischen Zytokinen antagonisieren.

Die pharmakologische Intervention mit dem klassischen RAS durch direkte Renin-Inhibitoren, ACE-Hemmer oder AT1R-Blocker ist für viele kardiovaskuläre Indikationen Standardtherapie. Allen diesen pharmakologischen Eingriffen ist gemeinsam, dass die Wirkungen des klassischen RAS gehemmt werden, sei es durch Blockade des AT1Rs oder durch Hemmung der für die Synthese von Ang II verantwortlichen Enzyme Renin und ACE (83).

Die Komponenten des protektive Arms des RAS sind erst in jüngster Zeit als potentielle „*Drug Targets*“ in den Fokus des Interesses gerückt (84-87). So wird zum Beispiel rekombinantes ACE2 als Medikament zur Behandlung des *Acute Respiratory Distress Syndromes* (ARDS) entwickelt (85), rekombinantes Ang 1-7 zur Beschleunigung der Hämatopoese z.B. in Zusammenhang mit Tumorthherapie, Stammzelltherapie oder Bestrahlungen (86), während für den AT2R ein oral verfügbarer, selektiver und spezifischer Agonist (Compound 21) in der präklinischen Entwicklung ist, für den aber noch keine potentielle Indikation festgelegt wurde (74,84).

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten haben im Laufe der Jahre zum Verständnis des AT2Rs bzw. zu seiner Identifizierung als potentielle,

pharmakologische Zielstruktur beigetragen. Das thematische Spektrum der Arbeiten reicht von Studien zur AT2R-Expression unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen über die Identifikation physiologischer Funktionen bis zur Testung einer direkten AT2R-Stimulation als mögliches therapeutisches Prinzip.

4.1 Die Expression des AT2-Rezeptors unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

Die in dieser Habilitationsschrift enthaltenen Arbeiten zur Rezeptorexpression befassen sich mit der Identifizierung aller RAS-Komponenten inklusive des AT2Rs in humaner, gesunder Haut bzw. mit der Regulation der AT1- und AT2-Rezeptor Expression in humaner, verletzter Haut (Publikation 1: 11; Publikation 2: 31). In der Publikation in *Experimental Dermatology* von 2004 konnte erstmal das Vorhandensein eines kompletten RAS in der Epidermis und Dermis humaner Haut beschrieben werden, so dass humane Haut sowohl als Syntheseort als auch als Zielorgan von Ang II betrachtet werden muss (Publikation 1: 11). Die Analyse spezifischer, kutaner Zelltypen ergab, dass auch der AT2R in wichtigen Zellen der Dermis (Fibroblasten; dermale, mikrovaskuläre Endothelzellen) und Epidermis (Keratinozyten) vorhanden ist, nicht jedoch in Melanozyten.

Etwa zeitgleich erschienene Arbeiten von Takeda und Kondo untersuchten ebenfalls die Angiotensin-Rezeptor Expression in humaner Haut und ausgewählten humanen, kutanen Tumoren, konnten aber nur die Expression des AT1R feststellen (88,89). Dagegen bestätigten Publikationen von Min et al. (90), Kawaguchi et al. (91), Tang et al. (92), Nickenig et al. (93) und Liu et al. (94) unsere Beobachtung, dass humane, dermale Fibroblasten der AT2R exprimieren.

Ein Charakteristikum des AT2Rs ist seine überaus starke Expression in fetalem Gewebe, wohingegen post-partum die Expression in der überwiegenden Anzahl von Geweben auf fast undetektierbare Levels zurückgeht. Dieses Expressionsmuster konnte auch für humane Haut von Liu et al. gezeigt werden (95). Allerdings ist nach wie vor völlig unbekannt, welche Funktion der AT2R während der embryonalen Entwicklung haben könnte. AT2R-defiziente Mäuse entwickeln sich in aller Regel normal. Insbesondere sind keine pathologischen Veränderungen der Haut bekannt (20,21). Eine 2010 erschienene Arbeit stellt sogar das gesamte Dogma einer verstärkten, vorgeburtlichen AT2R-Expression in Frage (96).

Unumstritten ist jedoch, dass es im Falle einer Gewebeschädigung, sei es durch Trauma, Ischämie (z.B. nach Herzinfarkt oder zerebralem Insult) oder chronische, pathologische Umbauvorgänge (z.B. bei Herzinsuffizienz oder chronischer Nierenerkrankung) zu starken Veränderungen der AT2R-Expression kommt.

In der 2005 im *British Journal of Dermatology* erschienenen Arbeit konnte eine deutlich verstärkte Expression des AT2Rs im Bereich von Wunden in humaner Haut 24 Stunden bis 3 Monate nach Inzision gezeigt werden (Publikation 2: 31). Eine vermehrte Expression von AT2Ren im Bereich dermalen Wunden konnte auch für die Haut von jungen und adulten Ratten gezeigt werden (77).

Damit stehen diese und unsere Arbeiten im Einklang mit den meisten Beschreibungen einer veränderten AT2R-Expression in geschädigtem, nicht-kutanem Gewebe wie z.B. in Nervenläsionen (29), Herzinfarkt (22,23), zerebralem Insult (24) oder Herzinsuffizienz (25), die ebenfalls eine gesteigerte AT2R-Expression feststellen.

Die im Vorhergehenden beschriebenen Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen zur Expression von Angiotensin-Rezeptoren in gesunder und geschädigter, humaner Haut und in anderen, pathologisch veränderten Geweben sind natürlich als rein deskriptiv zu betrachten, so dass aus diesen Arbeiten auf mögliche Funktionen des AT2Rs nur geschlossen werden konnte. Die in einer Vielzahl von Geweben zu beobachtende Re-expression nach Gewebeschädigung deutet jedoch stark auf einen körpereigenen „Rescue“-Mechanismus hin, ähnlich der Re-expression embryonaler Gene nach Schädigung des Myokards (97).

Was die Funktion des AT2Rs in kutanen Wunden angeht, konnten Takeda et al. inzwischen in entsprechenden Modellen zeigen, dass der AT2R in humanen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten die Proliferation und Migration hemmt (98).

4.2 Physiologische Funktionen des AT2-Rezeptors

Zwei der in dieser Habilitationsschrift enthaltenen Arbeiten befassten sich mit der Aufklärung physiologischer Funktionen des AT2Rs (Publikation 3: 51; Publikation 4: 54).

Die im Februar 1995 im *Journal of Clinical Investigation* publizierte Arbeit war die erste Beschreibung eines physiologischen Effekts des AT2Rs überhaupt, wobei

dieser Effekt in einer Hemmung der Proliferation von koronaren Endothelzellen der Ratte bestand (Publikation 3: 51). Die 1996 in der Zeitschrift *Molecular and Cellular Endocrinology* erschienene Arbeit bestätigte diesen anti-proliferativen Effekt in PC12W-Zellen, einer Zelllinie mit neuronalen Eigenschaften, die ursprünglich aus einem Phäochromozytom der Ratte isoliert wurde (Publikation 4: 54). Gleichzeitig mit einer Hemmung der Proliferation führte die Stimulation des AT2Rs in PC12W-Zellen zu einer vermehrten Differenzierung dieser Zellen, die sich im Aussprossen von Neuriten zeigte.

Der anti-proliferative Effekt des AT2R wurde kurz nach unserer an Zellkulturen durchgeführten Arbeit von Nakajima et al. auch *in vivo* bestätigt (30). Die Autoren dieser Arbeit induzierten hierzu durch viralen Gentransfer eine Überexpression des AT2Rs in der Intima der A. carotis der Ratte. Eine anschließende Verletzung der Intima durch Ballon-Katheter führte in den AT2R-überexprimierenden Gefäßen zu einer deutlich geringeren Intima-Proliferation als in den normalen Gefäßen (30).

Der anti-proliferative Effekt des AT2Rs wurde in der Folge von uns und vielen weiteren Arbeitsgruppen an verschiedensten Zelltypen (z.B. an Mesangialzellen, an Zelllinien neuronalen Ursprungs, Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten, renomedullären, interstitiellen Zellen, Keratinozyten) verifiziert und ist heute als Wirkung des AT2Rs unumstritten (52,54,99-102).

Der differenzierungsfördernde Effekt des AT2Rs auf neuronale Zellen wurde fast zeitlich mit unserer Arbeit auch von der Gruppe von Nicole Gallo-Payet publiziert (53). Auch dieser Effekt des AT2Rs ist heute unumstritten und wurde daher beispielsweise auch zur Verifizierung des AT2R-agonistischen Effekts des neuen AT2R-Agonisten Compound 21 herangezogen (72,73).

Substanzen, die die neuronale Differenzierung fördern, haben oftmals auch neuroregenerative Eigenschaften. Diese Überlegung veranlasste unsere Arbeitsgruppe zu einer Reihe von Experimenten, in denen in der Tat gezeigt werden konnte, dass die Stimulation des AT2Rs mit Ang II axonales Wachstum und Regeneration nach Läsion des N. ischiadicus oder des N. opticus der Ratte fördert (55,56). Für den N. ischiadicus konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese axonale Regeneration auch mit einer Verbesserung der motorischen Funktion der Hinterläufe einhergeht (56).

Auch beim experimentellen Schlaganfall in Mäusen und Ratten scheint der AT2R die neuronalen Defizite zu reduzieren. Dies wurde von Iwai et al. indirekt an AT2R-defizienten Mäusen gezeigt, die nach fokaler, zerebraler Ischämie einen schlechteren, neurologischen Score und einen größeren Infarkt aufwiesen als Wildtyp-Mäuse (57), oder durch eine Studie unsere eigene Arbeitsgruppe, in der der neuroprotektive Effekt des AT1R-Blockers Irbesartan durch gleichzeitige Blockade des AT2Rs aufgehoben werden konnte (24). Letzteres deutet darauf hin, dass die Stimulation des nicht-blockierten AT2Rs unter AT1R-Blockade durch die reaktiv erhöhten Ang II Spiegel wichtiger Bestandteil der neuroprotektiven Wirkung einer AT1R-Blockade ist.

In jüngster Zeit konnten diese Ergebnisse bestätigt bzw. die Hypothese der Neuroprotektion durch AT2R-Stimulation weiter belegt werden durch Versuche, in denen der AT2R durch spezifische und selektive Agonisten direkt stimuliert wurde. So konnte im Schlaganfallmodell an Ratten die Gruppe von Robert Widdop eine deutlich verbesserte, neurologische Funktion durch intrazerebroventrikuläre (1 bzw. 10 ng/kg/min) Applikation des peptidischen AT2R-Agonisten CGP42112A zeigen (103). Unsere eigene Gruppe behandelte Mäuse nach Schlaganfall durch systemische Applikation mit dem nicht-peptidischen Agonisten Compound 21 (0,03 mg/kg Körpergewicht i.p.) und konnte ebenfalls eine verbesserte, neurologische Funktion im Vergleich zu Kontrollen beobachten (104).

Auch die Versuche zur Regeneration peripherer bzw. zentraler Nerven wurden wieder aufgenommen und zwar in einer Studie, in der Mäuse nach Kontusionstrauma des Rückenmarks auf Höhe Th8 mit dem AT2R-Agonisten Compound 21 behandelt wurden (0,3 mg/kg i.p.), was zu axonaler Regeneration und Verbesserung der motorischen Funktion führte (105). Diese Studie erbrachte auch Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus des neuroprotektiven Effekts des AT2Rs, der offensichtlich – zumindest zum Teil – in einer vermehrten Synthese von Neurotrophinen (z.B. BDNF) und ihrer Rezeptoren (TrkA und TrkB) besteht.

Neurorepair und Neuroregeneration scheinen also charakteristische Eigenschaften des AT2Rs zu sein, die auch interessant erscheinen im Hinblick auf eine zukünftige therapeutische Nutzung einer AT2R-Stimulation.

Weitere Funktionen des AT2Rs wurden bereits in der Einleitung besprochen und umfassen z.B. Anti-Entzündung, Anti-Fibrose und Vasodilatation (16,71).

Insgesamt bestehen bezüglich der physiologischen und patho-physiologischen Funktionen des AT₂Rs weiterhin relativ viele Kontroversen, was mit nicht unerheblichen, experimentellen Schwierigkeiten zu erklären ist. Hierzu gehören beispielsweise (i) die geringe Expression des AT₂Rs im gesunden Gewebe, insbesondere die meist höhere Expression des AT₁Rs und damit verbunden das Überwiegen von AT₁R-vermittelten Effekten bei Stimulation mit dem natürlichen Liganden Ang II, (ii) der meist inhibitorische Charakter der Effekte des AT₂Rs, was zur Sichtbarmachung von AT₂R-Wirkungen eine vorherige Stimulation bzw. ein pathologisches Modell erfordert, wodurch experimentelle Protokolle komplex werden und (iii) bis vor Kurzem das Fehlen eines metabolisch stabilen, selektiven und spezifischen Agonisten (106).

4.3 AT₂-Rezeptor-Stimulation als neues therapeutisches Prinzip

In der kardiovaskulären, klinischen Medizin ist es eines der häufigsten therapeutischen Prinzipien, die Synthese von Ang II (durch ACE- oder Renin-Inhibitoren) bzw. die Wirkung von Ang II über den AT₁-Rezeptor (durch AT₁-Rezeptor Blocker) zu hemmen. Beide therapeutischen Strategien dienen dazu, die über den AT₁-Rezeptor vermittelten, pathologischen Effekte von Angiotensin II zu hemmen (83).

Der AT₂-Rezeptor war bislang keine Zielstruktur in der klinischen Medizin. Zwar existieren seit über 20 Jahren spezifische AT₂-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten. Für die Antagonisten (PD123177 and PD123319) hat sich jedoch nie eine passende Indikation definieren lassen, und der Agonist CGP42112A ist ein Peptid, das wegen seiner geringen Stabilität und fehlenden oralen Bioverfügbarkeit nie als Pharmakon für den klinischen Einsatz in Betracht gezogen und weiterentwickelt wurde.

Im Jahr 2004 wurde die Synthese des ersten nicht-peptidischen AT₂R-Agonisten, Compound 21 (C21; auch als M24 bezeichnet) publiziert (73). Dieses Molekül hat pharmakokinetische Eigenschaften, die einen Einsatz als Medikament denkbar erscheinen lassen (73,74,84). C21 ist ein nicht-peptidisches „*small molecule*“ mit einer *in vivo* Halbwertszeit in Ratten von ca. 4 Stunden und einer oralen Bioverfügbarkeit von 20-30%.

Durch die Synthese von C21 hat sich die AT2R-Forschung in zweierlei Hinsicht verändert: zum einen hat die AT2R-Forschung nun erstmals einen translationalen Aspekt, d.h. es geht nicht mehr allein um die grundlagenwissenschaftliche Erforschung der Eigenschaften des AT2Rs, sondern auch um potentielle zukünftige Indikationen für eine pharmakologische, therapeutische AT2R-Stimulation. Zweitens steht für diese experimentellen Arbeiten nun erstmals ein Molekül zur Verfügung, mit dem der AT2R sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ohne nennenswerte pharmakokinetische Probleme direkt stimuliert werden kann, was die AT2R-Forschung in Zukunft deutlich erleichtern wird.

Zwei der Arbeiten, die Bestandteil dieser Habilitationsschrift sind, wurden unter Verwendung des neuen, nicht-peptidischen AT2R-Agonisten C21 durchgeführt.

Die 2010 in der Zeitschrift *Hypertension* publizierte Arbeit diente zum einen der Verifizierung der AT2R-agonistischen Eigenschaften von C21, zum anderen der Untersuchung von Signaltransduktionswegen des anti-inflammatorischen Effekts des AT2Rs (Publikation 6: 46). Wichtigstes *Readout* in diesen Versuchen war die Hemmung der mRNA- und Protein-Expression bzw. der Promoteraktivität von IL-6 durch C21. Eine solche IL-6 Hemmung war auch durch „klassische“ Stimulation des AT2Rs mit Ang II unter gleichzeitiger AT1R-Blockade zu beobachten. Da Ang II über den AT1R zu einer vermehrten Synthese von IL-6 führte, konnte sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei einer Hemmung der IL-6 Synthese um einen AT2R-vermittelten Effekt handeln musste. Dies wurde weiter untermauert durch die Hemmung der Effekte von C21 mit dem spezifischen AT2R-Antagonisten PD123319 und durch die Abwesenheit jeglicher Wirkungen von C21 in AT2R-defizienten Zellen. Inzwischen liegen uns auch Ergebnisse aus *in vivo* Studien an AT2R-defizienten Mäusen vor, in denen die in Wildtyp-Tieren zu beobachtenden Wirkungen von C21 ebenfalls nicht zu beobachten sind (104,107).

Bezüglich der Signaltransduktionsmechanismen, die der AT2R-gekoppelten Hemmung der Zytokinsynthese, also einem anti-inflammatorischen Effekt zu Grunde liegen, konnte die CYP2C/2J-abhängige, vermehrte Synthese von Epoxyeicosatriensäure erstmals als *Second Messenger* eines AT2R-gekoppelten, anti-inflammatorischen Effekts beschrieben werden. Als weiterer Signaltransduktionsmechanismus wurde eine direkte Hemmung der Aktivität von NF- κ B, also des für die Zytokinsynthese entscheidenden Transkriptionsfaktors, gefunden. Eine Hemmung

der Aktivität von NF- κ B durch AT2R-Stimulation wurde bereits vorher von Wu et al. beschrieben, jedoch noch nicht unter Einsatz des Agonisten C21 (45). In dieser und in unserer Studie war die Hemmung von NF- κ B abhängig von der Aktivierung sowohl von Tyrosin- als auch von Serin-/Threonin-Phosphatasen, da die spezifische Hemmung der jeweiligen Phosphatasen (durch Vanadat bzw. Okadasäure) zu einer Aufhebung des anti-inflammatorischen Effekts einer AT2R-Stimulation führte. Wu et al. konnten weiter zeigen, dass die Aktivierung der Phosphatasen zu einer Dephosphorylierung und damit Stabilisierung der inhibitorischen Untereinheiten von NF- κ B, I κ B α und I κ B β , führt, was die Translokation von NF- κ B in den Nukleus und damit die Initiierung der Zytokin-Transkription verhindert (45).

Die Hemmung der Aktivität von NF- κ B ist der maßgebliche Wirkmechanismus der Glukokortikoide (108). Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass die Stimulation des AT2Rs mit C21 zu einer ähnlich starken Hemmung der Aktivität des IL-6-Promoters führt wie Hydrokortison in gleicher Dosierung (10^{-6} M) (46). Auch wenn Hydrokortison eines der schwächsten heutzutage im klinischen Einsatz befindlichen Glukokortikoide ist, so deutet diese Beobachtung doch auf einen klinisch relevanten, anti-inflammatorischen Effekt des AT2Rs hin. Diese Hypothese muss zwar noch in *in vivo* Versuchen bestätigt werden, jedoch deuten eigene, präliminäre Ergebnisse bereits darauf hin, dass die Stimulation des AT2Rs z.B. im Modell der rheumatoiden Arthritis in der Maus (ein Modell, bei der die rheumatoide Arthritis durch Immunisierung mit Kollagen ausgelöst wird, bei der also eine Autoimmunreaktion kausal für das Krankheitsgeschehen ist) in der Tat einen signifikanten entzündungshemmenden Effekt hat.

Sowohl Wu et al. als auch wir stellten fest, dass die AT2R-vermittelte Hemmung der NF- κ B-Aktivität nicht beschränkt war auf durch Ang II aktiviertes NF- κ B (über den AT1R), sondern genau so zu beobachten war, wenn NF- κ B durch ein Zytokin (TNF α) aktiviert wurde (45,46). Der anti-inflammatorische, NF- κ B-hemmende Effekt einer AT2R-Stimulation beschränkt sich also nicht auf einen *Crosstalk* mit dem klassischen RAS, sondern interferiert auch mit den pro-inflammatorischen Wirkungen von Zytokinen.

Aus früheren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen ist weiterhin bekannt, dass die AT2R-gekoppelte Aktivierung von Phosphatasen auch zu einer Hemmung des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges führt, der ebenfalls in einer vermehrten Transkription von Zytokinen mündet, so dass hier ein weiterer, unabhängiger, anti-inflammatorischer

Wirkmechanismus der AT2Rs vorliegt, der allerdings für C21 noch nicht verifiziert wurde (47,63).

Der anti-inflammatorische Effekt des AT2Rs war offensichtlich auch ein wichtiger molekularer Mechanismus, der – wie von uns 2008 in *Circulation* publiziert - zu einer Verbesserung der Herzfunktion durch C21 nach experimentellem Myokardinfarkt in Ratten führte (Publikation 5: 75). Diese Studie war die erste, komplette, tierexperimentelle Arbeit, die das therapeutische Potential einer direkten AT2R-Stimulation für eine definierte Indikation präklinisch testete. Eine Woche nach Herzinfarkt durch permanente Okklusion der linken Koronararterie zeigten die einmal täglich systemisch mit C21 (0,03 oder 0,3 mg/kg Körpergewicht i.p.) behandelten Ratten bezüglich aller mittels transthorakaler Doppler Echokardiographie (LVIDd, LVIDs, *fractional shortening*, EF, E, A, E/A, EDT) bzw. Millar Katheter (VSP, LVEDP, Kontraktilitätsindex, dP/dt_{max} , dP/dt_{min}) erhobenen, hämodynamischen Parameter eine bessere Herzfunktion als die Vehikel-behandelten Kontrolltiere. Diese verbesserte Herzfunktion ging einher mit einer geringeren Narbengröße in den C21-behandelten Tieren (gemessen mittels MRT), die wiederum am ehesten auf ein verbessertes *Remodelling* zurückzuführen war, da der späte Therapiebeginn (24 Stunden nach Infarkt) keinen unmittelbaren Einfluss der Behandlung auf die ischämische Gewebeschädigung erwarten ließ.

Die inflammatorische Reaktion nach ischämischer Schädigung des Myokards ist ein entscheidender Stimulus für fibrotische Umbauvorgänge und den apoptotischen Niedergang von initial noch vitalen Zellen des Myokards, was im weiteren Verlauf zu einer Einschränkung der Pumpfunktion und damit zu einer Herzinsuffizienz führen kann (109). Die pharmakologische AT2R-Stimulation führte in unserer Studie zu einer verminderten Expression von Apoptosemarkern im Myokard sowie von pro-inflammatorischen Mediatoren im Plasma und im peri-Infarkt-Gewebe (75). Anti-inflammatorische und anti-apoptotische Mechanismen sind also vermutlich in der Tat essentiell für die verbesserte, kardiale Funktion nach AT2R-Stimulation im Herzinfarktmodell verantwortlich.

Die Frage nach der Rolle des AT2Rs im Rahmen eines Herzinfarkts – trägt er zum pathologischen Geschehen bei oder ist er Teil eines u. U. therapeutisch nutzbaren, endogenen Reparatursystems – wurde vor unserer Studie wie bei einer Reihe anderer Krankheitsbilder auch kontrovers diskutiert. Frühere Studien zum AT2R in Herzinfarktmodellen wurden fast ausnahmslos an genetisch veränderten Mäusen

durchgeführt, die entweder AT2R-defizient waren (110-115) oder den AT2R überexprimierten (116,117). Alle diese Studien bis auf eine (115) sprachen dem AT2R eine protektive Rolle im Rahmen des Postinfarkt-Geschehens zu. Dieses relativ eindeutige Bild wird nun durch unsere Daten gestützt, wobei unsere Studie die Rolle des AT2Rs erstmals durch direkte Stimulation der natürlich vorhandenen (im Infarktareal vermehrt exprimierten) AT2Ren untersuchte und nicht, wie die vorhergehenden, durch eine veränderte AT2R-Expression (im *knockout*- oder Überexpressions-Modell) ohne Applikation eines Agonisten.

Trotz dieser relativ eindeutigen Datenlage für die post-Infarkt Situation wird die Kontroverse über den AT2R insbesondere im Rahmen kardiovaskulärer Krankheitsmodelle sicherlich noch längere Zeit anhalten, wobei diese Diskussion insbesondere durch widersprüchliche Studien in Herzhypertrophie-Modellen genährt wird (41).

Es ist zu hoffen, dass die dank der Synthese des AT2R-Agonisten Compound 21 nun bestehende Möglichkeit einer direkten AT2R-Stimulation *in vivo* eine Klärung der physiologischen und patho-physiologischen Bedeutung des AT2Rs in eindeutiger Weise ermöglichen wird.

5. Zusammenfassung

Angiotensin II (Ang II) vermittelt seine Wirkungen im Wesentlichen über zwei Rezeptor-Subtypen: den AT1- und den AT2-Rezeptor. Von diesen beiden Rezeptor-Subtypen ist der AT1-Rezeptor (AT1R) weitaus besser charakterisiert als der AT2R. Der Grund hierfür ist, dass man – wie man heutzutage weiß - in den Jahrzehnten vor der Entdeckung der Existenz verschiedener Rezeptor-Subtypen im Jahr 1989 quasi ausschließlich AT1R-Wirkungen untersucht hatte.

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengestellten Arbeiten stellen Mosaiksteine im sich nun seit gut 20 Jahren entwickelnden Bild von Expression, Expressionsregulation, physiologischer und patho-physiologischer Funktion sowie potentieller therapeutischer Nutzbarkeit des AT2-Rezeptors dar.

Nach der Entdeckung der verschiedenen Angiotensin Rezeptor-Subtypen konzentrierten sich viele Arbeiten zunächst darauf zu klären, in welchen Geweben AT1- bzw. AT2-Rezeptoren vorhanden sind, und ob sich das Expressionsmuster in gesundem von dem in geschädigtem Gewebe unterscheidet. Die beiden ersten in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen (11: Steckelings et al., *Exp Dermatol* 2004; 31: Steckelings et al., *Br J Dermatol* 2005) befassten sich mit der Expression der Angiotensin Rezeptoren in humaner Haut. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl AT1- als auch AT2-Rezeptoren auf Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und dermalen mikrovaskulären Endothelzellen vorhanden sind und dass die Expression beider Rezeptoren, insbesondere jedoch des AT2Rs, in kutanen Inzisionswunden deutlich verstärkt ist. Diese von uns in humaner Haut beobachtete Re-Expression des AT2Rs nach Gewebsschädigung steht im Einklang mit zahlreichen Untersuchungen in anderen Organen.

Die dritte in dieser Habilitationsschrift aufgeführte Publikation (51: Stoll et al., *J Clin Invest* 1995) war die erste Beschreibung einer physiologischen Funktion des AT2Rs, und zwar eines anti-proliferativen Effekts in kardialen, mikrovaskulären Endothelzellen. Die Publikation von Meffert et al. (54: *Mol Cell Endocrinol* 1996) bestätigte kurz darauf den anti-proliferativen Effekt in neuronalen Zellen und fügte eine weitere physiologische Funktion hinzu, nämlich die Förderung der Differenzierung neuronaler Zellen durch Stimulation des AT2-Rezeptors, die sich in einer vermehrten Aussprossung von Neuriten zeigte. Letztere Arbeit war der initiale

Schritt für eine Serie von *ex vivo* und *in vivo* Studien, in denen eine neuroprotektive und neuroregenerative Wirkung des AT₂-Rezeptors vielfach belegt wurde.

Mit der Synthese des ersten nicht-peptidischen, oral aktiven AT₂-Rezeptor Agonisten, Compound 21, im Jahr 2004 wurde nicht nur die AT₂-Rezeptor Forschung wesentlich vereinfacht; der AT₂-Rezeptor kann seither auch als pharmakologische Zielstruktur betrachtet werden. In der Arbeit von Rompe et al. (46: Hypertension 2010) wurde durch verschiedene, experimentelle Ansätze wie z.B. Versuche an AT₂-Rezeptor defizienten Zellen bestätigt, dass es sich bei Compound 21 in der Tat um einen Agonisten für den AT₂-Rezeptor handelt. Weiterhin wurde in dieser Arbeit das anti-inflammatorische Potential einer AT₂-Rezeptor Stimulation untersucht, dass sich als ähnlich stark wie die Wirkung von Hydrokortison erwies, und es wurden Signaltransduktionswege (Aktivierung von Phosphatasen, Synthese von Epoxyeicosatriensäure über Aktivierung von CYP2C/2J, Hemmung der Aktivität von NF- κ B) für die anti-inflammatorische Wirkung des AT₂-Rezeptors beschrieben.

Die Arbeit von Kaschina et al. (75: Circulation 2008) war die erste, die den therapeutischen Effekt einer AT₂-Rezeptor Stimulation systematisch für eine Indikation, nämlich für die Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt getestet hat. In dieser an Ratten durchgeführten Studie verbesserte die Behandlung mit dem AT₂-Rezeptor Agonisten die Herzfunktion (gemessen durch intrakardialen Millar-Katheter und Echokardiographie) gleich effektiv wie ein AT₁-Rezeptor Blocker, also ein leitliniengerechtes Standardtherapeutikum. Damit erbrachte diese Studie also erstmals präklinische Evidenz, dass der AT₂-Rezeptor eine potentielle pharmakologische Zielstruktur in der kardiovaskulären Medizin darstellt.

Die in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten werden momentan weitergeführt in einer Reihe von Untersuchungen, in denen das therapeutische Potential einer AT₂-Rezeptor Stimulation für verschiedene, andere Indikationen getestet wird, in denen die anti-inflammatorischen, anti-fibrotischen und neuroregenerativen Wirkung eines AT₂-Rezeptor Agonisten von therapeutischem Nutzen sein könnten.

6. Literaturangaben aus freiem Text

1. Tigerstedt R, Bergmann P. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol* 1898;(8):223-271.
2. Leloir LF, Muñoz JM, Braun-Menendez E, Fasciolo JC. La secreción de la renina y la formación de hipertensina. *Rev Soc Arg Biol* 1940;(16):75-80.
3. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JM. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol. (Lond.)* 1940;98(3):283-298.
4. Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J. Exp. Med* 1940;71(1):29-42.
5. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J. Exp. Med* 1956;103(3):295-299.
6. Braun-Menendez E, Page IH. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science* 1958;127(3292):242.
7. Skeggs LT, Kahn JR, Lentz K, Shumway NP. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J. Exp. Med* 1957;106(3):439-453.
8. Steckelings UM, Unger T. The renin-angiotensin-aldosterone system. In: *Manual of Hypertension of the European Society of Hypertension*. London: Informa Healthcare; 2008 p. 110-116.
9. Ganten D, Minnich JL, Granger P, et al. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 1971;173(991):64-65.
10. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev* 2006;86(3):747-803.
11. Steckelings UM, Wollschläger T, Peters J, et al. Human skin: source of and target organ for angiotensin II. *Exp. Dermatol* 2004;13(3):148-154.
12. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1989;163(1):284-291.
13. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1989;165(1):196-203.
14. Speth RC, Kim KH. Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine⁶ angiotensin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1990;169(3):997-1006.
15. Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, et al. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 1991;17(5):720-721.
16. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev* 2000;52(3):415-472.

17. Koike G, Horiuchi M, Yamada T, et al. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1994;203(3):1842-1850.
18. Servant G, Dudley DT, Escher E, Guillemette G. The marked disparity between the sizes of angiotensin type 2 receptors from different tissues is related to different degrees of N-glycosylation. *Mol. Pharmacol* 1994;45(6):1112-1118.
19. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, et al. Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J. Clin. Invest* 1991;88(3):921-933.
20. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, et al. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 1995;377(6551):744-747.
21. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, et al. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995;377(6551):748-750.
22. Busche S, Gallinat S, Bohle RM, et al. Expression of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol* 2000;157(2):605-611.
23. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, et al. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J. Clin. Invest* 1995;95(1):46-54.
24. Li J, Culman J, Hörtnagl H, et al. Angiotensin AT₂ receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J* 2005;19(6):617-619.
25. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ. Res* 1998;83(12):1182-1191.
26. Widdop RE, Jones ES, Hannan RE, Gaspari TA. Angiotensin AT₂ receptors: cardiovascular hope or hype? *Br. J. Pharmacol* 2003;140(5):809-824.
27. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 1997;96(11):3954-3962.
28. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, et al. Renal expression of angiotensin type 2 (AT₂) receptors during kidney damage. *Kidney Int. Suppl* 2003;(86):S21-26.
29. Gallinat S, Yu M, Dorst A, et al. Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT₂ and AT₁ receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res. Mol. Brain Res* 1998;57(1):111-122.
30. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, et al. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995;92(23):10663-10667.
31. Steckelings UM, Henz BM, Wiehstutz S, et al. Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing. *Br. J. Dermatol* 2005;153(5):887-893.
32. Zhang J, Pratt RE. The AT₂ receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus. *J. Biol. Chem* 1996;271(25):15026-15033.

33. Hansen JL, Servant G, Baranski TJ, et al. Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ. Res* 2000;87(9):753-759.
34. Porrello ER, Delbridge LMD, Thomas WG. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor. *Front. Biosci* 2009;14:958-972.
35. Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, et al. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2005;25(1):57-64.
36. Nouet S, Amzallag N, Li J, et al. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J. Biol. Chem* 2004;279(28):28989-28997.
37. Seibold S, Rudroff C, Weber M, et al. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J* 2003;17(9):1180-1182.
38. Matsubara H, Shibasaki Y, Okigaki M, et al. Effect of angiotensin II type 2 receptor on tyrosine kinase Pyk2 and c-Jun NH2-terminal kinase via SHP-1 tyrosine phosphatase activity: evidence from vascular-targeted transgenic mice of AT2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2001;282(5):1085-1091.
39. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, et al. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J. Clin. Invest* 2000;106(3):R25-29.
40. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol. Metab* 2000;11(1):1-6.
41. Steckelings UM, Widdop RE, Paulis L, Unger T. The angiotensin AT2 receptor in left ventricular hypertrophy. *J. Hypertens* 2010;28 Suppl 1:S50-55.
42. Elbaz N, Bedecs K, Masson M, et al. Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol. Endocrinol* 2000;14(6):795-804.
43. Huang XC, Richards EM, Sumners C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J. Biol. Chem* 1996;271(26):15635-15641.
44. Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem. J* 1997;325 (Pt 2):449-454.
45. Wu L, Iwai M, Li Z, et al. Regulation of inhibitory protein-kappaB 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(3):666-678.
46. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 2010;55(4):924-931.
47. 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(8):876-882.

48. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, et al. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J. Biol. Chem* 1997;272(30):19022-19026.
49. Zhu M, Gelband CH, Moore JM, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J. Neurosci* 1998;18(2):679-686.
50. Kolesnichenko M, Vogt PK. Understanding PLZF: Two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression [Internet]. *Cell Cycle* 2011;10(5)[cited 2011 Feb 21] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21311223>
51. 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(2):651-657.
52. Nahmias C, Cazaubon SM, Briend-Sutren MM, et al. Angiotensin II AT2 receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem. J* 1995;306 (Pt 1):87-92.
53. Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, et al. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT1 receptors. *J. Biol. Chem* 1996;271(37):22729-22735.
54. Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, et al. The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol. Cell. Endocrinol* 1996;122(1):59-67.
55. 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(4):661-670.
56. Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, et al. Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J* 2003;17(14):2094-2096.
57. Iwai M, Liu H, Chen R, et al. Possible inhibition of focal cerebral ischemia by angiotensin II type 2 receptor stimulation. *Circulation* 2004;110(7):843-848.
58. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, et al. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: focus on renal damage. *J. Hypertens* 2009;27(12):2444-2451.
59. Benndorf RA, Krebs C, Hirsch-Hoffmann B, et al. Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. *Kidney Int* 2009;75(10):1039-1049.
60. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT \square receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension* 2011;57(2):308-313.
61. Akishita M, Iwai M, Wu L, et al. Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation* 2000;102(14):1684-1689.

62. Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, et al. Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl₄-induced liver fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2006;346(3):658-664.
63. Rompe F, Unger T, Steckelings UM. The angiotensin AT₂ receptor in inflammation. *Drug News Perspect* 2010;23(2):104-111.
64. Dimitropoulou C, White RE, Fuchs L, et al. Angiotensin II relaxes microvessels via the AT₂ receptor and Ca²⁺-activated K⁺ (BK(Ca)) channels. *Hypertension* 2001;37(2):301-307.
65. Arima S, Endo Y, Yaoita H, et al. Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J. Clin. Invest* 1997;100(11):2816-2823.
66. Bosnyak S, Welungoda IK, Hallberg A, et al. Stimulation of angiotensin AT₂ receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol* 2010;159(3):709-716.
67. Li XC, Widdop RE. AT₂ receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT₁ receptor blockade in conscious SHR. *Br. J. Pharmacol* 2004;142(5):821-830.
68. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, et al. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 2001;104(3):346-351.
69. Brede M, Roell W, Ritter O, et al. Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT₂ receptor-deficient mice. *Hypertension* 2003;42(6):1177-1182.
70. Reudelhuber TL. The continuing saga of the AT₂ receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension* 2005;46(6):1261-1262.
71. Jones ES, Vinh A, McCarthy CA, et al. AT₂ receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther* 2008;120(3):292-316.
72. Steckelings UM, Rompe F, Kaschina E, et al. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11(1):67-73.
73. 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(24):5995-6008.
74. Unger T, Dahlöf B. Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT₂): implications for AT₂ receptor research and therapeutic potential. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11(1):75-77.
75. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008;118(24):2523-2532.
76. Mertens B, Vanderheyden P, Michotte Y, Sarre S. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation decreases dopamine synthesis in the rat striatum. *Neuropharmacology* 2010;58(7):1038-1044.

77. Viswanathan M, Saavedra JM. Expression of angiotensin II AT2 receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides* 1992;13(4):783-786.
78. Kimura B, Sumners C, Phillips MI. Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1992;187(2):1083-1090.
79. Abiko M, Rodgers KE, Campeau JD, et al. Alterations of angiotensin II Receptor levels in sutured wounds in rat skin. *J Invest Surg* 1996;9(6):447-453.
80. Metsärinne K, Stoll M, Gohlke P, et al. Angiotensin II is antiproliferative for coronary endothelial cells in vitro. *Pharm Pharmacol Lett* 1992;2:150-152.
81. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1976;73(7):2424-2428.
82. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens. Res* 2009;32(7):533-536.
83. 18.1.1 Das Renin-Angiotensin-System. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke H (Herausgeber), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2004
84. Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, et al. Non-peptide AT2-receptor agonists [Internet]. *Curr Opin Pharmacol* 2010;[cited 2011 Feb 18] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167778>
85. www.apeiron-biologics.com
86. www.tarixpharma.com
87. Imai Y, Kuba K, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell. Mol. Life Sci* 2007;64(15):2006-2012.
88. Takeda H, Kondo S. Immunohistochemical study of angiotensin receptors in normal human sweat glands and eccrine poroma. *Br. J. Dermatol* 2001;144(6):1189-1192.
89. Takeda H, Katagata Y, Kondo S. Immunohistochemical study of angiotensin receptors in human anagen hair follicles and basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol* 2002;147(2):276-280.
90. Min L, Cui T, Yahata Y, et al. Regulation of collagen synthesis in mouse skin fibroblasts by distinct angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology* 2004;145(1):253-260.
91. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, et al. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):216-226.
92. Tang H, Cheng D, Jia Y, et al. Angiotensin II induces type I collagen gene expression in human dermal fibroblasts through an AP-1/TGF-beta1-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2009;385(3):418-423.
93. Nickenig G, Geisen G, Vetter H, Sachinidis A. Characterization of angiotensin receptors on human skin fibroblasts. *J. Mol. Med* 1997;75(3):217-222.

-
94. Liu H, Cheng B, Yu W, et al. Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars. *Life Sci* 2006;79(5):475-483.
 95. Liu H, Cheng B, Fu X, et al. Characterization of AT1 and AT2 receptor expression profiles in human skin during fetal life. *J. Dermatol. Sci* 2007;46(3):221-225.
 96. Yu L, Zheng M, Wang W, et al. Developmental changes in AT1 and AT2 receptor-protein expression in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11(4):214-221.
 97. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev* 2007;12(3-4):331-343.
 98. Takeda H, Katagata Y, Hozumi Y, Kondo S. Effects of angiotensin II receptor signaling during skin wound healing. *Am. J. Pathol* 2004;165(5):1653-1662.
 99. Goto M, Mukoyama M, Suga S, et al. Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension* 1997;30(3 Pt 1):358-362.
 100. van Kesteren CA, van Heugten HA, Lamers JM, et al. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol* 1997;29(8):2147-2157.
 101. Maric C, Aldred GP, Harris PJ, Alcorn D. Angiotensin II inhibits growth of cultured embryonic renomedullary interstitial cells through the AT2 receptor. *Kidney Int* 1998;53(1):92-99.
 102. Sadeh Pour Saleh, Hannieh, Zuberbier T, Unger T, et al. Angiotensin AT2-receptor stimulation modulates proliferation and differentiation in primary human keratinocytes: a novel pharmacological concept for the treatment of psoriasis? Abstract for the 37th meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Februar 2010, Lübeck, Germany In: *Exp Dermatol.* 2010 p. 171.
 103. McCarthy CA, Vinh A, Callaway JK, Widdop RE. Angiotensin AT2 receptor stimulation causes neuroprotection in a conscious rat model of stroke. *Stroke* 2009;40(4):1482-1489.
 104. Schwengel, Thöne-Reineke, Lucht K, et al. Direct AT2-receptor stimulation improves survival and neurological outcome after experimental stroke (MCAO) in mice. Abstract for the 15th Scientific Meeting of the European Council for Cardiovascular Research, Oktober 2010, Nizza, Frankreich In: *Hypertension.* 2010 p. 1161.
 105. Namsolleck P, Boato, Francesco, Schwengel, Katja, et al. Selective AT2-receptor stimulation promotes neuroregeneration and improves functional outcome in an animal model of spinal cord injury. Abstract for the 20th Scientific Meeting of the European Society of Hypertension, Juni 2010, Oslo, Norway In: *J Hypertens.* 2010 p. E540.
 106. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 2005;26(8):1401-1409.
 107. Wardat, Sami, Iwai M, Horiuchi M, et al. Angiotensin AT2R stimulation improves glucose tolerance and insulin sensitivity in obese mice. Abstract for the 21st Scientific Meeting of the European Society of Hypertension, Juni 2011, Mailand, Italy

-
108. 29.2.2 Nebennierenrindenhormone: Einzelne Wirkungen. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke H (Herausgeber), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2004
 109. Vilahur G, Juan-Babot O, Peña E, et al. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2011;50(3):522-533.
 110. Adachi Y, Saito Y, Kishimoto I, et al. Angiotensin II type 2 receptor deficiency exacerbates heart failure and reduces survival after acute myocardial infarction in mice. *Circulation* 2003;107(19):2406-2408.
 111. Oishi Y, Ozono R, Yano Y, et al. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling. *Hypertension* 2003;41(3 Pt 2):814-818.
 112. Oishi Y, Ozono R, Yoshizumi M, et al. AT2 receptor mediates the cardioprotective effects of AT1 receptor antagonist in post-myocardial infarction remodeling. *Life Sci* 2006;80(1):82-88.
 113. Voros S, Yang Z, Bove CM, et al. Interaction between AT1 and AT2 receptors during postinfarction left ventricular remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2006;290(3):H1004-1010.
 114. Xu J, Carretero OA, Liu Y, et al. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertension* 2002;40(3):244-250.
 115. Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E, et al. Targeted deletion of angiotensin II type 2 receptor caused cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;106(17):2244-2249.
 116. 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(2):459-464.
 117. Yang Z, Bove CM, French BA, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 2002;106(1):106-111.

7. Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung der Gastwissenschaftler, Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten, die mit mir die Begeisterung für den AT2-Rezeptor geteilt haben und die mit unermüdlichem Einsatz maßgeblich an den Studien mitgearbeitet haben, die den Kern dieser Arbeit ausmachen. In alphabetischer Reihenfolge sind dies: Sophie Becker, Ann-Kathrin Hosenfeld, Marie Horlbeck, Maxi Kummert, Julia Leonhardt, Anne Reichenbach, Hannieh Sadegh pour Saleh, Francesca Santi, Patrick Schmerler, Katja Schwengel, Katja Ströder, Veronica Valero, Daniel Villela, Susanne Walter, Sami Wardat, Anja Wieland, Tanja Wollschläger.

Besonders hervorheben möchte ich Franziska Rompe, meine erste Doktorandin am CCR, die vertrauensvoll mit mir zusammen die Arbeit mit Compound 21 begonnen hat, als noch keiner wusste, ob die Arbeit mit dieser neuen Substanz jemals zu publizierbaren Ergebnissen führen würde.

Ein besonderer Dank auch an die beiden Personen, die das Herz unserer Arbeitsgruppe ausmachen: Pawel Namsolleck und Kristin Lucht. Beide sind fachlich und persönlich unverzichtbar.

Ludovit Paulis, der anderthalb Jahre Gastwissenschaftler in unserer Gruppe war, bin ich ebenfalls zu besonderem Dank verpflichtet für eine äußerst stimulierende wissenschaftliche Zusammenarbeit und den überaus netten, persönlichen Kontakt.

An allen bisherigen Instituten/Kliniken meiner beruflichen Laufbahn hatte ich das Glück, von netten, kompetenten und hilfsbereiten Kollegen umgeben gewesen zu sein. Unmöglich, sie alle zu nennen.

Für eine schon seit Jahren ausgesprochen angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre im Institut für Pharmakologie der Charité danke ich (alphabetisch) Anna Foryst-Ludwig, Heiko Funke-Kaiser, Kai Kappert, Elena Kaschina, Ulrich Kintscher und Heike Kusserow.

Ein besonderes Dankeschön an Christa Thöne-Reineke für eine fachlich hochkompetente Einführung in das tierexperimentelle Arbeiten und für ihre Zuverlässigkeit, Solidarität und Freundschaft. Das Compound 21 Projekt wäre nicht da, wo es ist, ohne ihren Rat und ihre Unterstützung.

Stellvertretend für alle Kollegen am Pharmakologischen Institut in Heidelberg ein herzliches Dankeschön an meine erste „Lehrerin“ in der Wissenschaft und gute Freundin, Christine Lebrun.

Ein Dank auch an alle Kollegen aus der Zeit in der Dermatologie, besonders an meine ersten Oberärztin Barbara Hermes und meinen ersten Stationsarzt Ulrich Hein, von denen ich viel gelernt habe. Dank auch Prof. Wolfram Sterry für eine exzellente, fachliche Ausbildung; und ein besonderer Dank an Prof. Beate Henz für ihren respektvollen Umgang mit ihren Assistenten und für eine Arbeitsatmosphäre, in der in bemerkenswerter Weise die Möglichkeit bestand, eigene wissenschaftliche Interessen und Neigungen weiterzuentwickeln.

Dank auch meinen Vorgesetzten und Kollegen am Dept. of Medicine der University of Melbourne (special thanks to Colin Johnston) und in der Abteilung für kardiovaskuläre Forschung bei Ciba Geigy, Basel (special thanks to Serge Bottari).

Meinen Kooperationspartner (alphabetisch) Kerstin Amann, Metin Artuc, Michael Bader, Francesco Boato, Christine Brandt, Björn Dahlöf, Jan Danser, Joep van Esch, Anders Hallberg, Sven Hendrix, Masahiru Horiuchi, Per Jansson, Stephanie Krämer, Mats Larhed, Harm Peters, Massimo Porta, Robson Santos, Carmine Savoia, Florianne Tschudi-Monnet, Reinhard Voll und Robert Widdop möchte ich herzlich danken für viele inspirierende Begegnungen und Diskussionen, für Zusammenarbeit und freundschaftliche Kontakte trotz Konkurrenz und dafür, dass sie die thematische Breite unserer Arbeiten erst ermöglicht haben.

In mehreren Phasen meiner beruflichen Entwicklung bin ich durch Stipendien unterstützt worden. Dafür danke ich der DFG, dem Institut für Gender in Medicine und der Charité. Alle drei Stipendien haben geholfen, nach der Geburt meiner Tochter einen Wiedereinstieg in das akademische Berufsleben zu schaffen.

Ein ganz besonderer Dank an Prof. Roland Wauer, der zu meiner Zeit für das Rachel-Hirsch-Programm der Charité zuständig war. Durch seine kontinuierliche, freundliche Motivation hat er großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit.

Die Liebe zur Wissenschaft und zum AT₂-Rezeptor habe ich schon vor langer Zeit von Thomas Unger gelernt. Diese gemeinsame, wissenschaftliche Leidenschaft aber auch viele weitere, geteilte Interessen sind Grundlage einer nun schon über

25jährigen Freundschaft, die mein Leben beruflich und persönlich geprägt hat. Keine Frage, dass es ohne ihn diese Arbeit nicht gäbe. Danke für alles, Thomas!

Familiärer Rückhalt ist nicht hoch genug einzuschätzen und macht Kräfte frei für berufliche Aktivitäten.

Solch uneingeschränkter Rückhalt habe ich immer von meinen Eltern Elisabeth und Werner (†) Steckelings erfahren. Sie haben meine Wege immer unterstützt – auch wenn sie manches daran wohl nicht immer ganz nachvollziehen konnten. Umso mehr gilt Ihnen mein Dank.

Heutzutage sind Metin und Sara der Fixpunkt meines Lebens. Unser gemeinsames Leben und Ihr Wohlergehen sind das Wichtigste!

8. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift